



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA ONCOPROTEÍNA E6 DE LOS VIRUS DE PAPILOMA
HUMANO DE ALTO RIESGO (VPH-AR) 16 Y 18 SOBRE EL ESTADO
REDOX CELULAR Y LA RADIOSENSIBILIDAD EN UN MODELO
CELULAR DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Iris Coronado Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Lizano Soberón Marcela

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gonsebatt Bonaparte María Eugenia

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Ibarra Rubio María Elena

Departamento de Biología
Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, enero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CGEP/PMDCB/1350/2020
Asunto: jurado de examen

Coronado Martínez Iris
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **21 de septiembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Efecto de la oncoproteína E6 de los virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) 16 y 18 sobre el estado redox celular y la radiosensibilidad en un modelo celular de cáncer de cabeza y cuello**", dirigida por el/la Dr(a). **Lizano Soberón Marcela**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rojas del Castillo Emilio
VOCAL	García Becerra Rocío Angeles
VOCAL	Rosales Ledezma Carlos
VOCAL	Ortiz Sánchez Elizabeth
SECRETARIO	Langley McCarron Elizabeth

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de septiembre de 2020
Coordinadora



Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

AGRADECIMIENTOS



Agradezco a todas las personas que directa o indirectamente hicieron posible la realización de esta tesis. Especialmente a mi mamá, por ser mi gran aliada y complice en cada etapa de mi vida, a mi hermano por estar conmigo en todo momento y a mi papá por sus sabias palabras.

A mi asesora la Dra. Marcela Lizano Soberón por abirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de aprender tanto sobre la investigación de virus y cáncer. Infinitas gracias por el gran apoyo que me ha brindado en todo momento y por su valiosa guía y recomendaciones en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Alfredo Cruz Gregorio por sus aportaciones y por enseñarme todas las técnicas necesarias para la elaboración del presente proyecto. A la M. en C. Itzel Militza Torres Viquez y al Dr. Luis Alberto Medina por su colaboración en los experimentos de radiación. Al Dr. José Pedraza Chaverri por permitirme utilizar sus equipos en parte de los experimentos.

A todos los amigos del laboratorio: Lalo, Isme, Alicia, Liz, Ara, Leo, Omar, Leslie, Alex, Katy, Adry, Joaquín y Diego por tener siempre la mejor disposición de compartir sus conocimientos y por su invaluable contribución y consejos durante la realización de este proyecto. Además por generar el mejor ambiente de trabajo en el que he tenido la oportunidad de colaborar y por todos los memorables momentos en su grata compañía.

A la M. en C. Adela Carrillo García, a la Dra. Adriana Contreras Paredes y a la Dra. Imelda Martínez Ramírez por su gran trabajo en todo lo referente al correcto funcionamiento del laboratorio.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Cancerología.

A los integrantes de comité tutorial: Dr. Rojas del Castillo Emilio, Dra. García Becerra Rocío Ángeles, Dr. Rosales Ledesma Carlos, Dra. Ortiz Sánchez Elizabeth, Dra. Langley McCarron Elizabeth por su preciado tiempo para revisar y corregir la presente tesis.

Al CONACyT por la subvención otorgada durante mis estudios con número de becario: 818077.

Este trabajo fue parcialmente financiado por “PRONAI-7-VIRUS Y CÁNCER” Ref: 303044, por el Instituto Nacional de Cancerología, Mexico, Ref:(015/039/IBI)(CEI/998/15) y por el CONACyT Ref: 261499.



ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIACIONES.....	VI
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Cáncer de cabeza y cuello	3
2. Panorama epidemiológico.....	3
3. Factores de riesgo	4
4. CECyC VPH(+) y CECyC VPH(-).....	5
4.1. Características demográficas.....	6
4.2. Características histopatológicas	6
4.3. Perfiles moleculares	8
4.3.1. Perfil molecular CECyC-VPH(-).....	8
4.3.2. Perfil molecular CECyC-VPH(+).	10
4.3.3. Alteraciones moleculares compartidas	12
4.4. Sistema inmune	14
4.5. Pronóstico.....	15
5. Virus del papiloma humano	16
5.1. Genoma del VPH.....	17
5.2. Ciclo viral	18
6. Tratamiento para el CECyC.....	23
7. Radioterapia	24
8. Estrés oxidativo	28
8.1. Formación de especies reactivas de oxígeno	28
8.2. Daño oxidativo.....	32

8.3. Señalización REDOX.....	33
8.4. Sistema antioxidante.....	34
8.4.1. NRF2	34
8.4.2. GSH	35
8.4.3. SOD	36
8.4.4. Catalasa	37
III. ANTECEDENTES	38
IV. JUSTIFICACIÓN	39
V. HIPÓTESIS.....	39
VI. OBJETIVOS.....	39
1. Objetivo general	39
2. Objetivos particulares.....	39
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
1. Cultivo celular y transfecciones.....	40
2. RT-PCR	42
3. Obtención de la DI50 de la radiación ionizante (137Cs) mediante ensayos clonogénicos....	44
4. Viabilidad celular	45
5. Determinación de los niveles intracelulares de ROS.....	45
6. Cuantificación de proteínas carboniladas	46
7. Cuantificación de GSH y GSSG	47
8. Actividad enzimática antioxidante	47
9. Western blot.....	48
10. Análisis estadístico	48
VIII. RESULTADOS	49
1. Obtención de la DI50 de la radiación ionizante (137Cs).	49
2. Expresión de los oncogenes E6 del VPH 16 y 18 en células FaDu transfectadas de manera estable.	50
3. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 no modifican la variabilidad en células FaDu.....	52

4. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 disminuyen la fracción de supervivencia sólo en células irradiadas.	52
5. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 incrementan las ROS.	53
6. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 incrementan la concentración de proteínas carboniladas.	54
7. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 disminuyen la relación GSH/GSSG	55
8. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 aumentan los niveles de γ H2AX.....	56
9. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modifican los niveles del factor Nrf2 antes y después del tratamiento con RI.....	57
10. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modifican los niveles de las enzimas antioxidantes SOD1 y SOD2 antes y después del tratamiento con RI.	58
11. Los niveles de la actividad enzimática de la catalasa sólo aumentan en presencia del oncogen E6 del VPH 16	59
IX. DISCUSIÓN	61
X. CONCLUSIONES	79
1. Conclusiones particulares.....	79
2. Conclusión general	81
XI. PERSPECTIVAS	81
XII. REFERENCIAS	82
XIII. ANEXO	89



Figura 1. Sitios más comunes donde se desarrolla el CECyC-VPH(+)	7
Figura 2. Perfil genómico de los CECyC	8
Figura 3. Esquema de la organización del genoma circular del VPH	17
Figura 4. Funciones más estudiadas de la oncoproteína E6 del VPH	20
Figura 5. Mecanismo por el cual la oncoproteína E7 induce la progresión del ciclo celular	22
Figura 6. Daño ocasionado en el ADN por la radiación ionizante	25
Figura 7. Respuesta celular al incremento de especies reactivas de oxígeno	28
Figura 8. Sitios donde se forman las ROS en las células	29
Figura 9. Activación del factor de transcripción Nrf2	35
Figura 10. Reacción metaloenzimática de las proteínas SOD	36
Figura 11. Reacción enzimática de la proteína catalasa	37
Figura 12. Vector p3XFLAG-CMV-10	41
Figura 13. Curva de la fracción de supervivencia de las células FaDu tratadas con RI ¹³⁷ Cs	50
Figura 14. Amplificación y expresión del gen E6 del VPH-16 y VPH-18 en células FaDu transfectadas de manera estable con y sin RI ¹³⁷ Cs	51
Figura 15. Viabilidad de las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ¹³⁷ Cs	52
Figura 16. Evaluación de la fracción de supervivencia de células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷ Cs	53
Figura 17. Cuantificación de los niveles intracelulares de ROS en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ¹³⁷ Cs	54
Figura 18. Cuantificación de proteínas carboniladas en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ¹³⁷ Cs	55
Figura 19. Cuantificación de GSH y GSSG en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ¹³⁷ Cs	56
Figura 20. Niveles de expresión de γ H2AX en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ¹³⁷ Cs	57

Figura 21. Modificación de los niveles del factor Nrf2 en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷ Cs	58
Figura 22. Niveles de expresión de SOD1 y SOD2 y actividad enzimática de SOD en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷ Cs	59
Figura 23. Niveles de expresión y actividad enzimática de la proteína catalasa en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷ Cs	60
Figura 24. Modulación diferencial del EO en células FaDu transfectadas con los oncogenes E6 del VPH-16 y 18	80

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1. Panorama epidemiológico del CECyC a nivel mundial y en México	4
Tabla 2. Función de las proteínas del VPH	18
Tabla 3. Mezcla de reacción y programa de amplificación para la obtención de cADN	43
Tabla 4. Mezcla de reacción y programa de amplificación del gen E6-VPH-16 y 18	43
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la PCR	44
Tabla 6. Número de células cultivadas en relación a la dosis de radiación	44
Tabla 7. Radiosensibilidad de las líneas celulares de CECyC de acuerdo al estado del VPH	64



2-OH-E⁺ : 2-hidroxietidio	CAF : <i>cancer associated fibroblasts</i>
2-VP : 2-vinilpiridina	CAT : catalasa
4-HNE1 : 4-hidroxinonenal	CCND1 : ciclina D1
8-OH-G : 8-hidroxiguanosina	Cdk4/6 : quinasa dependiente de ciclina
8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	CDKN2A : inhibidor 2 ^a de quinasa dependiente de ciclina
Acroleína : 2-propenal	CECyC : cáncer escamoso de cabeza y cuello
ADN : Ácido desoxirribonucleico	CNA : alteraciones en el número de copias
ALDH1A2 : Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	CNC : subfamilia collar de cap 'n'
APOBEC : enzimas catalíticas de la enzima editora de ARNm de apolipoproteína B	CSC : <i>cancer stem cells</i>
ARE : elementos de respuesta antioxidante	CSMD1 : CUB and Sushi multiple domains-1
ARN : Ácido ribonucleico	CTGF : <i>factor de crecimiento del tejido conectivo</i>
ARNm : Ácido ribonucleico mensajero	CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
ATM : ataxia-telangiectasia mutated	CTNNB1 : β-catenina
ATP : adenosina trifosfato	CUL3 : E3 ubiquitin ligase
ATR : <i>Rad3-relacionado</i>	CYLD : Lysine 63 Deubiquitinase
AURKA : Aurora-A quinasa	DAMP : <i>patrones moleculares asociados al daño</i>
BCA : ácido bicinónico	DDR : DNA damage repair
BER : <i>base excision repair</i>	DDX3X : DEAD-Box Helicase 3 X-Linked
BIRC2 : Baculoviral IAP repeat-containing protein 2	DE : desviación estándar
BLK : B lymphocyte kinase	DHE : dihidroetidio
bZip : región básica de la cremallera de leucina	DI₅₀ : dosis inhibitoria media
CaCu : cáncer cervicouterino	DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
cADN : ADN complementario	DNMT : ADN metiltransferasa
	DNP2 : 2,4-dinitrofenilhidrazina

DSB: rompimientos de doble cadena	H₂DCFDA: diacetato de diclorofluoresceína
DTNB: ácido 5',5'-Ditiobis-2-Nitrobenzoico	H3K27: desmetilasas específicas de la histona 3 lisina-27
E⁺: etidio	HClO: ácido hipocloroso
E6AP: E6 associated protein	HDAC: histonas desacetilasas
EBV: virus de Epstein-Barr	HIF: <i>VIIérvixVII inducible factor</i>
ECM: <i>matriz extracelular</i>	HLA clase 1: Human leukocyte antigen -1
EGF: <i>Epidermal Growth Factor</i>	HNE: hidroxinonenal
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor	HO-1: Hemoxigenasa-1
EO: estrés oxidativo	HRAS: Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog
ERK: señal extracelular-quinasas reguladas	HRP: peroxidasa de rábano
FADD: Fas Associated Via Death Domain	HRR: <i>homologous recombinational repair</i>
FAT1: FAT Atypical Cadherin 1	HSPG: proteoglicanos de heparán sulfato
FDXR: ferrodoxina reductasa	IACR: International Association of Cancer Registries
FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor1	ICD: <i>muerte celular inmunogénica</i>
FHIT: fragile histidine triad protein	IFN: interferón
FoXO: forkhead box O	IGF1R: Insulin-like Growth Factor 1 receptor
GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	IHC: inmunohistoquímica
GCLM: Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit	IRF3: factor regulador de interferón 3
GFP: Green fluorescent protein	IRX4: Iroquois Homeobox 4
GFR: receptor del factor de crecimiento	JNK: c-Jun N-terminal quinasa
GPx: glutatión peroxidasa	KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1
GR: glutatión reductasa	LCR: región larga de control
GRIA4: Glutamate receptor 4	MALDITOF: Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
GSH: glutatión	MCL: modelo cuadrático lineal
GSSG: disulfuro de glutatión	
GST: glutatión transferasa	
Gy: grays	

MDA: malondialdehído

MDM2: Mouse VIIIérvix minute 2 homolog

MHC: major histocompatibility complex

MLL2: histone H3 lysine 4 H3K4 mono-methyltransferase

MTS: 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-5-3-carboximetoxifenil-2-4-sulfofenil-2H-tetrazolio

NAC: N-acetil-cisteína

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NBT: nitroazul de tetrazolio

NF-κB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFE2L2: Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2

NHEJ: *Non-homologous end joining*

NO•: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: nuclear factor erythroid 2–related factor 2

NSD1: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1

OH•: radical hidroxilo

OSR2: odd-skipped-related 2

PD-1: Programmed cell death protein 1

PDGF: *factor de crecimiento derivado de plaquetas*

Peróxido de hidrógeno: H₂O₂

Peroxinitrito: ONOO⁻

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PIP3: phosphatidylinositol-3

PKC: proteína quinasa C

PMS: metosulfato de fenazina

pRB: proteína de retinoblastoma

PRR: *receptores de reconocimiento de patrones*

Prxs: peroxiredoxina

PTEN: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase

Superóxido: O₂^{•-}

Peroxilo: ROO•

RI: radiación ionizante

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

RTK: receptores tirosina quinasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

SH: *grupo sulfhidrilo*

SOD: superóxido dismutasa

SOD1: SOD citosólica dimérica de cobre y zinc, Cu, ZnSOD

SOD2: SOD de manganeso, MnSOD

SOD3: SOD extracelular Cu, ZnSOD

SOX2: SRY-Box Transcription Factor 2

SSB: rompimientos de una cadena

TA: temperatura ambiente

TACC3: Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

TGF: factores de crecimiento transformantes

TGF β : *factor de crecimiento transformante- β*

TILS: linfocitos infiltrantes de tumores

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzónico

TORS: cirugía robótica transoral mínimamente invasiva

TP63: Tumor Protein P63

TRAF3: TNF Receptor Associated Factor 3

TRAIL: factor de necrosis tumoral

TrxR: tiorredoxina reductasa

VPH: virus del papiloma humano

VPH-AR: virus de papiloma humano de alto riesgo

WB: western blot

WT: Wild Type, sin mutar

XO: xantina oxidasa

XRCC1: X-Ray Repair Cross Complementing 1

YAP1: yes-associated protein 1



El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECyC) ocupa el cuarto lugar en prevalencia y el sexto lugar de incidencia con respecto a todos los cánceres a nivel global con un índice de mortalidad de aproximadamente el 50%. El alcoholismo, el tabaquismo y la infección persistente por el virus del papiloma humano (VPH), particularmente del VPH-16 y 18, están asociados al desarrollo de esta neoplasia. La transformación celular inducida por el VPH ocurre mediante la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7. Diversos estudios demuestran que los CECyC-VPH(+) responden mejor a la radioterapia, cuyo principal mecanismo para inducir la apoptosis es el rompimiento directo del ADN (Ácido desoxirribonucleico) o indirectamente aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las células cuentan con sistemas antioxidantes que disminuyen las ROS; sin embargo, cuando el sistema antioxidante es incapaz de neutralizar las ROS se produce el estrés oxidativo (EO). En nuestro laboratorio se ha demostrado que en células C33A transfectadas con E6 del VPH16 y 18 se induce EO y daño al ADN, mientras que E7 antagoniza su efecto. No obstante, aún no se ha dilucidado el mecanismo por el cual el VPH induce radiosensibilidad y cual es la función de la oncoproteína E6. Por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar si las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 generan EO y evaluar su efecto sobre la radiosensibilización en un modelo celular de CECyC. Con esta finalidad se transfectaron células FaDu de manera estable con los genes E6 del VPH 16 y 18 y el vector vacío p3XFLAG. Después de valorar la eficacia de la transfección se evaluó la proliferación, viabilidad, estado redox (pro-oxidantes y antioxidantes) y daño al ADN en las células FaDu transfectadas antes de tratarlas con la DI_{50} (dosis inhibitoria media) de la radiación ionizante (RI) ($^{137}\text{Cesio}$). Posteriormente se determinó la DI_{50} de la RI ($^{137}\text{Cesio}$) en 1 Gy, esta dosis se utilizó para tratar a las células FaDu transfectadas y se evaluó su fracción de supervivencia y los niveles de las enzimas antioxidantes. Los resultados obtenidos muestran un incremento en el EO en las células transfectadas en relación al control, caracterizado por un aumento en la producción de ROS, aumento en el contenido de proteínas carboniladas, disminución de la proporción GSH/GSSG y el aumento del marcador de daño al ADN (γH2AX). Asimismo, se observó un aumento de la respuesta antioxidante favorecida por el incremento de la activación del factor Nrf2 y de la expresión y/o activación de las proteínas que este factor

regula como catalasa, SOD1 y SOD2. Por otro lado, no se observaron cambios en la fracción de supervivencia de las células FaDu transfectadas sin irradiar. Sin embargo; las células que fueron tratadas con 1 Gy de RI ^{137}Cs mostraron una disminución significativa de ~50%. El nivel de expresión del factor Nrf2 en las células FaDu-16E6 y FaDu-18E6 tratadas con RI disminuyó significativamente respecto al control p3X, así como respecto a las células no irradiadas en las cuales se observó el efecto contrario. Por otro lado, el nivel de expresión de SOD1 mostró un aumento de mayor magnitud con respecto a sus contrapartes no irradiadas; mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de SOD2. Los niveles de expresión de la enzima catalasa no se modificaron ni en las células irradiadas ni sin irradiar. Se concluyó que las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modulan diferencialmente los mecanismos de la regulación redox, incrementan el EO, el daño al ADN así como de las enzimas antioxidantes. Por otro lado, después de la RI, los oncogenes inducen una menor fracción de supervivencia y reducción de la respuesta antioxidante en comparación con las células no irradiadas. Este trabajo aporta información sobre los mecanismos que podrían regular la radiosensibilidad intrínseca de los tumores asociados a la infección por el VPH.



1. Cáncer de cabeza y cuello

Los carcinomas de cabeza y cuello constituyen un grupo de neoplasias que comparten un sitio anatómico común y se caracterizan por presentar una alta heterogeneidad fenotípica, etiológica, biológica y clínica [1-4]. Se originan en la región del tracto aerodigestivo superior en los tejidos que componen la cavidad oral, lengua, labios, faringe (nasofaringe, orofaringe, hipofaringe), laringe, senos paranasales, cavidad nasal y glándulas salivales [5-8]. El tipo histológico más común (90%) es el carcinoma de células escamosas que se desarrolla en el epitelio plano estratificado, conocido como cáncer escamoso de cabeza cuello (CECyC) [4,9,10]. Sin embargo, se presentan variantes de este, entre los que se incluyen el verrucoso, papilar, sarcomatoide, basaloide, adenoescamoso y acantolítico, variantes que corresponden al 10% de los casos [11].

Los carcinomas nasofaríngeos se consideran una entidad clínico-patológica separada debido a que son biológicamente distintos y están estrechamente relacionados con la infección del virus de Epstein-Barr (EBV). Esta clasificación tampoco incluye las neoplasias que se establecen en el sistema nervioso central, ojos, tiroides, sistema linfático y glándulas endócrinas [5,12].

2. Panorama epidemiológico

El CECyC ocupa el cuarto lugar en prevalencia y el sexto lugar de incidencia con respecto a todos los cánceres a nivel global. En su último reporte del 2018, la Asociación Internacional de Registros de Cáncer (IACR, por sus siglas en inglés, International Association of Cancer Registries) informó que anualmente se diagnostican 887,669 nuevos casos de CECyC alrededor del mundo que representan el 5% de todos los casos de cáncer [13].

A pesar de los avances en cirugía y quimiorradioterapia el índice de mortalidad reportado fue del 51%, debido, principalmente, a que más de dos tercios de los casos se diagnostican en estadios avanzados, con alta frecuencia de recurrencias locales y segundos tumores primarios [1,3,4,7,8,14,15]. Su detección temprana es complicada por el hecho de que muchas lesiones en estadios tempranos no son fáciles de identificar y son asintomáticas. La recurrencia local afecta a aproximadamente al 50-60% de los pacientes y pueden surgir de las células neoplásicas

residuales que sobreviven al tratamiento o a la cancerización de campo subyacente. De hecho, una característica clave del CECyC es la presentación de recurrencias después de una resección quirúrgica aparentemente completa, probablemente debido a la existencia de procesos preneoplásicos en múltiples sitios de la mucosa [9].

En nuestro país, la incidencia anual es de 5,126 nuevos casos con un índice de mortalidad del 42%. México no se encuentra entre los primeros 20 lugares de mayor frecuencia en el mundo, pero sí entre los primeros 5 de América Latina [13].

Tanto a nivel mundial como en nuestro país la tasa de incidencia de CECyC es más alta en hombres que en mujeres en una proporción 3:1 y la edad media de los pacientes es de aproximadamente 60 años [9,16].

En la siguiente tabla se desglosan los índices de incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer de cabeza y cuello por sitio anatómico a nivel mundial y en México [13].

Tabla 1. Panorama epidemiológico del CECyC a nivel mundial y en México [13]

Cáncer	Mundial			México		
	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia	Incidencia	Mortalidad	Prevalencia
Todos los cánceres	18078957	9555027	43841302	190667	83476	471497
Hipofaringe	80608	34984	119130	188	89	282
Laringe	177422	94771	488900	1364	801	3951
Labios, cavidad oral	354864	177384	913514	2017	674	5647
Nasofaringe	129079	72987	362219	282	115	873
Orofaringe	92887	51005	280508	442	239	1237
Glándulas salivales	52799	22176	123460	833	212	1990
Total CCC	887659	453307	2287731	5126	2130	13980

3. Factores de riesgo

El consumo excesivo de tabaco es el factor de riesgo predominante en la carcinogénesis del CECyC debido a que el tabaco contiene más de 60 productos carcinogénicos que tienen la capacidad de producir radicales libres y formar aductos en el ADN (Ácido desoxiribonucleico) que inducen la progresión neoplásica. Asimismo, la ingesta significativa de alcohol se asocia con el desarrollo de este tipo de tumores ya que el acetaldehído, un metabolito del alcohol, también puede formar aductos en el ADN. Además, el alcohol actúa como un solvente que promueve la exposición de la mucosa aerodigestiva a los carcinógenos, por lo que se ha observado que los

efectos conjuntos de ambos factores etiológicos muestran un comportamiento sinérgico que incrementa el riesgo de desarrollar CECyC de 20 a 40 veces [1-4,7-10,14-21].

Como resultado del éxito en los programas de control del tabaco, muchos países han observado disminución en el consumo de cigarrillos *per cápita* en las últimas décadas, seguido de la disminución en la incidencia general de CECyC. El consumo actual de tabaco ha disminuido tanto en hombres como en mujeres, aunque sigue siendo más frecuente entre los hombres. Si bien la incidencia general de CECyC ha disminuido, en las últimas décadas se ha observado el incremento en las incidencias de cáncer de orofaringe y cavidad oral. Estas tendencias se han atribuido a la asociación de estas neoplasias (tanto epidemiológica, patológica como experimental) con la infección persistente del virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) [1-4,6,7,9,11,17,18,20,22-29].

Se ha sugerido que la infección por VPH-AR en la orofaringe se contrae mediante transmisión sexual. De acuerdo a este planteamiento, los factores relacionados con el comportamiento sexual, como el aumento en las prácticas sexuales orales, edad más temprana en el debut sexual, mayor número de parejas sexuales y antecedentes de infección de transmisión sexual, están asociados con mayor riesgo de desarrollar CECyC, especialmente en pacientes inmunodeficientes o inmunodeprimidos [12,18,22,27,30].

El consumo de alcohol y tabaco es menos frecuente en pacientes con CECyC asociados a la infección con VPH-AR y se desconoce si tienen efectos sinérgicos con el virus [30].

Por otro lado, se ha reportado la asociación de diversos factores etiológicos con una menor proporción de CECyC, entre estos se encuentran: deficiencias nutricionales, el consumo de betel, nuez de areca o marihuana, exposición al formaldehído o a radiaciones ionizantes, factores genéticos (anemia de Fanconi) y la mala higiene oral o enfermedad periodontal [4,6,30].

4. CECyC VPH(+) y CECyC VPH(-)

Como se mencionó anteriormente, la investigación científica de las últimas décadas ha demostrado que un subconjunto de CECyC está relacionado con la presencia del VPH-AR [CECyC-VPH(+)]. Se ha reportado que se encuentran en una proporción del 25 al 35% y que difieren en sus características demográficas, biológicas, histopatológicas, moleculares, así como

en la respuesta al tratamiento, con respecto a los que se desarrollan independientemente del virus [2,5,6,7,8,9,11,18,21,28,30-33].

4.1. Características demográficas

La primera diferencia radica en los grupos etarios en los que se presenta la patología: la mayor incidencia de los tumores VPH-AR(-) se reportan en personas mayores de 55 años y se atribuye al consumo frecuente de alcohol y tabaco, mientras que los cánceres VPH-AR(+) se desarrollan entre la población de mediana edad (35-45 años). Diversos análisis demográficos demostraron que los pacientes con CECyC-VPH(+) predominantemente son hombres caucásicos que tienen un estado socioeconómico mayor que aquellos con CECyC-VPH(-) [4,5,6,7,10,11,15,25,27,30].

4.2. Características histopatológicas

Los sitios más comunes donde se desarrolla el CECyC-VPH(+) son las amígdalas palatinas y linguales que se encuentran en el anillo de Waldeyer (Fig. 1A). Se ha estimado que aproximadamente de 60 a 80% de los cánceres orofaríngeos están relacionados con la infección por el VPH-AR, mientras que solo de 1.3 al 7% de otros CECyC son positivos [2,5,6,7,8,10,11,12,18,21,25,26,27,28,30,33].

Las amígdalas están recubiertas por un epitelio estratificado no queratinizado y presentan criptas tubulares ramificadas revestidas por epitelio reticulado (de 10 a 30 criptas en las amígdalas palatinas y 1 en las amígdalas linguales). El epitelio reticulado tiene una lámina basal incompleta que facilita la infiltración de células inmunes, por lo que las criptas tienen una función importante en el inicio de la respuesta inmune en la amígdala. Se cree que las criptas amigdalares son más susceptibles a la infección por VPH-AR debido a que el epitelio reticulado no es continuo en esta área, sino una red abierta de células que ya no exhiben la polarización y la maduración de la superficie que caracterizan el epitelio escamoso estratificado que recubre la superficie de las amígdalas (Fig. 1B) [12,18,28,34].

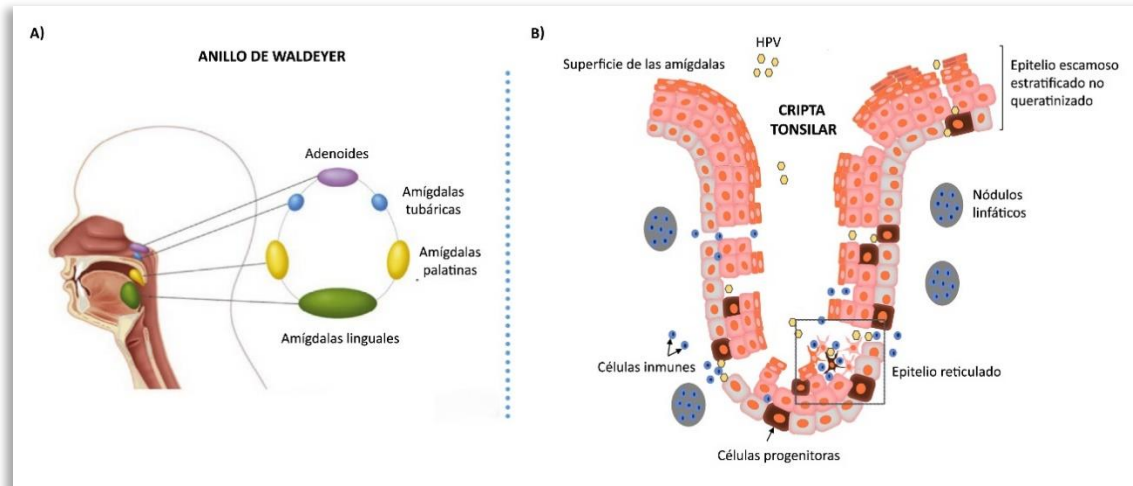


Figura 1. Sitios más comunes donde se desarrolla el CECyC-VPV(+). A) Los sitios anatómicos con mayor incidencia de infección por VPV son las amígdalas palatinas y linguales que se encuentran en el anillo de Waldeyer. B) Esquema del epitelio de las amígdalas que destaca la diferencia en el epitelio que recubre la superficie de la amígdala (escamoso estratificado no queratinizado) y la cripta (reticulado estratificado). La región enmarcada muestra los queratinocitos típicos del epitelio reticulado de la cripta, con procesos largos y delgados. Los espacios intercelulares se llenan con linfocitos infiltrados. Modificado de: [35,36].

Generalmente la transición entre el CECyC- VPV(+) y el epitelio de la superficie adyacente tiende a ser abrupta; es decir, no se presentan zonas de lesiones precursoras epiteliales. A medida que estos carcinomas se infiltran, tienden a invadir como láminas, lóbulos o cintas de células. La necrosis central dentro de los lóbulos tumorales en expansión, que a veces da lugar a la degeneración quística, es un hallazgo frecuente. El crecimiento invasivo a menudo no provoca una fuerte reacción desmoplásica del estroma; en cambio, los nidos tumorales a menudo están rodeados por una zona de células linfoides. El grado en que estas células linfoides impregnan los lóbulos tumorales como linfocitos infiltrantes de tumores (TILS) es muy variable y cuando son numerosos el CECyC-VPV(+) puede adquirir una apariencia “linfoepitelial” [10].

A nivel citológico, las células tumorales muestran núcleos hiper cromáticos, citoplasma sincitial, sin puentes intercelulares y carecen de queratinización citoplasmática significativa. Estas características celulares pueden generar una apariencia basaloide no queratinizante. En las metástasis de ganglios linfáticos, la presencia de degeneración quística es un hallazgo común que a veces parece recapitular la formación de criptas amigdalinas. Los CECyC-VPV(+) se consideran tumores bien diferenciados ya que a menudo conservan la apariencia del epitelio reticulado del que surgen. Paralelamente, aunque se ha encontrado que los tumores VPV(+)

generalmente se diagnostican con un tamaño de 2 a 4 cm (T1-T2), con frecuencia hay una gran afectación ganglionar (N+) y, en consecuencia, la mayoría de los pacientes con CECyC-VPH(+) son diagnosticados en etapas clínicas avanzadas (Etapa III-IV) [5,9,10,12,14,18,21,30,34].

4.3. Perfiles moleculares

Se han identificado distintos perfiles moleculares para el CECyC-VPH(+) en comparación con sus homólogos VPH(-). Entre las diferencias se incluyen el perfil mutacional, los perfiles de expresión génica y la metilación global del ADN [5,7,26,30,32].

En la actualidad no existe un consenso bien establecido sobre si la tasa de mutación es diferente entre los tumores VPH-AR(+) y VPH-AR(-), mientras que algunos autores indican que la tasa de mutación es significativamente mayor en los VPH-AR(-), otros estudios reportan que existe una diferencia en el perfil de aberración genómica y no en la tasa de mutación entre ambos grupos, de acuerdo con esta conjetura se ha observado que entre los tumores VPH-AR negativos son más frecuentes las transversiones en los sitios CpG, que generalmente están asociadas con la exposición al tabaco. Por otro lado, en los tumores relacionados a la infección con VPH-AR, el predominio de transiciones TpC ha sido significativo [1,6,11,21,24,29,30].

Los perfiles moleculares de ambos subgrupos se resumen en la figura 2 y se describen a continuación.

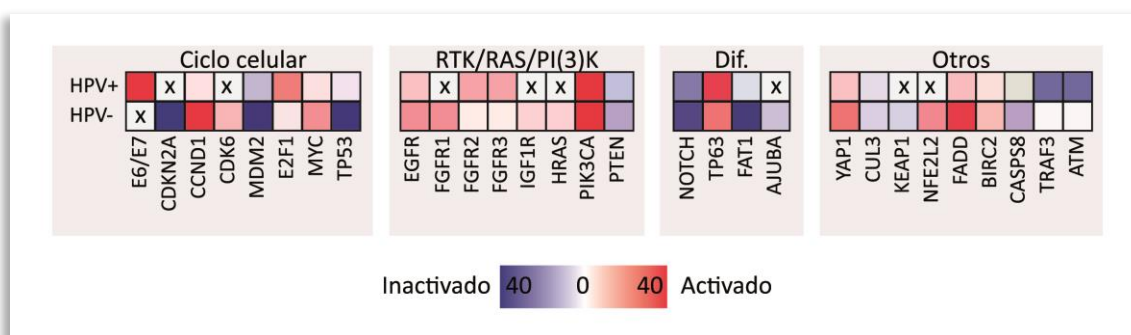


Figura 2. Perfil genómico de los CECyC. Alteraciones genéticas encontradas en los CECyC-VPH(+) y VPH(-). Dif: diferenciación; RTK: receptores tirosina quinasa. Modificado de: [5].

4.3.1. Perfil molecular CECyC-VPH(-)

La alteración de la vía de señalización del ciclo celular y del gen supresor de tumores TP53 es una característica distintiva de los CECyC-VPH(-). Las mutaciones que son funcionalmente

disruptivas, principalmente dentro del dominio de unión al ADN, representan el 75% de todas las mutaciones en el gen TP53 [1,5,7,11,20,21,29,37].

En muchos de los tumores VPH-AR(-) en los que TP53 es de tipo WT (Wild Type, sin mutar), la función de p53 puede ser inactivada por otros mecanismos como la sobreexpresión de MDM2 (Mouse 9érvix minute 2 homolog), que regula la degradación proteasómica de p53; así como mediante la supresión de 14/ARF que es el regulador negativo de MDM2. 14/ARF es una proteína producto del marco abierto de lectura alternativo del gen CDKN2A (inhibidor 2^a de quinasa dependiente de ciclina). El gen CDKN2A también codifica dos isoformas de la proteína p16 encargada de controlar la progresión del ciclo celular de la etapa G1 a S, lo cual logra al desintegrar el complejo de Cdk4/6 (quinasa dependiente de ciclina) y CCND1 (ciclina D1), cuya función es fosforilar al supresor de tumores pRB (proteína de retinoblastoma) que finalmente libera al factor de transcripción E2F. A su vez, E2F promueve la expresión del gen CDKN2A. El gen CDKN2A se inactiva con frecuencia en los CECyC-VPH(-) por metilación o deleciones homocigotas de la banda cromosómica 9p21-22, pero rara vez por mutación. Otro de los genes implicados en la regulación del ciclo celular y alterado en el CECyC-VPH(-) es el gen CCND1, que se ha visto amplificado con frecuencia [1,5,6,7,11,20,21,24,37].

Una segunda vía dirigida por mutaciones múltiples conductoras es la vía de señalización de receptores tirosina quinasa (RTK). Se alteran numerosos genes, incluidas las amplificaciones focales o mutaciones activadoras en EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1), IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 receptor) y HRAS (Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog) [1,5,21,24].

Con respecto a la vía de diferenciación celular, dos genes se encuentran inactivados por mutaciones sin sentido en los tumores VPH(-), AJUBA y FAT1 (FAT Atypical Cadherin 1). Ambos genes están vinculados a la vía de señalización NOTCH/CTNNB1 (β -catenina) como reguladores negativos. La proteína de andamiaje AJUBA también se ha implicado en las interacciones con AURKA (Aurora-A quinasa), un regulador crítico de la mitosis. FAT1 es un miembro de la familia de proteínas similares a la cadherina y se ha descrito como un supresor del crecimiento de células cancerosas basado en la unión y antagonización de CTNNB1 [1,5].

También se han identificado alteraciones en las vías de respuesta al estrés oxidativo, específicamente en CUL3 (E3 ubiquitin ligase), KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y NFE2L2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2). KEAP1 forma complejos con CUL3 para poliubiquitinar a NFE2L2; de este modo, la interrupción por mutaciones inactivadoras de la función canónica KEAP1-CUL3, promueve la actividad de NFE2L2 como factor de transcripción que regula los genes antioxidantes [1,5,29].

Finalmente, se han detectado coamplificaciones de las regiones cromosómicas 11q13 y 11q22 que albergan genes implicados en las vías de apoptosis. Dentro de la región 11q22 se encuentran las secuencias de codificación para BIRC2 (Baculoviral IAP repeat-containing protein 2) y YAP1 (yes-associated protein 1). BIRC2 es miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis. Funcionalmente, BIRC2 inhibe la actividad de las caspasas, incluida la actividad de CASP8, y se ha demostrado que BIRC2 juega un papel importante en la ubiquitinación y degradación de TRAF3 (TNF Receptor Associated Factor 3), un regulador negativo de la actividad de NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). BIRC2 y YAP1 se encuentran activados con mayor frecuencia en CECyC-VPH(-), mientras que CASP8 se observa como inactivado por mutaciones o deleciones homocigóticas. La amplificación de la región 11q13 incluye la región que codifica el gen FADD (Fas Associated Via Death Domain). Es importante destacar que FADD se ha implicado en el aumento de la metástasis de los ganglios linfáticos en CECyC [1,5,21].

4.3.2. Perfil molecular CECyC-VPH(+)

Las mutaciones TpC predominantes en los tumores transformados por el virus VPH-AR se han asociado con un aumento en la mutagenesis de la citosina desaminasa que es característica de la familia de enzimas APOBEC (enzimas catalíticas de la enzima editora de ARNm de apolipoproteína B). Esta es una clase de enzimas de edición que cambian la citosina en uracilo por desaminación, hipermutando e inactivando el ADN viral y son un componente de la inmunidad innata. El reemplazo del uracilo comúnmente resulta en una mutación a timina o guanina. La importancia de esta firma de mutación particular es que puede explicar, en parte, un patrón en la distribución de mutaciones de uno de los oncogenes clave del CECyC, PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha), entre los tumores

positivos y negativos para el VPH [20,24]. Dicha distribución se explica en el apartado de alteraciones compartidas.

La diferencia fundamental en el perfil molecular de los CECyC-VPH(+) radica en la expresión de los genes virales E6 y E7. Se considera que E6 es una oncoproteína ya que está estrechamente relacionada con la transformación e inmortalización celular a través de su interacción con diversas proteínas celulares. Su función más estudiada es la inhibición de la actividad apoptótica del supresor de tumores p53. Para lo cual E6 es capaz de conducirlo a su degradación por la vía proteosómica por medio de la formación de un complejo con la ubiquitina ligasa del hospedero E6AP (E6 associated protein). Análogamente, E7 se considera una oncoproteína ya que induce la degradación proteosómica de los supresores de tumores de la familia pRB, mediante su asociación con el complejo cullina 2-ubiquitina-ligasa, favoreciendo de este modo la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S [5,11,20,21,24].

Debido a que las oncoproteínas virales ejercen su función sobre la desregulación del ciclo celular, se producen muy pocas alteraciones en los reguladores de ciclo celular adicionales; de este modo, las mutaciones disruptivas en TP53, la sobreexpresión de CCND1 o la inactivación de CDKN2A son eventos que ocurren raramente. De hecho, la sobreexpresión de p16, impulsada por la degradación de Rb por E7, es el biomarcador sustituto más utilizado para la detección por IHC (inmunohistoquímica) de la infección por VPH transcripcionalmente activa. Alternativamente, se ha demostrado que la regulación positiva de p16 también puede ocurrir como una respuesta celular a la infección en sí misma, a través de la inducción de las desmetilasas específicas de la histona 3 lisina-27 (H3K27), KDM6A y KDM6B [5-7,11,20,26,30].

El único regulador del ciclo celular que se altera predominantemente en casos de tumores VPH(+) es el factor de transcripción E2F1, que es activado mediante la amplificación focal del cromosoma 20q11 [1,5,24].

En lo que respecta a los RTK se han encontrado mutaciones o eventos de fusión génica en los receptores FGFR2 y 3 en los CECyC-VPH(+). Las mutaciones FGFR2 incluyeron N569D y N569K, mientras que las fusiones de FGFR2 se presentaron con la proteína TACC3 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3), que es crítica para la nucleación de microtúbulos en el centrosoma. La actividad quinasa constitutiva del oncogén FGFR3-TACC3 induce pérdida de

fidelidad mitótica y conduce a aneuploidía. Por otra parte, las mutaciones FGFR3 incluyeron seis mutaciones S249C y una mutación K413N [1,5,29].

Entre las alteraciones moleculares relacionadas con la transformación viral del VPH se encuentra la pérdida de función del factor TRAF3, ya sea por mutaciones disruptivas o por deleciones homocigóticas del gen. Este factor está involucrado principalmente en la respuesta inmune antiviral innata y adquirida y se ha observado que cuando se sobreexpresa actúa como un supresor tumoral; por el contrario, su pérdida promueve la señalización aberrante de NF- κ B dando como resultado final el incremento de la proliferación celular. La señalización aberrante de NF κ B también se vincula con mutaciones en el gen CYLD (Lysine 63 Deubiquitinase) reportadas en tumores VPH(+) [1,5,20,21,24,29].

Entre otras alteraciones moleculares, los CECyC-VPH(+) se distinguen por las pérdidas del cromosoma 11q y consecuentemente del gen ATM (ataxia-telangiectasia mutated), implicado en la reparación del ADN y por las mutaciones en el gen DDX3X (DEAD-Box Helicase 3 X-Linked) que codifica una helicasa de ARN (Ácido ribonucleico) dependiente de ATP (adenosina trifosfato) y puede potenciar la actividad de β -catenina mediante la transactivación del promotor [20,24,29].

Finalmente, la metilación aberrante del ADN en las islas CpG es otra de las características distintivas de los tumores VPH(+). Los análisis comparativos revelaron regiones hipermetiladas específicas que promueven la expresión de CDKN2A, GATA4, GRIA4 (Glutamate receptor 4) e IRX4 (Iroquois Homeobox 4), mientras que los genes ALDH1A2 (Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2) y OSR2 (odd-skipped-related 2) se encontraron con menor grado de metilación [5,6].

Un mecanismo propuesto para la metilación diferencial en este subtipo de tumores es la desregulación de la ADN metiltransferasa (DNMT), ya que hay mayor expresión de la proteína, probablemente a partir de las oncoproteínas virales E6 y E7. Adicionalmente E7 puede regular a la histona metiltransferasa EZH2 [10].

4.3.3. Alteraciones moleculares compartidas

Ciertas modificaciones genéticas son altamente concordantes en la mayor parte del genoma para todos los casos de CECyC independientemente del estado del VPH; de este modo, son

frecuentes las alteraciones en el número de copias (CNA) y una de las regiones amplificadas con mayor frecuencia está en el cromosoma 3q que incluye a la proteína PIK3CA y los factores de transcripción TP63 (Tumor Protein P63) y SOX2 (SRY-Box Transcription Factor 2) [1,5,6,21,29].

Funcionalmente, PIK3CA cataliza la producción del segundo mensajero lipídico PIP3 (phosphatidylinositol-3) a partir de PIP2 que actúa como una molécula central de transducción de señales que regula diversos procesos celulares como la fosforilación de AKT1. PIK3CA es uno de los genes comúnmente activados en los CECyC tanto por la amplificación de la región cromosómica 3q como por mutaciones activadoras. Aunque PIK3CA está alterado ambos subtipos de CeyC, en los tumores asociados con el virus ocurren predominantemente dos mutaciones específicas de C>T en dos puntos dentro del dominio helicoidal. Esto da como resultado sustituciones de aminoácidos E542K y E545K que están implicadas en la activación de la quinasa PIK3CA y se ha sugerido que son consecuencia de la alta actividad de APOBEC. Por el contrario, en los tumores negativos para el VPH-AR, las mutaciones de PIK3CA se diseminan por todo el gen. Se ha demostrado que PIK3CA mutado atenúa las señales apoptóticas y promueve la invasión tumoral al regular la propagación de la señal de múltiples fuentes de entrada, incluidos muchos de los RTK y promoviendo también la actividad de la ciclina D. Uno de los reguladores negativos de PIK3CA es PTEN (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase), este regulador está sujeto a una pérdida frecuente de heterocigosidad en CECyC [1,5,11,20,24,29,37].

Las amplificaciones adicionales que se encuentran en ambos subtipos de tumores incluyen los cromosomas 5p y 8q, en el 5p se localiza TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) y en el 8q el oncogén MYC. Las deleciones comúnmente vistas cubren de manera prominente partes del cromosoma 3p y 8p, afectando a dos genes supresores de tumores: FHIT (fragile histidine triad protein) (en el 3p) y CSMD1 (CUB and Sushi multiple domains-1) (en el 8p) [5].

Otro gen comúnmente alterado en el CECyC es NOTCH1 que codifica una quinasa transmembrana frecuentemente inactivada por mutaciones disruptivas. La función de la vía NOTCH es complicada y depende de la organización general de la red de señalización más amplia y del tipo de tejido específico. En los CECyC se implicó a NOTCH1 como un supresor tumoral ya que las mutaciones inactivadoras están relacionadas con el incremento en la señalización oncogénica de CTNNB1. Otra característica importante de NOTCH1 es su

participación en la regulación negativa recíproca con p63, un miembro de la familia p53 que se encuentra amplificado con frecuencia en el CECyC. Es de destacar que p63 se activa transcripcionalmente por dos promotores distintos; las dos isoformas resultantes de p63 son funcionalmente distintas, Δ Np63 actúa como un regulador negativo dominante de p53 y Tap63 inhibe el arresto del ciclo celular y la apoptosis. La isoforma Δ Np63 está altamente expresada en CECyC y, de hecho, es la que inhibe la actividad NOTCH1 [1,5].

La identificación de mutaciones sin sentido en el gen FAT1 en muestras de CECyC sugiere que puede funcionar como un supresor tumoral. Esta proteína es miembro de la superfamilia de proteínas cadherina de la membrana celular que han demostrado funciones en el establecimiento de la polaridad celular y median los contactos célula-célula, se podría predecir que la pérdida de FAT1 permitiría el rompimiento de las adherencias que normalmente restringen el crecimiento y/o la migración de las células [37].

Aunque se han descubierto muchas otras mutaciones en el CECyC, merecen una especial mención las mutaciones en los genes NSD1 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1), MLL2 (histone H3 lysine 4 (H3K4) mono-methyltransferase) y MLL3 que codifican metiltransferasas de histonas que participan en la remodelación de la cromatina [29,37].

4.4. Sistema inmune

El CECyC-VPH(+) posee un perfil inmunológico diferente debido a su inducción por la infección viral que puede detectarse como un antígeno y mejorar la respuesta del sistema inmunitario contra el tumor [27,28].

La respuesta inmune a una infección involucra las respuestas inmunes innatas (fagocitos, proteínas solubles) y adaptativas (anticuerpos, células efectoras citotóxicas). La respuesta inmune innata detecta patógenos y actúa como la primera línea de defensa. No tiene memoria específica, pero puede activar el sistema inmunológico adaptativo, que posteriormente puede desencadenar una respuesta específica a un patógeno en particular [28].

La función de la inmunidad adaptativa en el desarrollo de la neoplasia es controvertido y probablemente doble. Diferentes estudios apoyan firmemente la actividad de la inmunidad adaptativa en la prevención de la carcinogénesis y la inhibición de la progresión tumoral ya que se ha demostrado que los TILS inhiben el crecimiento tumoral y se asocian con un mejor

pronóstico. Sin embargo, las células inmunes también pueden liberar mediadores inflamatorios con proangiogénicos y efectos prometastáticos, y se sabe que la inflamación crónica impulsa la progresión neoplásica [28].

En el caso de la infección por VPH, aunque se han encontrado en el epitelio orofaríngeo células T específicas para el virus (células T colaboradoras CD4+ tipo 1 y tipo 2, células T reguladoras y células T CD8+) y anticuerpos séricos contra las proteínas del VPH que podrían producir una respuesta antitumoral, también se ha observado que la respuesta inmune es generalmente limitada. La razón principal de este efecto es que el virus infecta las células epiteliales basales, que están protegidas de las células inmunes circulantes durante las etapas iniciales de la infección. Además, el ciclo de vida del VPH no es lítico, por lo que no se produce la respuesta inmunitaria típica observada tras la muerte celular como resultado de la inflamación. El ADN del VPH solo se amplifica lo suficiente hasta un nivel en el que el virus y sus proteínas pueden ser detectados por las células de vigilancia inmunitaria del huésped en los queratinocitos suprabasales, de modo que solo se puede generar una respuesta inmunitaria funcionalmente activa durante las últimas etapas de la infección [27,28,30].

Paralelamente, el VPH interfiere con la vigilancia inmune mediante una serie de mecanismos, como: obstaculizar la migración y activación de células de Langerhans, suprimir la respuesta del interferón (IFN), interferir con la presentación de antígeno mediada por HLA clase 1 (Human leukocyte antigen -1) y la sobreexpresión de los receptores co-inhibitorios CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) y PD-1 (Programmed cell death protein 1) que modulan la respuesta de los linfocitos T citotóxicos y, en el contexto de las neoplasias, estos receptores inducen tolerancia patológica [5,6,7,27,28,38].

4.5. Pronóstico

Probablemente la característica más interesante de los CECyC-VPH(+) es que se ha demostrado, en múltiples ensayos clínicos retrospectivos y prospectivos, que aunque comúnmente se presentan con enfermedad ganglionar avanzada tienen un pronóstico favorable general definido por mejor supervivencia global (53-72%), supervivencia específica a 5 años (70-80%) y menor riesgo de recurrencia (49%), asociado a una mejor respuesta a la terapia en cualquier modalidad [2,8,10,15,18,23-27,30-34,39,40].

La ventaja pronóstica de los tumores de CECyC inducidos por el virus se podría atribuir a la población de pacientes afectada, con menos comorbilidades, menor edad y menor exposición al tabaco. Sin embargo, el mejor pronóstico de la patología prevalece en los análisis multivariados con ajustes para la edad, sexo, morfología, estadio tumoral y el subtipo histológico, por lo que la diferencia en la supervivencia parece radicar en la positividad tumoral al VPH. Si bien el estado positivo para el VPH confiere buen pronóstico, los pacientes que tienen antecedentes de tabaquismo concomitantes tienen pronóstico menos favorable, así como una mayor carga mutacional [18,23,28,29,30].

Las razones biológicas subyacentes a estas diferencias en la supervivencia aún no se han dilucidado; no obstante, se han presentado diversas hipótesis que incluyen: la ausencia de alteraciones genéticas generalizadas asociadas con el tabaquismo (es decir, cancerización de campo), la vigilancia inmune a antígenos tumorales específicos del virus, una respuesta apoptótica intacta a la radiación y la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales [30,33,39].

5. Virus del papiloma humano

El VPH es un virus estrictamente epiteliotrópico que se transmite por contacto sexual e incrementa el riesgo de desarrollo de neoplasias al infectar los queratinocitos de las capas basales del epitelio replicándose paralelamente a la diferenciación epitelial. Estos virus están conformados por ADN de doble cadena circular localizado dentro de una cápside con geometría icosaédrica de aproximadamente 55 nm [6,10,11,18,21,41-43].

Dependiendo de las homologías en las secuencias del gen L1, se clasifican taxonómicamente dentro de la familia *Papillomaviridae*, que agrupa a 16 géneros con más de 200 genotipos. De entre ellos, aproximadamente 40 se asocian a infecciones en el tracto ano-genital y oral, que de acuerdo a la actividad transformante de sus oncoproteínas 12 de ellos se consideran de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) para la progresión neoplásica y 12 de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89) que se asocian principalmente a verrugas genitales benignas y otras lesiones no malignas, como la papilomatosis respiratoria y la hiperplasia epitelial [7,11,15,18,27,30,40,42,44,45].

Pese a la gran diversidad de genotipos de VPH, se ha reportado que el genotipo 16 está asociado al 90-95% de los casos de CECyC-VPH(+) [7,12,19,22,23,25,27,28,30,34,46].

5.1. Genoma del VPH

El genoma viral tiene una longitud aproximada de 8kb que para su estudio se ha dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) que regula la expresión y replicación génica, la región de genes estructurales de la cápside de expresión tardía (L1 y L2) y la región de genes de expresión temprana que dan lugar a proteínas con funciones importantes como la replicación viral (E1 y E2), la liberación de viriones (E4) y la transformación e inmortalización celular (E5, E6, E7) (Fig. 3) [7,11,15,34,41-44,47-49].

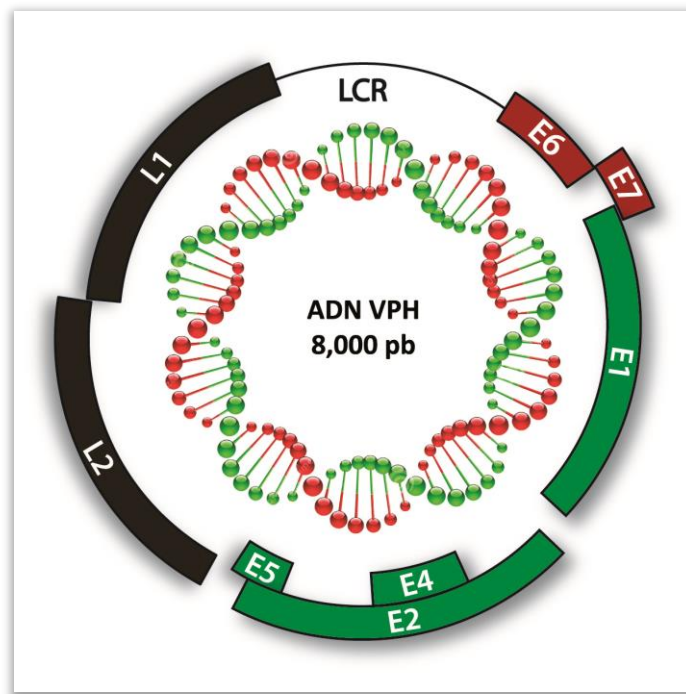


Figura 3. Esquema de la organización del genoma circular del VPH, dividido en región larga de control, genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6, E7) y la región de genes estructurales (L1, L2).

La función de cada proteína se resume en la siguiente tabla:

Tabla 2. Función de las proteínas del VPH [34]

Proteína	Función
L1	Proteína estructural principal, involucrada en la internalización del virus, comprende el 80% de la cápside.
L2	Proteína de cápside involucrada en la internalización del virus y transporte del ADN en el núcleo de la célula hospedera.
E1	Actividad de unión a ADN y Helicasa hexamérica 3' → 5' dependiente de ATP
E2	Factor de transcripción viral, se une a E1 para facilitar la iniciación del desenrollamiento del ADN viral y la replicación. Además actúa como represor transcripcional de la expresión de los oncogenes E6 y E7.
E4	Facilita la liberación del virión ya que causa el colapso de los filamentos de queratina, además induce el arresto del ciclo celular en la fase G/M
E5	Sobreexpresa los receptores de los factores de crecimiento y altera la expresión del MHC (major histocompatibility complex) clase II
E6	Conduce a la degradación proteosómica de p53 y coopera con E7 para inducir la proliferación y transformación celular
E7	Se une a la proteína del retinoblastoma y activa el factor de transcripción E2F, desregula el punto de control G1/S y coopera con E6 para inducir la proliferación y transformación celular

5.2. Ciclo viral

El ciclo de vida viral del VPH está estrechamente relacionado con la diferenciación de las células epiteliales del huésped. Los nuevos viriones se pueden sintetizar sólo después de que una de las células hijas infectadas se haya diferenciado tras la mitosis ya que los genomas del VPH no codifican las enzimas necesarias para la replicación viral. Los VPH, por lo tanto, dependen de la maquinaria de la célula huésped para perpetuar la producción de la progenie viral. Las proteínas codificadas por VPH interrumpen múltiples vías de señalización celular para mantener las células infectadas en un estado proliferativo que facilita la persistencia y replicación viral [10,11]. El mecanismo a través del cual el VPH ingresa a un queratinocito comienza cuando el virión se une a los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) ubicados en la superficie celular de los queratinocitos. El VPH también se une a la ciclofilina B, lo que aumenta la exposición del extremo N-terminal de la proteína de la cápside L2 del VPH y, posteriormente, expone los sitios de escisión de furina que conducen al procesamiento proteolítico por la convertasa de furina en la superficie celular. La escisión de L2 permite que el virus se una a su receptor específico, el heterotetramero anexina A2 que finalmente permite la internalización del VPH. Además, es

probable que un receptor secundario separado o un co-receptor también puedan estar involucrados en la internalización del virus ya que la unión del VPH a HSPG por sí sola no es suficiente para la endocitosis viral. Se ha sugerido que la integrina $\alpha 6\beta 4$ puede actuar como un receptor secundario, cuya unión provoca cambios conformacionales que permiten la endocitosis del virión. Tradicionalmente, se han propuesto dos vías típicas de endocitosis para la absorción del VPH, las vías mediadas por clatrina y caveolina y recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo dependiente de actina. Una vez que el virus ha ingresado a la célula a través de la vía endosómica, se requieren varias horas de exposición a pH bajo para la disociación parcial de las proteínas de la cápside viral. Una vez que se ha liberado el ADN viral unido a L2 de los endosomas tardíos, L2 media el transporte de material genético viral a lo largo de los microtúbulos citoplasmáticos al núcleo mediante la formación de complejos de dineína. En este punto, el ADN viral del VPH está presente como una partícula episomal o extracromosómica y se mantiene en número bajo de copias (de 50 a 100 copias por célula) en los núcleos de las células basales infectadas para expresar genes virales tempranos [11,34,42].

Los genomas virales se replican posteriormente en sincronía con la replicación del ADN celular. La proteína E2 actúa como factor iniciador para formar un complejo heterodímero con E1, dicho complejo se une al origen de la replicación viral y participa en el reclutamiento de polimerasas y proteínas accesorias celulares que modulan la replicación del ADN. Adicionalmente, E2 participa en la represión transcripcional de los oncogenes virales E6 y E7 [11,39,42,44].

El genoma del VPH puede permanecer como partícula episomal, integrarse al genoma de la célula huésped o ambas. En los CECyC-VPH(+) la linealización y la integración del genoma circular del virus parece ocurrir durante las etapas avanzadas de la progresión tumoral y en algunos casos no se presenta la integración, lo que indica que no es un paso necesario para la carcinogénesis. Sin embargo, podría tener una función relevante en el crecimiento del tumor. Se cree que la integración del VPH es aleatoria en todo el genoma del huésped, con una predilección por los sitios frágiles cromosómicos comunes, éstos son regiones de ADN que se replican tarde, con una estructura de cromatina suelta. Adicionalmente, el proceso de integración puede ser promovido por diferentes mecanismos; por ejemplo, disminución de la actividad de la maquinaria de reparación del ADN, estrés de replicación, modificaciones epigenéticas, inflamación o el EO. El resultado final de la integración es la mutagénesis

insercional que puede alterar los genes supresores de tumores o activar protooncogenes [1,2,5,12,24,34,38,39,45,50].

Con respecto al genoma viral, la integración ocurre con una ruptura en el marco de lectura abierto del gen E2 que libera a los oncogenes E6 y E7 de la represión transcripcional y conduce a su sobreexpresión y la consecuente transformación celular [11,12,28,34,39].

Tanto E6 como E7 interfieren con vías supresoras de tumores bien establecidas, llevando a una alteración del control del ciclo celular y una deficiencia en la reparación del ADN. Se considera que E6 es una oncoproteína ya que está estrechamente relacionada con la transformación e inmortalización celular a través de su interacción con diversas proteínas. Su función más estudiada es la inhibición del control del ciclo celular y de la actividad apoptótica del supresor de tumores p53, donde E6 es capaz de conducirlo a su degradación por la vía proteosómica por medio de la formación de un complejo con la ubiquitina ligasa del hospedero E6AP, lo que promueve la progresión del ciclo celular a la fase S. Análogamente, el complejo E6/E6AP puede degradar a NFX1-91, un represor de la subunidad catalítica de hTERT de la telomerasa celular, promoviendo de este modo la inmortalización de las células epiteliales (Fig. 4) [6,8,10,11,12,15,18,19,34,42].

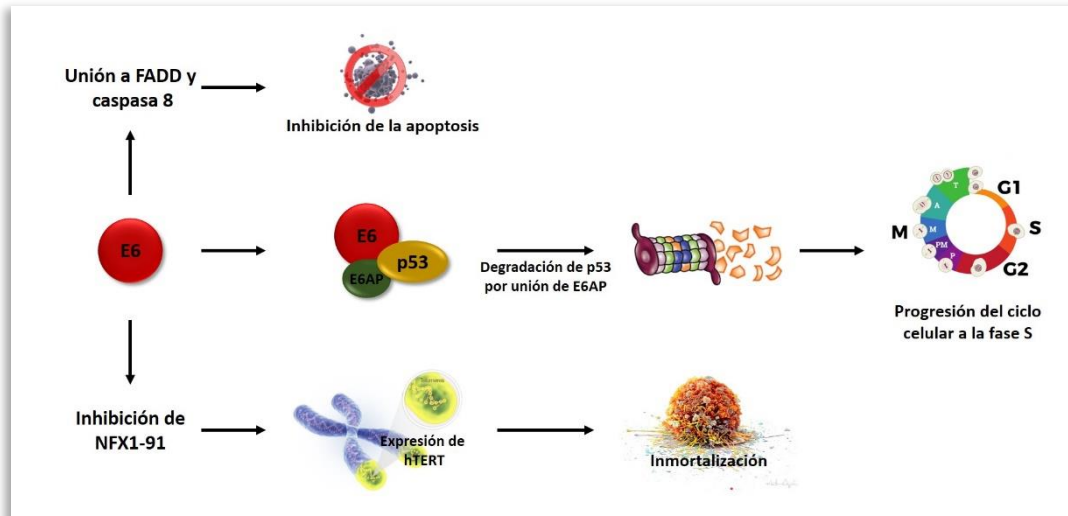


Figura 4. Funciones más estudiadas de la oncoproteína E6 del VPH. Inhibición de a la apoptosis, progresión del ciclo celular a través de la inhibición de p53 e inmortalización celular por la expresión de hTERT.

Adicionalmente, la proteína E6 tiene la capacidad de interactuar con la vía de la apoptosis extrínseca al unirse a moléculas de señalización clave, como FADD y la CASP8, aumentando su degradación y como resultado final, se suprime la activación de las caspasas 8, 3 y 2, lo que permite que las células infectadas por VPH eviten la eliminación a través de la apoptosis (Fig. 4). Paralelamente, la proteína del complejo E6/AP a través de su dominio de unión E6-PDZ interactúa con varias proteínas que contienen dominios PDZ y se dirige a la degradación proteolítica. Actualmente, el papel biológico real de estas proteínas en la infección/transformación viral no está claro, pero incluyen proteínas oncosupresoras potenciales, proteínas de unión estrecha, guanilato quinasa asociadas a la membrana y proteínas de mantenimiento de la polaridad [41].

Se ha informado que la proteína E6 activa o inhibe muchos objetivos celulares adicionales, algunos de los cuales incluyen, la tirosina quinasa BLK (B lymphocyte kinase) que estimula la mitosis, la oncoproteína MYC, el factor IRF3 (factor regulador de interferón 3) y la proteína XRCC1 (X-Ray Repair Cross Complementing 1) [11,42].

Cabe mencionar que en los VPH de bajo riesgo, los genes E6 y E7 se transcriben a partir de dos promotores independientes, mientras que en los VPH de alto riesgo esos genes se transcriben como un único pre-ARNm policistrónico. Una característica común de los VPH de alto riesgo es

que el ARNm policistrónico E6/E7 contiene al menos un sitio de empalme donante y un aceptor que puede desencadenar el proceso de empalme alternativo, induciendo la expresión de una variedad de isoformas de E6. Las isoformas más abundantes son E6*I y E6*II de 6 kDa cada una. La transcripción de E6 completa da lugar a una proteína de 16-19 kDa que es la responsable de formar un complejo con la proteína E6AP [19,51].

Las oncoproteínas E7 del VPH tienen un efecto complementario a las oncoproteínas E6 al inducir la degradación proteosómica de los supresores de tumores de la familia pRB, y sus proteínas asociadas p107 y p130, que controlan la progresión del ciclo celular. Al degradar a la proteína pRB se favorece la liberación del factor de transcripción E2F y la consecuente expresión de genes que dirigen la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. Esta inactivación funcional de pRB da como resultado la sobreexpresión del inhibidor de ciclinas p16, mediante un mecanismo de control de retroalimentación. Así mismo, E7 incrementa la proliferación celular mediante la inactivación de los inhibidores de los complejos de ciclina-cinasa p21 y p27 aumentando los niveles de las ciclinas A y E. (Fig. 5) [6,8,10-12,15,18,34,41].

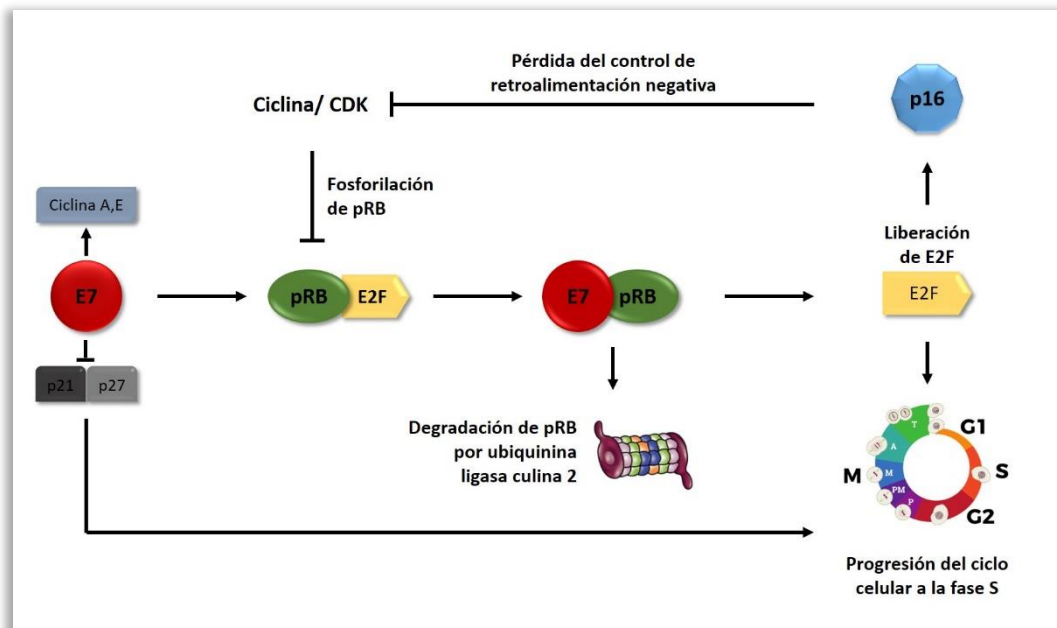


Figura 5. Mecanismo por el cual la oncoproteína E7 induce la progresión del ciclo celular

Normalmente, en tales condiciones, se induce la apoptosis mediada por p53, pero como se mencionó anteriormente, E6 inhibe esta función [42]. Similar a E6, hay varios blancos celulares

adicionales de E7, algunos de los cuales incluyen el factor de transcripción JUN, las proteínas de unión a caja TATA y las histonas desacetilasas (HDAC) [11].

También se ha observado un efecto aditivo entre los oncogenes E6 y E7, se ha informado que ambas oncoproteínas cooperan para inducir la acumulación de centrosomas anormales, incluida la segregación cromosómica errónea, el desarrollo de aneuploidía y, eventualmente, la inestabilidad cromosómica [11,41].

El oncogén viral E5 promueve aún más la actividad transformadora del VPH. Tiene una actividad transformadora limitada *per se*; sin embargo, es capaz de potenciar la actividad de los principales oncogenes E6 y E7 a través de varios mecanismos que actúan principalmente durante las primeras etapas de la transformación viral. Los mecanismos activados por E5 incluyen la transducción de señales mediada por EGFR y las vías descendentes de Ras-Raf-MAP quinasa o PI3K-Akt, así como también la inhibición de las moléculas de MHC clase II y la consecuente disminución del reconocimiento inmunológico [41].

Estas pocas acciones básicas de los oncogenes virales E5, E6 y E7 representan un paisaje celular propicio para la acumulación de daño genético y el desarrollo del cáncer. Sin embargo, cabe señalar que representan solo una pequeña parte de las muchas funciones de estos oncogenes virales. De hecho, las proteínas del VPH son dispositivos multifuncionales muy sofisticados. Son capaces de interactuar con un gran número de funciones y factores celulares, y de este modo contribuir a la transformación celular [41].

En la etapa de diferenciación se lleva a cabo la finalización del ciclo viral, en dicho proceso el genoma viral se replica en un número de copias más alto (al menos 1000 copias por célula), las proteínas de la cápside se expresan, los viriones se ensamblan y finalmente se desprenden. La proteína E4 se ha asociado con el colapso de las citoqueratinas durante la liberación del virión [34,44,45,52].

6. Tratamiento para el CECyC

Entre las opciones de tratamiento para el CECyC se encuentran la resección quirúrgica, la radioterapia (fraccionada, acelerada o de intensidad modulada) y la quimioterapia adyuvante. La elección del tratamiento depende varios factores que incluyen la ubicación, estado funcional del paciente y estadio en el que se diagnostica; en cualquier caso, el objetivo primario del

tratamiento es la preservación de la estructura y función debido a la importancia de los órganos involucrados [4,5,9,10,14,15,25,28,29].

En general, los tumores en estadios tempranos se tratan con cirugía y radioterapia en caso de que se detecten márgenes de cirugía positivos; mientras que los casos más avanzados requieren una terapia multimodal que combina cirugía, radiación y quimioterapia [5,9,25].

A pesar de que los CECyC-VPH(+) se asocian con mejor respuesta a la terapia, el estándar de atención ofrece los mismos enfoques de tratamiento a los pacientes independientemente del estado del VPH. Por lo que actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos centrados en la desintensificación terapéutica en pacientes con tumores VPH(+) en un esfuerzo por preservar los excelentes resultados clínicos minimizando al mismo tiempo la toxicidad aguda y a largo plazo. Dichas modificaciones al tratamiento para el CECyC-VPH(+) comprenden: reducción de la dosis total de radioterapia, uso de radioterapia sola u optimizada con la modificación de la hipoxia tumoral, reemplazar la quimioterapia convencional con terapia dirigida y/o inmunoterapia y la integración de la cirugía robótica transoral mínimamente invasiva (TORS) [2,5,7,15,18,20,28].

El objetivo principal de la desintensificación terapéutica es mejorar la calidad de vida sin detrimento en la respuesta al tratamiento, para lograrlo es importante la comprensión de las características biológicas que subyacen a los CECyC-VPH(+) en respuesta a la terapia [7,9,18,34].

7. Radioterapia

La radioterapia utiliza partículas de alta energía o RI para eliminar a las células con altas tasas de proliferación, como lo son las células neoplásicas, ocasionando el menor daño posible a las células adyacentes [10,14,49,53-56].

La mayoría de las aplicaciones en sistemas biológicos involucran rayos X o rayos γ , dos formas de radiación electromagnética. La designación de rayos X o rayos γ refleja la forma en que se producen ya que no difieren en su naturaleza o en sus propiedades. Los rayos X se producen extranuclearmente; mientras que los rayos gamma se producen intranuclearmente. En términos prácticos, esto significa que los rayos X se producen en un dispositivo eléctrico que acelera los electrones a alta energía y luego los detiene abruptamente en un objetivo generalmente hecho de tungsteno u oro. Parte de la energía cinética de los electrones se

convierte en rayos X. Por otro lado, los rayos γ son emitidos por isótopos radiactivos; representan el exceso de energía que se emite cuando el núcleo inestable se rompe y decae en sus esfuerzos por alcanzar una forma estable [53].

La absorción de energía de la radiación en el material biológico puede provocar excitación o ionización. La elevación de un electrón en un átomo o molécula a un nivel de energía más alto sin expulsión real del electrón se llama excitación. Si la radiación tiene suficiente energía para expulsar uno o más electrones orbitales del átomo o molécula, el proceso se llama ionización, y se dice que esa radiación es RI. La característica importante de la RI es la liberación localizada de grandes cantidades de energía. La energía disipada por evento ionizante es de aproximadamente 33 eV, que es más que suficiente para romper un enlace químico fuerte [53].

El efecto básico de la RI es dañar las secuencias de ADN de manera directa o indirecta (Fig. 6.) De forma directa, la radioterapia puede ocasionar el cambio o pérdida de una base, la interrupción de los enlaces de hidrógeno, rompimientos de una cadena (SSB, acrónimo inglés de single strand break) o de doble cadena (DSB, acrónimo inglés de double strand break) o el entrecruzamiento de las cadenas de ADN [10,14,33,54-57].

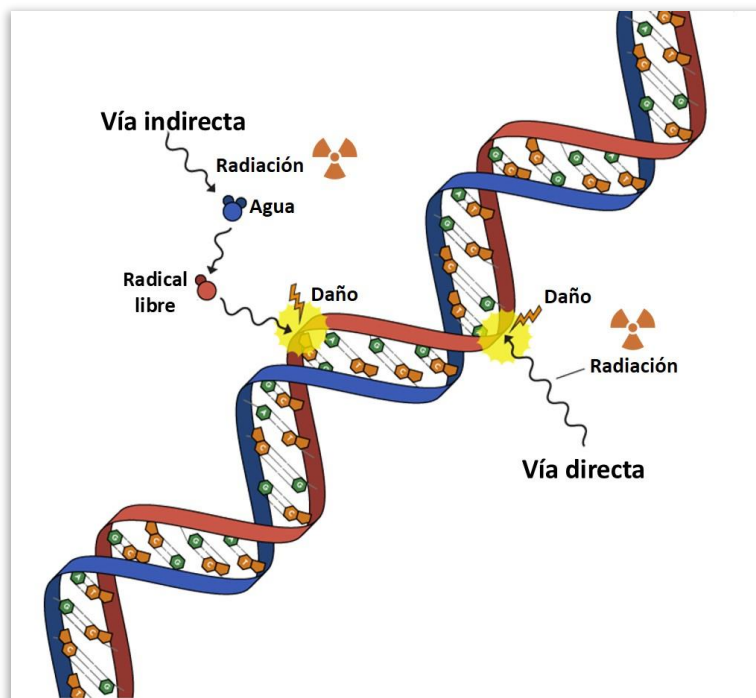
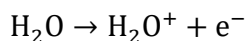


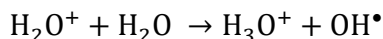
Figura 6. Daño ocasionado en el ADN por la radiación ionizante. Modificado de: [58].

Los rompimientos de doble cadena son los causantes fundamentales de la muerte celular ya que para la célula es muy difícil repararlos. Como consecuencia de estas alteraciones se pueden producir aberraciones cromosómicas, tales como: translocaciones, deleciones y cromosomas con centrómeros duplicados o sin ellos [53,56].

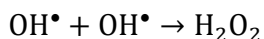
Las células cancerosas tienen mayor probabilidad de sufrir este tipo de daños ya que generalmente tienen mayores tasas de proliferación y se encuentran en mayor proporción en la fase M del ciclo celular. En dicha fase, todos los cromosomas se condensan y se ubican en medio del núcleo para formar un objetivo más grande. Además, todos los mecanismos de reparación del ADN se encuentran desactivados, por lo que las células pueden perder grandes fragmentos de información genética y cualquier lesión quedará fija. Por el contrario, durante la fase S, los mecanismos de reparación del ADN se activan y los cromosomas se disponen de forma dispersa en el núcleo, lo que permite que las células de la fase S sean las más resistentes a la radiación [10]. Por otro lado, de manera indirecta, la radiación ionizante genera radicales libres a través de la radiolisis del agua [14,55-56]. La molécula de agua puede ionizarse como resultado de la interacción con un fotón de rayos x o rayos γ [53]. Esto puede expresarse como:



El H_2O^+ es un radical iónico. Un ion es un átomo o molécula que tiene carga eléctrica porque ha perdido un electrón. Un radical libre contiene un electrón no apareado en la capa externa, lo que lo hace altamente reactivo. H_2O^+ está cargado y tiene un electrón no apareado; en consecuencia, es tanto un ion como un radical libre. Los radicales iónicos primarios tienen una vida útil extremadamente corta, del orden de 10^{-10} segundos. Se descomponen para formar radicales libres, que no están cargados pero aún tienen un electrón no apareado. En el caso del agua, el radical iónico reacciona con otra molécula de agua para formar el radical hidroxilo altamente reactivo (OH^\bullet):



El radical hidroxilo es un poderoso oxidante altamente reactivo y puede difundirse a corta distancia para alcanzar un objetivo crítico en una célula. Además, si la ionización es localmente elevada tenderá a autoasociarse formando el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [53].



Los radicales libres son especies altamente reactivas debido a la presencia de electrones no apareados en su capa de valencia más externa, se consideran dentro de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés reactive oxygen and nitrogen species) y son capaces de generar OE [54,55].

Estas moléculas inestables causan aductos en el ADN y rompimientos en la secuencia además de causar ionización de otras macromoléculas biológicamente esenciales como los lípidos, los carbohidratos y las proteínas [14,54,55,59].

A nivel celular, la respuesta a la radiación puede manifestarse en cambios irreversibles, como mutaciones, transformación maligna, desarrollo de formas celulares anormales y la muerte de las células, o como pequeñas alteraciones estructurales y funcionales reversibles de los sistemas biológicos. Tanto el daño irreversible como el reversible de las células se manifiestan a nivel subcelular como cambios estructurales y funcionales en los organelos celulares, incluida la membrana plasmática, los contactos intercelulares, las membranas nucleares, el complejo de Golgi, las mitocondrias, el retículo endoplásmico, los lisosomas, el sistema citoesquelético, etc [10,59].

La muerte celular puede ser la consecuencia final de la lesión por radiación ionizante y se ha clasificado previamente en dos clases principales, en función del tiempo de desintegración de las células después de la exposición, es decir, en muerte interfásica y muerte reproductiva o mitótica. La muerte por interfase se define como un deterioro irreversible del metabolismo celular y la descomposición de las estructuras celulares antes de entrar en la primera mitosis después de la irradiación. La muerte reproductiva o mitótica ocurre durante la mitosis y una o incluso varias divisiones después de la irradiación. Tanto la muerte interfásica como la reproductiva pueden manifestarse a través de la activación de diferentes vías como apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, autofagia y senescencia [49,54,56,57,59,60].

Las dosis de RI se expresa en grays (Gy), que equivale a la energía absorbida por una cantidad de materia dada ($1 \text{ Gy} = 1\text{J/Kg}$). Sin embargo, dosis iguales de diferentes tipos de radiación no producen los mismos efectos biológicos. La dosis total de radiación varía en función de la indicación terapéutica y se caracteriza por dos parámetros: el fraccionamiento y la exposición. El fraccionamiento corresponde al número total de sesiones de radioterapia y la duración de la

exposición se define como el tiempo que existe entre el primero y el último día de tratamiento. Para los CECyC generalmente se administra una dosis fraccionada de 2 Gy en 30 sesiones para una dosis total de 60-66 Gy. Los pacientes con tumores no resecables reciben radioterapia con dosis más altas de 70-72 Gy [53,55].

8. Estrés oxidativo

Las células presentan una respuesta bifásica dependiente de la dosis (conocida como hormesis) a las ROS. En concentraciones fisiológicas, estos metabolitos son utilizados como mensajeros secundarios de señalización que regulan diferentes procesos celulares como la diferenciación, proliferación, autofagia, supervivencia y la defensa inmunitaria contra agentes infecciosos. Sin embargo, en altas concentraciones pueden inducir EO irreversible en el cual se genera daño en proteínas, peroxidación de lípidos y daño en el ADN. Finalmente, si la célula no es capaz de neutralizar el daño mediante mecanismos antioxidantes, se presenta la muerte por apoptosis o necrosis y en casos excepcionales, cáncer (Fig. 7) [42,45,52,54,61-65].

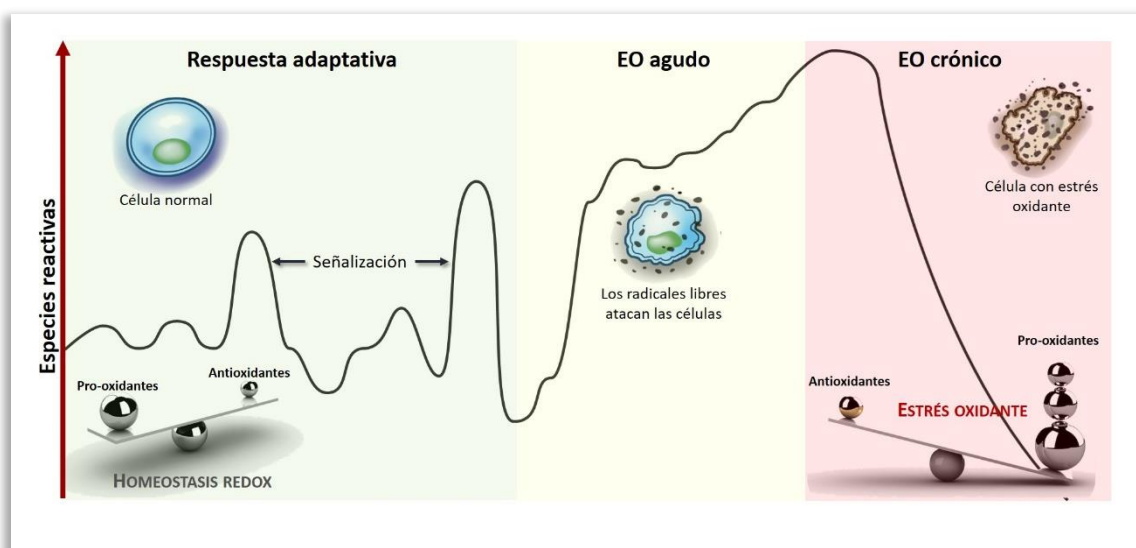


Figura 7. Respuesta celular al incremento de especies reactivas de oxígeno. Las concentraciones fisiológicas de ROS se utilizan como mensajeros secundarios de señalización que después se reducen por la actividad de los mecanismos antioxidantes. Si la célula no es capaz de neutralizar las ROS se presenta el EO agudo y finalmente el EO crónico que induce la muerte celular.

8.1. Formación de especies reactivas de oxígeno

Las ROS son productos del metabolismo celular normal. El delicado equilibrio entre los efectos beneficiosos y nocivos de las ROS es un aspecto muy importante de los organismos vivos y se

logra mediante mecanismos denominados “homeostasis redox”. Las ROS se generan constantemente en las células aeróbicas por la reducción univalente del O_2 molecular a H_2O durante la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Las principales fuentes extramitocondriales de ROS son el retículo endoplásmico, los peroxisomas, la NADPH oxidasa (NOX) y los lisosomas (Fig. 8). Además, las ROS también se generan durante una serie de procesos como inflamación, infecciones, reacciones inmunes, tensiones mecánicas y químicas, y exposición a RI [42,52,61,63,65-67].

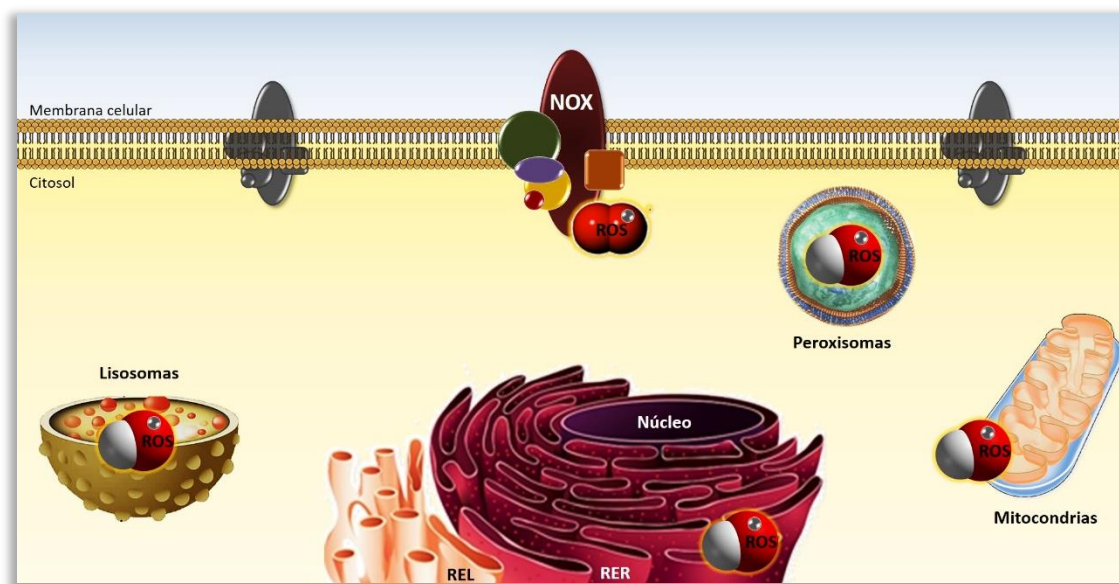


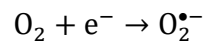
Figura 8. Sitios donde se forman las ROS en las células: mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico, lisosomas y NOX.

Las especies reactivas de oxígeno son aquellas especies que pueden ser o no radicales libres y que son más reactivas que el oxígeno molecular debido a que contienen oxígeno reducido incompletamente o con una distribución electrónica diferente. Todos los radicales libres son ROS pero no todas las ROS son radicales libres [42].

Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de especies de radicales generadas en los sistemas vivos, en menor cantidad también se producen las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que del mismo modo son capaces de generar estrés nitrosativo. La óxido nítrico sintasa (NOS) produce óxido nítrico (NO^*), que puede reaccionar con el radical ion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para producir peroxinitrito ($ONOO^-$) una especie altamente reactiva con efecto tóxico [42,45,52,63].

El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es en sí mismo un diradical ya que tiene un electrón en cada uno de sus dos orbitales antiunión. En su estado basal de energía (más estable) se encuentra con los electrones que forman el enlace (p), antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja [45,66].

La reducción de un solo electrón (e^-) del oxígeno molecular genera el $O_2^{\bullet-}$, según la siguiente reacción [63,66]:



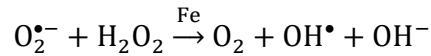
Los sistemas vivos aeróbicos utilizan el O_2 como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria en las mitocondrias para producir energía en forma de ATP. En este proceso, se produce una fuga de electrones en los complejos I y III que puede reducir al oxígeno al anión superóxido. Las mitocondrias son capaces de evitar el daño ocasionado por la fuga de electrones a través de la reducción tetravalente del oxígeno a H_2O mediante el complejo IV. El anión superóxido también se produce en el citosol mediante las enzimas NOX y XO (xantina oxidasa) [42,52,63,64-66,68].

Aunque el $O_2^{\bullet-}$ tiene el potencial de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas, su contribución directa al daño celular es escasa, debido a su velocidad limitada de difusión fuera de la mitocondria y su reactividad comparativamente baja. No obstante, el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de sostener otras reacciones celulares generando ROS extremadamente potentes responsables de la mayor parte de su toxicidad [63,66].

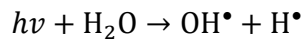
El estado redox de la célula está relacionado en gran medida con un par redox de hierro (y cobre) y se mantiene dentro de estrictos límites fisiológicos. Se ha sugerido que la regulación del hierro asegura que no haya hierro intracelular libre; sin embargo, se ha demostrado que en condiciones de estrés el superóxido libera hierro de las enzimas que contienen grupos 4Fe-4S. El Fe^{2+} liberado puede generar el radical hidroxilo altamente reactivo a través de la reacción de Fenton [63,66]:



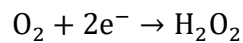
El radical superóxido también participa en la reacción de Haber-Weiss en la que se produce el radical hidroxilo [63,66]:



El radical hidroxilo, OH^\bullet , es la forma neutra del ion hidróxido. El radical hidroxilo es la especie oxidante más fuerte, reacciona con casi todas las moléculas biológicas con velocidades cercanas al límite de difusión teórico. Da lugar a reacciones de extracción de hidrógeno, adición de hidroxilo y transferencia de electrones. El radical hidroxilo también se forma por la radiolisis del agua según la reacción [63,66]:



El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno que no es radical, se genera por la reducción divalente del O_2 y la protonación durante el transporte de electrones [63]:



Asimismo, el consumo de oxígeno en el peroxisoma conduce a la producción de H_2O_2 , que posteriormente se utiliza para oxidar una variedad de moléculas. El peróxido de hidrógeno tiene una reactividad intermedia y una alta capacidad de difusión. Está implicado en la oxidación de los grupos tiol de las proteínas, que puede inducir la proliferación celular cuando se oxidan proteínas como los receptores del factor de crecimiento (GFR) [50,63,66].

Los radicales reactivos adicionales derivados del oxígeno que se pueden formar en los sistemas vivos son los radicales peroxilo (ROO^\bullet). El radical peroxilo más simple es HOO^\bullet , que es la forma protonada del superóxido y normalmente se denomina radical hidroperoxilo o radical perhidroxilo. Se ha demostrado que el radical perhidroxilo inicia la peroxidación de los ácidos grasos [66].

La inflamación es el primer paso de la defensa inmunitaria del huésped contra varios estímulos dañinos; es un mecanismo de inmunidad innata, con importante función en la inmunovigilancia. El proceso comienza con el reclutamiento de células inmunes que migran al sitio de la inflamación. Cuando estas células se exponen a un estímulo tienen la capacidad de reconocer la partícula extraña y dan paso a la liberación masiva de ROS. Esta reacción es conocida como estallido respiratorio y se liberan especies como $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^\bullet y ácido hipocloroso (HClO) a niveles muy por encima del umbral tóxico. La inflamación crónica está relacionada con la sobreproducción de ROS y al aumentar de los niveles de prostaglandinas, que a su vez inducen

la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Estas citoquinas proinflamatorias son entonces responsables de aumentar la producción de estos radicales libres a través de vías de señalización mediadas por proteínas quinasas [42,63,66].

8.2. Daño oxidativo

En altas concentraciones, las ROS pueden ser importantes mediadores del daño a ácidos nucleicos, lípidos y proteínas [64,66].

En el ADN se ha observado que las ROS causan SSB, DSB, bases de nucleótidos dañadas o sitios abásicos y enlaces cruzados con otras moléculas. En la actualidad, se han informado más de 100 lesiones en el ADN inducidas por oxidación. De entre ellas las lesiones más estudiadas son la formación de 8-hidroxiguanosina (8-OH-G) y 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) ya que se forman con relativa facilidad y son altamente mutagénicas. Estas alteraciones conducen a la producción de mutaciones por transversión (G – T) que se han observado en protooncogenes y genes supresores de tumores, lo que indica que el daño al ADN mediado por ROS puede contribuir a la carcinogénesis [42,52,63,66].

El radical hidroxilo puede reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN y es la principal causa de aductos oxidativos. Este radical también está implicado en el daño a otros componentes celulares que involucran residuos de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos que son extremadamente sensibles a la oxidación. Los principales derivados de la peroxidación lipídica son el hidroxinonal (HNE), el crotonaldehído y el malondialdehído (MDA). Estos productos, por interacción directa con el ADN, generan una serie de eteno-aductos en los ácidos nucleicos. Además, conducen a la formación de entrecruzamiento de ADN-ADN y ADN-proteínas, lo que provoca rompimientos, reordenamientos cromosómicos y grandes aberraciones estructurales [42,63,66].

Las proteínas son susceptibles a la oxidación por radicales libres formando grupos carbonilo. Los mecanismos relacionados a la oxidación de proteínas por ROS involucran a las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos de las proteínas, en particular los residuos de cisteína y metionina que contienen un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral, que al ser oxidado puede conducir a la formación de puentes disulfuro (S-S) y al plegamiento aberrante de las

proteínas. Las modificaciones oxidativas de las proteínas aumentan su susceptibilidad a la digestión proteolítica ejecutada principalmente por los proteosomas [42,55,63,66].

Los niveles elevados de ROS por encima del umbral de muerte inducen la apoptosis activando la vía apoptótica intrínseca y promueven la ruptura de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c. El citocromo c, a su vez, facilita la activación de las vías apoptóticas tanto dependientes de caspasa como independientes de caspasa [45].

8.3. Señalización REDOX

El término señalización redox se utiliza para describir un proceso regulador en el que la señal se envía a través de reacciones redox. La señalización redox requiere que el estado estacionario del “equilibrio redox” sea alterado por un aumento en la formación de ROS o una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes. El aumento regulado de ROS conduce a un desequilibrio temporal que representa la base fisiológica de la regulación redox. Por tanto, la demostración fisiológica de la regulación redox implica un cambio temporal del estado redox intracelular hacia condiciones más oxidantes. Sin embargo, en condiciones patológicas, concentraciones anormalmente grandes de ROS pueden provocar cambios permanentes en la transducción de señales y la expresión génica. Generalmente, un entorno reductor en la célula estimula la proliferación y un ligero cambio hacia un entorno ligeramente oxidante inicia la diferenciación celular. Un cambio adicional hacia un entorno más oxidante en la célula conduce a la apoptosis y necrosis. Mientras que la apoptosis es inducida por estímulos oxidantes moderados, la necrosis es inducida por un efecto oxidante intenso [66].

Estudios recientes indican que en una célula con EO bajo, p53 induce la expresión de genes antioxidantes, mientras que en EO severo, concentraciones altas de p53 promueven la expresión de genes que contribuyen a la formación de ROS y apoptosis. La familia p53 comúnmente regula positivamente al menos dos proteínas que participan en la apoptosis mediada por ROS: ferredoxina reductasa (FDXR) y REDD1/HIF-1. Además p53 induce la expresión de p85, que puede funcionar como una molécula de señalización durante la apoptosis dependiente de p53 mediada por ROS [66].

8.4. Sistema antioxidante

Los niveles de ROS fisiológicos se mantienen mediante mecanismos antioxidantes que pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión transferasa (GST), peroxiredoxina (Prxs) y tiorredoxina reductasa (TrxR). Mientras que las moléculas antioxidantes incluyen el glutatión (GSH), nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH), vitamina C, E y ácidos lipóicos, entre otros [42,45,49,55,61,62,64,66].

El establecimiento de las respuestas antioxidantes celulares debe ser rápida y eficiente para neutralizar los efectos oxidantes potenciales. Un mecanismo inicial en respuesta al aumento de ROS es la activación de factores transcripcionales como el factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) y el FoXO (forkhead box O), que inducen la expresión de enzimas antioxidantes y de las enzimas asociadas con la producción de GSH [52,55,68].

8.4.1. NRF2

El EO puede inducir la activación de diferentes factores de transcripción asociados a la respuesta antioxidante, entre los cuales Nrf2 es uno de los más estudiados. Este factor pertenece a un grupo de la subfamilia cap "n" collar (CNC) de los factores de transcripción de la región básica de la cremallera de leucina (bZip). En células no estimuladas el factor Nrf2 se mantiene en el citosol unido a su regulador negativo KEAP1 y posteriormente la ubiquitina ligasa culina 3 lo marca para su degradación proteosómica. El EO induce la oxidación de los grupos tioles de KEAP1 permitiendo la disociación del complejo Nrf2-KEAP1. Una vez liberado Nrf2 migra al núcleo donde se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) aumentando la expresión de proteínas antioxidantes como GCLM (Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit), GST, GPx, HO-1 (Hemoxygenasa-1), CAT, SOD, TRX, Prxs entre otras (Fig. 9) [29,45,50,55,61,69].

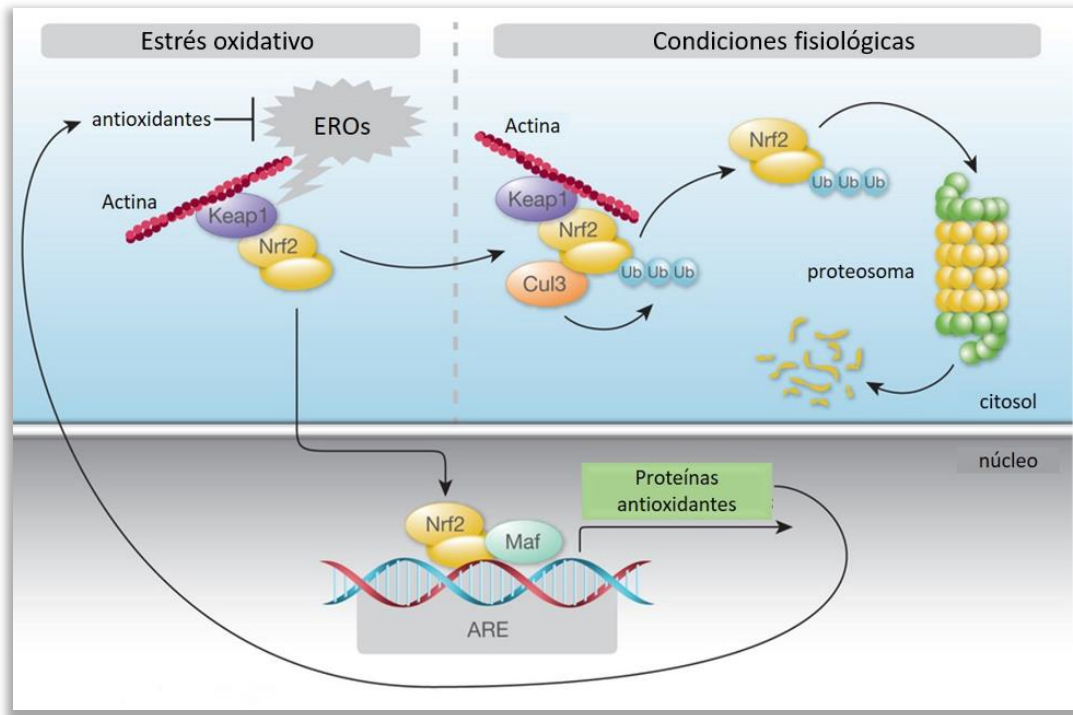


Figura 9. Activación del factor de transcripción Nrf2. En condiciones fisiológicas Nrf2 se encuentra unido a su regulador negativo Keap1 y posteriormente cul3 lo conduce a su degradación proteosómica. En condiciones de estrés oxidativo se libera Nrf2 por la oxidación de Keap1. Adicionalmente, keap 1 se puede disociar de los filamentos de actina y desestabilizar su unión a Nrf2. Modificado de: [70].

Nrf2 puede activarse mediante otros procesos que incluyen la inhibición de la actividad de Keap1 por mecanismos como la represión epigenética, su desplazamiento por las proteínas p62 o p21 y su disociación de los filamentos de actina que desestabiliza su unión con Nrf2. Otro mecanismo alternativo para la activación de Nrf2 es a través de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de serinas o treoninas por diferentes quinasas celulares, incluyendo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa C (PKC), c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y señal extracelular-quinasas reguladas (ERK). La fosforilación de Nrf2 en la serina 40 permite su disociación de Keap1 y su translocación al núcleo [52].

8.4.2. GSH

El GSH es el principal antioxidante soluble y se encuentra en el citosol, el núcleo y las mitocondrias. Su presencia mitocondrial requiere su transporte a la membrana interna mediante proteínas antiporte ya que se sintetiza en el citosol. Su síntesis requiere la acción secuencial de la glutamato-cisteína ligasa y la glutatión sintetasa [55,64,66].

Las principales funciones del GSH son eliminar directamente el radical hidroxilo y neutralizar el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos actuando como un cofactor de la GPx. El GSH también es capaz de reestablecer las formas activas de las vitaminas C y E [55,62,64].

Una vez que el GSH neutraliza a las ROS se genera el disulfuro de glutatión que es la forma oxidada (GSSG). El GSH oxidado se acumula dentro de las células y la proporción de GSH/GSSG es una buena medida del EO de un organismo. Una concentración demasiado alta de GSSG puede dañar muchas enzimas de forma oxidativa, por lo que las altas proporciones de la forma sulfhidrilo se mantienen mediante la actividad de la glutatión reductasa que regenera el agente antioxidante catalizando la reducción de GSSG a GSH [55,62,64,66].

8.4.3. SOD

La familia de las superóxido dismutasas (SOD) representa la clase principal de enzimas antioxidantes. En las células eucariotas hay tres formas de SOD: la citosólica dimérica de cobre y zinc (Cu, ZnSOD o SOD1), la de manganeso (MnSOD o SOD2) y la extracelular Cu, ZnSOD (SOD3). La SOD1 se expresa de forma ubicua y se localiza en el citosol y en el espacio intermembrana de las mitocondrias, así como en el núcleo. Por el contrario, la SOD2 se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial [55,65,67,71].

La función de SOD es proporcionar un importante apoyo de defensa antioxidante contra las reactividades potencialmente dañinas del anión superóxido catalizando su dismutación en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno mediante la reacción metaloenzimática (Fig. 10) [55,64,65,67,71].

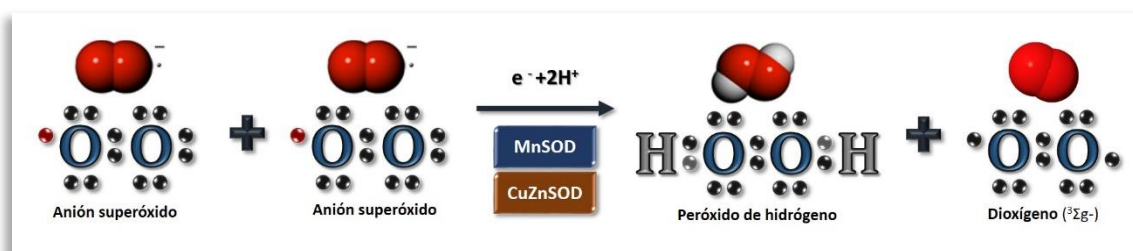


Figura 10. Reacción metaloenzimática de las proteínas SOD.

Después de la dismutación por SOD2, el peróxido de hidrógeno resultante es un ROS más estable en comparación con el $O_2^{\bullet -}$ y puede difundirse fácilmente por toda la célula, donde puede ser metabolizado por catalasas o peroxidasas [64,67,71].

8.4.4. Catalasa

La CAT es una enzima que consta de cuatro subunidades idénticas, incluida una región N-terminal para la reacción de catalasa, una región de barril beta para la estructura tridimensional, una región de conexión para unir grupos hemo y una región de hélice alfa para la unión de NADPH. La función principal de la CAT es catalizar la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y dióxígeno evitando así que se forme el radical hidroxilo y el oxígeno singulete, especies de oxígeno que son muy reactivas (Fig. 11) [55,62,65].

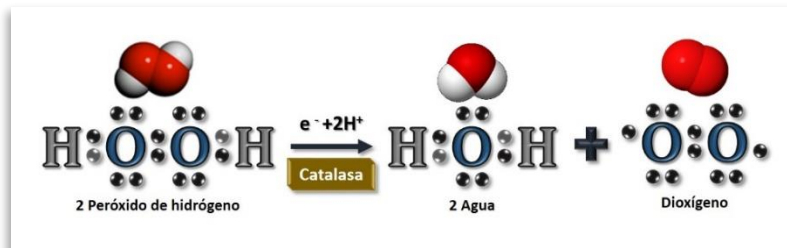


Figura 11. Reacción enzimática de la proteína catalasa

El mecanismo de reacción de la CAT se produce en dos pasos utilizando grupos hemo. La primera reacción es un proceso en el que el cofactor hemo reacciona con una sola molécula de H_2O_2 para producir un grupo hemo oxidativo (un radical catión oxoférril porfirina). En la segunda reacción, el radical catión oxoférril porfirina de la CAT reacciona rápidamente con la segunda molécula de H_2O_2 para producir subproductos de oxígeno y agua [55,62,65].



Al día de hoy, ha sido poco explorada la función del estado redox y del EO en el desarrollo de neoplasias asociadas a la infección con VPH-AR. En este sentido, en nuestro laboratorio se demostró la modulación diferencial del estado redox por las proteínas de expresión temprana E1, E2, E6 y E7 de los genotipos 16 y 18 del VPH en una línea celular de cáncer de 38érvix. En este estudio se observó que la oncoproteína E6 disminuye la relación GSH/GSSG y la actividad enzimática de la CAT, aumentando de este modo el daño al ADN mediado por ROS. En contraste, la oncoproteína E7 presentó el efecto contrario aumentando GSH, la actividad de CAT y su expresión, evitando el aumento de ROS y el daño al ADN. La co-expresión de ambas oncoproteínas neutralizaron los efectos observados de manera independiente para cada de las oncoproteínas, por lo cual se propuso un efecto antagónico entre E6 y E7 en la modulación del estado redox. Por su parte, la expresión combinada de las proteínas E1 y E2 disminuyen los niveles y la actividad de SOD1/2 y de la relación GSH/GSSG con el consecuente aumento del daño al ADN mediado por el aumento de ROS [72].

Con respecto al cáncer de cavidad oral, Williams y colaboradores evaluaron el estado redox en queratinocitos orales transfectados transitoriamente con los genes E6* y la forma completa de E6 del VPH-AR 16. E6* es una variante de E6 de menor tamaño generada por un proceso de corte y empalme alternativo. En este estudio observaron que la proteína E6* aumenta los niveles de ROS, disminuye la expresión de enzimas antioxidantes SOD2 y Gpx y aumenta el daño al ADN; sin embargo, este efecto no se observó con la forma completa de E6 [73]. Por otro lado, Marullo y colaboradores analizaron el estado redox en células de cáncer de laringe transfectadas con el gen bistrónico de E6 y E7. También observaron un aumento en los niveles de ROS y en el porcentaje de daño al ADN en presencia de las oncoproteínas [74]. Es importante señalar que en este estudio no se dilucidaron los efectos individuales de las oncoproteínas.

IV. JUSTIFICACIÓN



Aunque existe evidencia que los CECyC asociados a la infección con VPH-AR responden mejor al tratamiento con radiación aún no se conocen los mecanismos por los cuales se produce este efecto. En este sentido, es importante evaluar si las proteínas del VPH están asociadas a la disminución de la viabilidad de las células que son tratadas con RI y si este efecto se relaciona con el EO.

V. HIPÓTESIS



Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 inducen estrés oxidante en un modelo celular de CECyC mediante el cual se genera un alto índice de muerte celular en respuesta al tratamiento con radiación.

VI. OBJETIVOS



1. Objetivo general

Determinar si las proteínas E6 del VPH 16 y 18 generan EO y evaluar su efecto sobre la radiosensibilización en un modelo celular de CECyC.

2. Objetivos particulares

1. Obtención de células FaDu (carcinoma escamoso celular de faringe) que expresen de manera estable los plásmidos E6 del VPH 16 (FaDu-16E6) y VPH18 (FaDu-18E6) y el plásmido control p3X (FaDu-p3X).
2. Establecer la DI_{50} de la RI ($^{137}\text{Cesio}$) para la línea celular FaDu y cuantificar la fracción de supervivencia en las células transfectadas antes y después de la radioterapia.
3. Evaluar el estado redox de las células FaDu-16E6 y FaDu-18E6 *versus* FaDu-p3X sin tratamiento con RI.
4. Determinar la viabilidad celular y el daño al ADN en células FaDu-16E6 y FaDu-18E6 *versus* FaDu-p3X sin tratamiento con radiación.
5. Evaluar los niveles de las enzimas antioxidantes en las células FaDu transfectadas después del tratamiento con radiación.



1. Cultivo celular y transfecciones

Se realizó el cultivo de la línea celular FaDu (carcinoma escamoso celular de faringe) en medio EMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% de CO₂).

Para la obtención de células FaDu que expresen de manera estable los plásmidos con los genes de E6 de los VPH 16 y 18 se utilizaron los plásmidos que fueron construidos previamente en el laboratorio [75]. Estos plásmidos fueron clonados en el vector p3XFLAG-CMV-10. El plásmido p3XFLAG está constituido por los siguientes genes (Fig. 12):

- 3XFLAG: tres epítopes Asp-Tyr-Lys-Xaa-Xaa-Asp –N
- MCS: Sitio de clonación múltiple
- hGH poly A: poliadenilación y terminación AAUAAA
- origen SV40: promotor eucarionte usado para expresión general
- neo': Gen de resistencia a neomicina
- origen pBR322: Origen de replicación en procariontes
- amp': Gen de resistencia a ampicilina
- origen F1: Origen de replicación
- CMV: promotor eucarionte

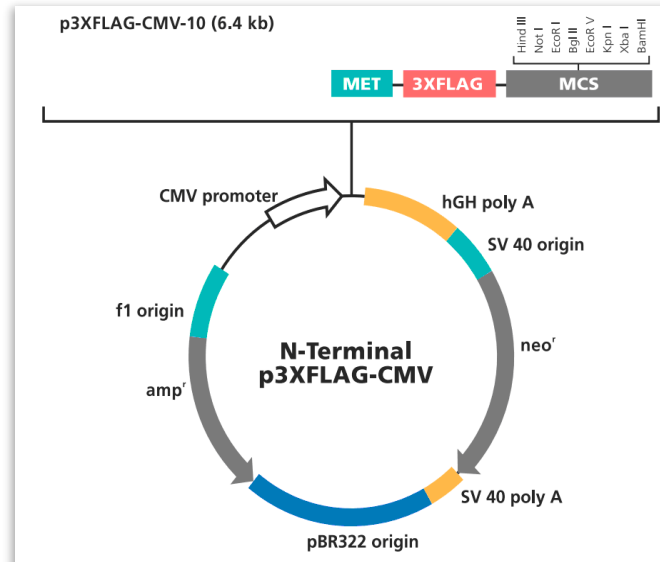


Figura 12. Vector p3XFLAG-CMV-10

La presencia del gen *neo'* permite la selección de las células que han sido transfectadas y contienen el plásmido de interés. Dicho gen confiere resistencia a la geneticina (G418), este antibiótico es un aminoglucósido que interrumpe la elongación de las proteínas al unirse al sitio A de la subunidad 60 de los ribosomas.

La transferencia artificial del plásmido en las células FaDu se efectuó mediante el método de lipofección utilizando el reactivo Polyfect (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el primer procedimiento se sembraron 7.5×10^4 células en una placa de cultivo de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas. Al concluir dicho lapso, se mezclaron 2.5 μg del plásmido y 2.5 μL del reactivo PolyFect en medio Optimem y se incubó por 30 minutos para permitir que se formen los complejos dendrímeros-ADN; se agregó la mezcla a las células y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se trataron durante 21 días con la DL_{90} de geneticina (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar las células transfectadas. Las colonias que crecieron en este medio de selección se diluyeron de manera seriada en una placa de 96 pozos para obtener una colonia que estuviera transfectada de manera estable la cual se mantuvo en condiciones de cultivo estándar. La presencia del plásmido de interés se evaluó mediante western blot (WB) con anti-FLAG M2 (1:2000), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).

2. RT-PCR

La evaluación de la presencia de los genes E6 del VPH-16 y 18 en las células transfectadas de manera estable se analizó mediante una RT-PCR. Para la extracción del RNA total de las células transfectadas se utilizó el kit Rneasy (Qiagen, Hilden, Alemania) atendiendo el siguiente procedimiento: Se cultivaron 300, 000 células en una placa de cultivo de 60 mm. Después de mantenerlas en cultivo por 48 horas se agregaron 350 μ L de la solución RLT, se disgregaron y se lisaron las células resuspendiendo 15 veces con una jeringa de 1 mL. Posteriormente, se mezcló el extracto con 350 μ L de etanol al 70% y se transfirió a una columna de intercambio iónico que se centrifugó a 10, 000 rpm por 15 segundos y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 μ L de la solución RPE y se centrifugó con las mismas condiciones. Nuevamente se añadieron 500 μ L de la solución RPE y se centrifugó por 2 minutos. Para retirar todos los restos de la columna se centrifugó por un minuto a 14, 000 rpm. Finalmente, se eluyó el RNA con 30-50 μ L de agua libre de RNAasas.

El RNA se incubó con 1 μ L de DNAsa del kit DNA-free Ambion para excluir el ADN. Se incubó por 30 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se agregó un volumen igual de inactivador de DNAsa y se incubó por 2 minutos a TA después de lo cual se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a TA y se rescató el sobrenadante. Una vez obtenido el RNA libre de ADN, se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro NanoPhotometer 1000V3.

La síntesis de ADN complementario (cADN) se llevó a cabo mediante retrotranscripción con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, California, EUA). Se elaboró una mezcla de reacción con los siguientes componentes y se amplificó el cADN en un termociclador con el siguiente programa:

Tabla 3. Mezcla de reacción y programa de amplificación para la obtención de cADN

Reactivo	Concentración	Cantidades		
RT buffer	10 X	2 μ L		
dNTP mix	25X (100 mM)	0.8 μ L		
RT Random primers	10 X	2 μ L		
MultiScribe Reverse Transcriptase	50 U/ μ L	1 μ L		
Rnase Inhibitor	20 U/ μ L.	1 μ L		
Agua libre de nucleasas	-	Aforar a 20 μ L		
RNA	400 ng			
Programa de amplificación				
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

La reacción de PCR de punto final se realizó con la siguiente mezcla de reacción y el siguiente programa de amplificación:

Tabla 4. Mezcla de reacción y programa de amplificación del gen E6-VPH-16 y 18

Reactivo	Cantidades
10 X buffer	2 μ L
dNTP	2 μ L
MgCl ₂	1.6 μ L
Oligo 5´	0.1 μ L
Oligo 3´	0.1 μ L
Taq polimerasa	0.15 μ L
Agua libre de nucleasas	Aforar a 20 μ L
cADN	1 μ L
Programa de amplificación	
Temperatura	Tiempo Ciclos
94°C	10 min 1
95°C	40 seg
65°C	40 seg
72 °C	40 seg
72 °C	7 min
4°C	∞ 1

En la siguiente tabla se enlistan los oligonucleótidos utilizados para la detección de los genes E6 del VPH-16 y 18, así como del gen 18S utilizado para evaluar la calidad del material genético.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Longitud (pb)	Tm (°C)	Longitud amplicón (pb)
E6 VPH-16 3'	GGGGGATCCATGTTTCAGGACCCACAGG	28	70	456
E6 VPH-16 5'	GGGGAATTCTTACAGCTGGGTTTCTCTAG	29	64.7	
E6 VPH-18 3'	TTATACTTGTGTTTCTCTGCGTCGTTG	27	62.1	501
E6 VPH-18 5'	ACCATGGGGCATCATCACCATCACCATG	28	68.8	
18S 3'	AACCCGTTGAACCCATT	17	53.5	149
18S 5'	CCATCCAATCGGTAGCG	17	54.7	

Una vez finalizados los ciclos de la amplificación, se procedió a analizar los amplicones mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v (Agarosa, Buffer TBE 1x). Para facilitar la visualización y la sedimentación de los productos se mezclaron alícuotas de 5 µL de los amplificados con 1 µL de solución de carga 6X y se depositaron en los pozos del gel. En el primer carril se colocaron 6 µL de marcador de peso molecular de 50 pb. Durante una hora se aplicó un voltaje de 80 Volts mediante una fuente de alimentación. Posteriormente se colocó el gel en un transiluminador con una lámpara de luz UV ($\lambda = 300$ nm) y se documentó con una cámara fotográfica.

3. Obtención de la DI_{50} de la radiación ionizante (^{137}Cs) mediante ensayos clonogénicos.

Para establecer la DI_{50} de la RI (^{137}Cs) para la línea celular FaDu, se cultivaron 4×10^5 células que se trataron con dosis de 0.75 a 8 Greys (Gy) de RI. Posteriormente, en frascos de cultivo de 25 mm^3 se colocaron diferentes cantidades de células dependiendo de la dosis con la que se trataron (tabla 6). Estas células se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo por 15 días.

Tabla 6. Número de células cultivadas en relación a la dosis de radiación

Dosis (Gy)	Células	Dosis (Gy)	Células
0	100, 200, 300	4	1400, 1500, 1600
0.75	300, 400, 500	5	1600, 1700, 1800
1	500, 600, 700	6	1900, 2000, 2100
1.5	700, 800, 900	7	2100, 2200, 2300
2	900, 1000, 1100	8	2300, 2400, 2500
3	1100, 1200, 1300		

Al finalizar este periodo se realizó la fijación con 10% de formaldehído y la tinción con cristal violeta. Se contaron, en una retícula de Wolffhuegel, las colonias con más de 100 células

(>1mm). Se realizaron los cálculos de la eficiencia de plaqueo (EP) mediante la siguiente ecuación:

$$EP = \frac{\text{Número de colonias contadas}}{\text{Número de células sembradas}} \times 100$$

Finalmente, se obtuvo la curva de la fracción de sobrevivencia que se ajustó al modelo lineal cuadrático para obtener la DI_{50}

4. Viabilidad celular

Con el fin de evaluar la viabilidad de las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 se cuantificó su actividad metabólica utilizando el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) complementado con PMS (metosulfato de fenazina) como intermediario redox (Promega, Madison, WI, USA). La reducción del MTS a una sal de tetrazolio origina un producto colorimétrico detectable espectrofotométricamente que representa una medida indirecta del número de células viables. En este ensayo se considera que la reducción del MTS se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular a la succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) transforman el MTS en sales de formazan. Para realizar este ensayo se sembraron 5×10^3 células en placas de 96 pozos, después de 24 hrs se incubaron con el reactivo MTS por 2 horas a 37°C. La absorbancia se cuantificó a $\lambda=490$ nm en el espectrofotómetro.

5. Determinación de los niveles intracelulares de ROS

La cantidad de ROS se midió usando la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE). Este compuesto se oxida en el citosol en presencia de oxidantes intracelulares como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) y peróxidos. Los productos resultantes son el etidio (E^+) y el 2-hidroxi-etidio (2-OH- E^+) que emiten una señal fluorescente. Así mismo, se analizó la presencia de ROS por el fluorocromo diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA). Al entrar a las células, se hidrolizan los grupos acetato del diacetato de diclorofluoresceína mediante las esterasas celulares y se convierte en diclorofluoresceína reducida, esta molécula en presencia de ROS se oxida a diclorofluoresceína que emite una señal fluorescente. Las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 se cultivaron en placas de 24 pozos por 24 horas. Después

se trataron con 10 μM de DHE y 10 μM de H_2DCFDA en DMEM F12 sin rojo fenol y se incubaron por 30 minutos a 37°C. Los datos cuantitativos de ROS y las imágenes celulares se obtuvieron a través del lector multimodo Cytation™ 5 Cell Imaging de Biotek (Winoosky, VT, EUA), la producción de ROS celular se visualizó y se midió en 16 campos diferentes en tres experimentos independientes. La sonda DHE se detectó con una excitación de 510 nm y una emisión de 590 nm y la sonda H_2DCFDA se detectó con una excitación de 490 nm y a una emisión de 527 nm.

6. Cuantificación de proteínas carboniladas

Los grupos carbonilo en las proteínas pueden ser introducidos en diferentes sitios y por medio de diferentes mecanismos. Por un lado, los grupos carbonilo de las proteínas se generan directamente por ataques oxidantes catalizados por un metal o por el radical hidroxilo (OH^\bullet) a las cadenas laterales de residuos de aminoácidos de prolina, arginina, lisina y treonina los cuales son oxidados a derivados de aldeídos o cetonas. Por otro lado, los productos generados durante la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal (4-HNE1), 2-propenal (acroleína) y el MDA reaccionan con los residuos de cisteína, histidina o lisina generando la adición de grupos aldeídos reactivos mediante la reacción denominada adición de Michael. Finalmente, grupos carbonilo reactivos pueden ser también generados por reacciones del grupo amino con azúcares reducidos o por la oxidación de sus productos de reacción (glicación/ glicoxidación) [76].

El método que se utilizó para la cuantificación del contenido de proteínas carboniladas es el que está basado en la unión covalente de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH2) a los grupos carbonilo formando una base de Schiff para dar lugar a 2,4-dinitrofenilhidrazona que puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima a 365- 375 nm. Para cuantificar las proteínas carboniladas los extractos celulares se mezclaron con 10 mM de DNPH2 por 1 hora. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con 20% de ácido tricloroacético y se lavaron cuatro veces con una mezcla de etanol-etil acetato (1:1 v/v). Finalmente, se solubilizaron en 6 M de clorhidrato de guanidina y se cuantificó la absorbancia a $\lambda=370$ nm.

7. Cuantificación de GSH y GSSG

Para evaluar el estado antioxidante se cuantificó el GSH y el GSSG mediante el método de reciclado enzimático: El GSH se oxida con el ácido 5',5'-Ditiobis-2-Nitrobenzoico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzónico (TNB) que es detectable a $\lambda=412$ nm. El TNB es reducido por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH a GSH que a su vez es oxidado por DTNB a TNB. La cantidad de GSH cuantificado representa el glutatión total (GSH+GSSG). Para obtener el contenido de GSSG se realizó un tratamiento previo con 2-vinilpiridina (2-VP) que se asocia covalentemente con el GSH y se usa para eliminar todo el GSH, dejando el GSSG como el único sustrato medible en el ensayo. El GSH se calculó restando los niveles de GSSG de los niveles de GSH total (GSH + GSSG). El procedimiento para medir la relación GSH/GSSG fue el siguiente: El extracto de las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 se diluyó en 120 μ l de amortiguador KPE (fosfato de potasio 0,1 M, EDTA disódico 5 mM, pH 7,5). Luego, se usaron dos muestras separadas de 20 μ L cada una para medir GSH total o GSSG (estas muestras se trataron previamente con 2-VP), se mezclaron con DTNB (2,5 mM) y GR (250 U/ml) y finalmente, se añadió β -NADPH y se cuantificó la absorbancia a $\lambda=412$ nm a intervalos de 60 segundos, durante 2 minutos. Las tasas de cambio en la absorbancia se compararán con los estándares GSH o GSSG.

8. Actividad enzimática antioxidante

La actividad de la SOD se evaluó por espectrofotometría a $\lambda=560$ nm utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) como indicador. El método está basado en la oxidación del NBT a formazan por el anión superóxido, el cual es generado por el sistema de reacción xantina- xantina oxidasa. La cantidad de proteína que disminuye al 50% del máximo la oxidación del NBT a formazan se definió como una unidad de actividad de SOD, que comprende la actividad de SOD1 y SOD2.

La actividad de la CAT se evaluó siguiendo la extinción espectrofotométrica del peróxido de hidrógeno debido a su degradación por la actividad de la CAT presente en la muestra. La actividad enzimática de la CAT se expresó como K/ mg de proteína [77].

9. Western blot

Se cultivaron 3×10^5 células en una placa de cultivo de 60 mm. Después de mantenerlas en cultivo por 24 horas se agregaron 200 μ L de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa, se rasparon y se lisó el extracto por pipeteo. A continuación se centrifugaron las muestras por 5 min a 13 000 rpm y se almacenó el sobrenadante a -20°C . Se realizó la cuantificación de proteínas por el ensayo de ácido bicinonínico (BCA). Posteriormente, se separaron 25 μ g de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) a un voltaje de 80 volts. La transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa se realizó aplicando un voltaje de 100 volts durante una hora y media. Dicha membrana se bloqueó con 7.5% de leche sin grasa por 1 hr a temperatura ambiente (TA). Después de lavar el buffer de bloqueo de la membrana tres veces con TBS-T, se incubó con el anticuerpo primario apropiado en agitación a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios se prepararon en solución TBS-T como se indica a continuación: anti-gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), anti-FLAG M2 (1:2000)(Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA), anti-SOD1 (1:1000), anti-SOD2 (1:1000), anti-catalasa (1:500) (Cell Signalling Technologies, Massachusetts, EUA), anti- γ H2AX (1:1000)(Abcam, Cambridge, UK), anti-H2AX (1:1000) (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA). Al término de la incubación se realizaron tres lavados con TBS-T y se incubaron por una hora a TA con el anticuerpo secundario de ratón o de conejo acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, se revelaron las membranas utilizando el reactivo Chemo Luminiscent (Merck Millipore, Billerica, MA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

10. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se muestran como la media \pm desviación estándar (DE). Se utilizaron las pruebas estadísticas ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey para determinar si existe cambio estadístico significativo de la condición experimental frente al control.



1. Obtención de la DI_{50} de la radiación ionizante (^{137}Cs).

Con el fin de evaluar el efecto del oncogen E6 del VPH 16 y 18 en células tratadas con RI (^{137}Cs), el primer procedimiento realizado fue la determinación de la DI_{50} en células FaDu sin transfectar. El valor de la DI_{50} indica la dosis de un inhibidor que se requiere para inducir la pérdida de la integridad reproductiva de una población de células eucarióticas en un 50%. Se utiliza como estándar para la evaluación de la citotoxicidad de células en cultivo [25,53,78].

En células FaDu se realizaron 3 ensayos clonogénicos independientes, en los cuales se trataron 4×10^5 células FaDu con dosis crecientes de ^{137}Cs en un rango de 0.75 a 8 Gy. Posterior al tratamiento con radiación, se colocaron en frascos de cultivo diferentes cantidades de células, dependiendo de la dosis con la que se trataron, y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar por 14 días. Se realizó una tinción con cristal violeta y se cuantificaron las colonias con más de 100 células, es decir, con un diámetro mayor a 1 mm [79].

Mediante el cálculo de la eficiencia de plaqueo se obtuvo la representación gráfica de la fracción de supervivencia celular. Esta curva se ajusta al modelo cuadrático lineal (MCL) que predice el comportamiento del logaritmo neperiano de la fracción de supervivencia celular frente a la RI en el rango de las dosis absorbidas de interés, siempre que estén comprendidas en un rango entre 1 y 10 Gy [60,80]. Este ajuste se realizó utilizando la siguiente expresión:

$$FS = e^{-(Ax+Bx^2)}$$

Finalmente, en el software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) se determinaron los parámetros A (0.7397) y B (-0.0253) para obtener la DI_{50} a través de la resolución de la ecuación de segundo grado. En este caso el valor obtenido de la DI_{50} fue de 0.84 Gy (Fig. 13). Debido a que no se puede administrar dicha dosis de forma exacta, en los subsecuentes ensayos las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 se trataron con 1 Gy.

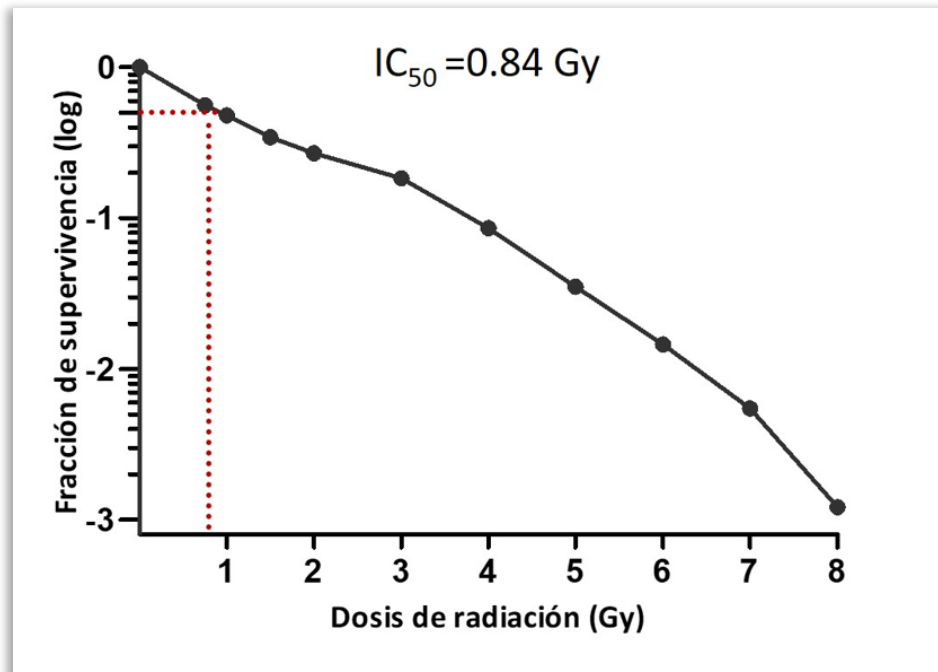


Figura 13. Curva de la fracción de supervivencia de las células FaDu tratadas con RI ¹³⁷Cs. Ensayos clonogénicos. Los datos se expresan en escala logarítmica como la media de tres ensayos independientes.

2. Expresión de los oncogenes E6 del VPH 16 y 18 en células FaDu transfectadas de manera estable.

Los genes E6 del VPH 16 y 18 se transfectaron de manera estable en células FaDu utilizando plásmidos que fueron construidos previamente en el laboratorio [75]. Estos plásmidos fueron clonados en el vector p3XFLAG-CMV-10.

La transfección consiste en la introducción de material genético exógeno en células eucariotas de mamíferos mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia. En el presente proyecto se utilizó el método de la lipofección para la transferencia artificial del plásmido mediante el uso del reactivo Polyfect (Qiagen, Hilden, Alemania). Para lo cual, una mezcla de complejos de dendrímeros-ADN se añadió a un cultivo de células al 85% de confluencia en una caja de 24 pozos. Después de incubarlas por 24 hrs se lavaron y se trataron con el antibiótico geneticina (600 µg/mL) durante 21 días. Al concluir este lapso, se seleccionaron las colonias que crecieron en este medio de selección y se diluyeron de manera

seriada en una placa de 96 pozos para obtener una colonia que esté transfectada de manera estable, la cual se preservó en condiciones de cultivo estándar.

La eficacia de la transfección se evaluó mediante la técnica RT-PCR. En primer lugar, se obtuvo el RNA de las células en cultivo mediante el uso de columnas de intercambio iónico. Posteriormente, el ADN se eliminó con el tratamiento con DNAsas y se realizó la RT-PCR para obtener el cADN en el que se amplificó la secuencia del gen E6 del VPH 16 y 18 en una PCR de punto final. Por último, los amplicones se evaluaron en un gel de agarosa al 2% en el cual se observó que las células FaDu transfectadas contienen el gen E6 completo (fig. 14A) con lo cual se puede inferir que la transfección fue efectiva. El tamaño esperado para los oncogenes E6 del VPH-16 es de 456 pb y para E6 del VPH-18 es de 501 pb. Adicionalmente, se amplificó el gen 18S para evaluar la calidad del material genético obtenido, el tamaño del amplicon esperado en este caso es de 149 pb. (Fig. 14B).

Consecutivamente, la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 se analizó mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-FLAG. Se detectó la presencia de las proteínas E6 (23KDa) y de la isoforma E6* (15KDa) (Fig. 14C). Del mismo modo, en las células FaDu transfectadas e irradiadas con 1 Gy de ^{137}Cs se observó la presencia de ambas isoformas de E6. (Fig. 14D). Se utilizó GAPDH como control de carga (37KDa).

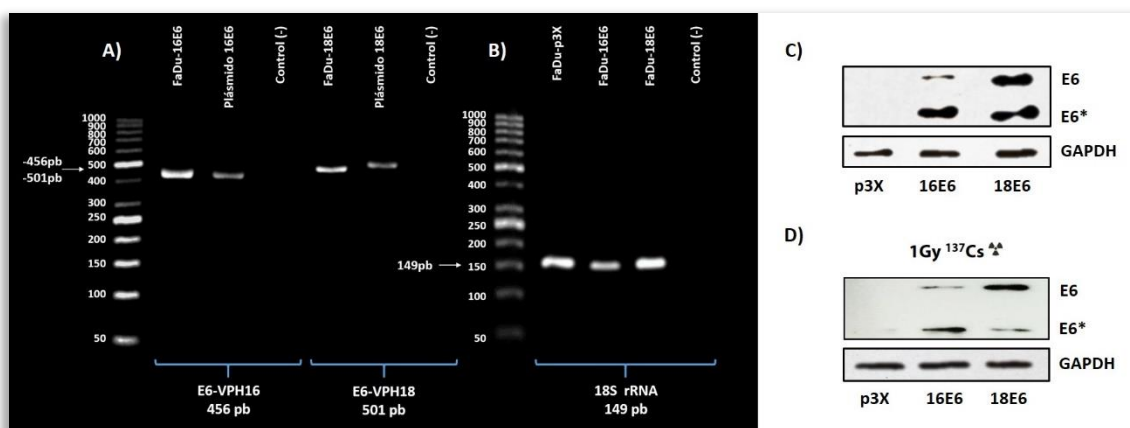


Figura 14. Amplificación y expresión del gen E6 del VPH-16 y VPH-18 en células FaDu transfectadas de manera estable con y sin RI ^{137}Cs . A) Amplificación por RT-PCR de los genes E6 en las células FaDu transfectadas. B) amplificación del gen 18s como control de calidad del material genético. C) Inmunoblot para determinar la expresión de las oncoproteínas E6 (23KDa) y E6*(15KDa) del VPH 16 y 18. D) Inmunoblot para determinar la expresión de las oncoproteínas 16E6 y 18E6 en células radiadas. Se utilizó gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga (37KDa).

3. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 no modifican la variabilidad en células FaDu.

La viabilidad de las células FaDu se determinó mediante la reducción del MTS a una sal de tetrazolio, dicha reducción origina un producto colorimétrico detectable espectrofotométricamente que representa una medida indirecta del número de células viables. En este ensayo no se observaron diferencias significativas entre las células FaDu-16E6, FaDu-18E6 y las células control FaDu-p3X (Fig. 15), de manera que en las condiciones del presente proyecto la expresión de E6 del VPH-16 y 18 no afecta la viabilidad de las células FaDu.

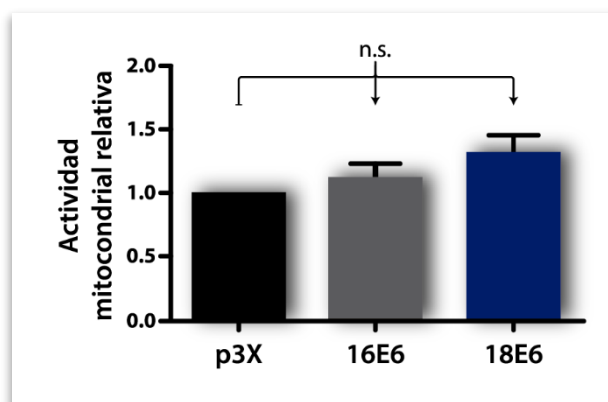


Figura 15. Viabilidad de las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ^{137}Cs . Ensayo con MTS. Los datos se expresan como media \pm DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey, $n=3$, n.s. no significativo.

4. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 disminuyen la fracción de supervivencia sólo en células irradiadas.

Se evaluó la capacidad de formar colonias de las células FaDu-p3x, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 mediante ensayos clonogénicos. Las células que no fueron tratadas con RI no mostraron cambios significativos en su capacidad de proliferar; mientras que en las células irradiadas la fracción de supervivencia disminuyó a 66% en las células FaDu-p3X, a 33% en las células FaDu-16E6 y a 28% en el caso de las células FaDu-18E6, normalizado con respecto a las células FaDu-p3X sin radiar. Las células transfectadas con E6 presentaron diferencias significativas en relación a las células FaDu-p3X irradiadas (Fig. 16). Esto demuestra que la expresión de E6 del VPH-16 y 18 sensibiliza a las células a la radiación.

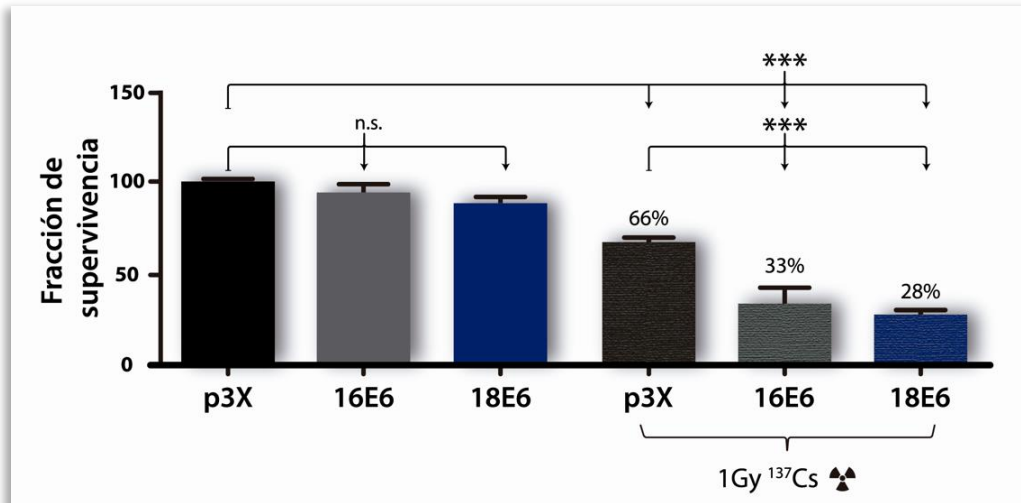


Figura 16. Evaluación de la fracción de supervivencia de células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷Cs. Ensayos clonogénicos en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 no irradiadas e irradiadas con 1 Gy de ¹³⁷Cs. Los datos se expresan como media ±DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey *** p < 0.0005 vs control p3X, n = 3. N.s. no significativo.

5. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 incrementan las ROS.

Los niveles de las ROS se cuantificaron con la finalidad de determinar si en presencia de los oncogenes E6 se incrementa el EO, ya que éste podría estar actuando como un factor sinérgico en la reducción de la fracción de supervivencia de las células radiadas. Para efectuar dicha cuantificación de los niveles intracelulares de ROS se utilizaron las sondas fluorescentes DHE y H₂DCFDA en las células FaDu transfectadas con las oncoproteínas de E6 del VPH-16 y 18, comparando con el plásmido control p3X.

El DHE se oxida en el citosol en presencia de oxidantes intracelulares como el anión superóxido, radical hidroxilo, peroxinitrito y peróxidos. Los productos resultantes son el etidio (E⁺) y el 2-hidroxi-etidio (2-OH-E⁺) que emiten una señal fluorescente [73]. Al cuantificar la intensidad promedio de la fluorescencia de los productos del DHE se observó que en presencia de la oncoproteína E6 del VPH 16 la producción de ROS se duplicó y en presencia de la oncoproteína E6 del VPH 18 el incremento fue de 2.5 veces en relación con el control p3X (Fig. 17A y 17B).

Adicionalmente, para tener un panorama extenso del estado de las ROS intracelulares se utilizó también el H₂DCFDA. Las esterasas celulares hidrolizan los grupos acetato de este marcador cuando ingresa a las células y se convierte en diclorofluoresceína reducida que en presencia de peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo o radicales peróxido se oxida a diclorofluoresceína que

emite una señal fluorescente [73]. Al evaluar la intensidad de fluorescencia del producto DCF se encontró que la oncoproteína E6 del VPH 16 induce un incremento de los niveles intracelulares de ROS de 2.2 veces, mientras que E6 del VPH 18 induce un incremento de 2.7 veces con respecto al control p3X (Fig. 17A y 17C). Este incremento en las ROS mediado por E6 podría explicar en parte su efecto en la radiosensibilización.

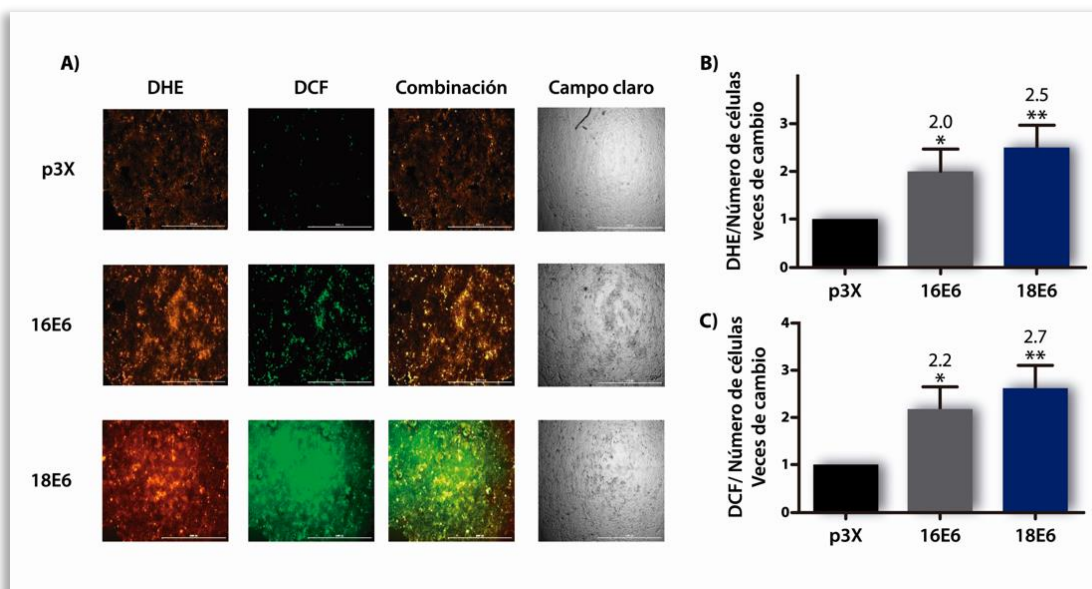


Figura 17. Cuantificación de los niveles intracelulares de ROS en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ^{137}Cs . (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (B) Representación cuantitativa de los resultados con la sonda DHE y (C) con la sonda DCF. Los datos se expresan como media \pm DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs control p3X, $n = 3$.

6. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 incrementan la concentración de proteínas carboniladas.

El aumento en las ROS intracelulares puede inducir modificaciones oxidativas en las proteínas. Dentro de las diversas posibilidades de daño oxidante en proteínas, el proceso de carbonilación es de gran interés, ya que es una modificación irreversible que afecta la función de las proteínas y debido a su estabilidad química es útil como marcador de oxidación severa de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* [76]. Por dichos motivos se procedió a la cuantificación de estas especies en las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6, el método que se utilizó fue el que está basado en la unión covalente de la DNPH2 a los grupos carbonilo formando una base de Schiff para dar lugar a 2,4-dinitrofenilhidrazona, que puede ser detectado y cuantificado

espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico. En la figura 18 se observa que las células que expresan las oncoproteínas 16E6 y 18E6 presentaron un aumento en los niveles de las proteínas carboniladas del 27% y 38% respectivamente, en comparación con el control FaDu-p3X. Estos datos muestran que el aumento en las ROS producido por la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH induce oxidación proteica que está asociado al EO.

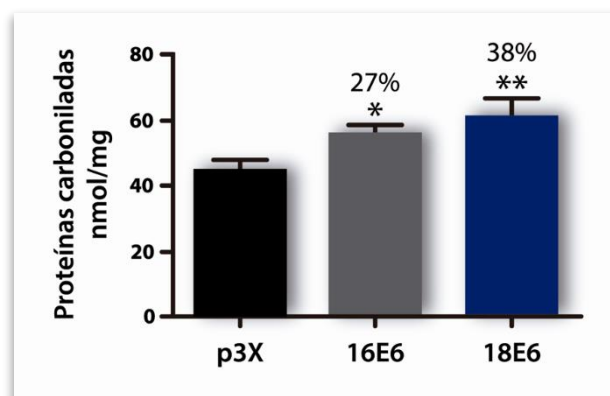


Figura 18. Cuantificación de proteínas carboniladas en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ^{137}Cs . Ensayo con DNPH2. Los datos se expresan como media \pm DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs control p3X, $n = 3$.

7. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 disminuyen la relación GSH/GSSG

El GSH es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Esta molécula es un antioxidante intracelular esencial que utiliza el grupo tiol de la cisteína como agente reductor y se oxida en GSSG [66]. Debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular redox se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de GSH y GSSG mediante el método de reciclado enzimático con el reactivo DTNB. Se observó la disminución del GSH en las células FaDu-16E6 y FaDu-18E6 (Fig. 19A) así como el aumento en los niveles de GSSG (Fig. 19C) que se traducen en una disminución significativa del 80% en la proporción GSH/GSSG en ambas líneas celulares en comparación con el control (Fig. 19B). La disminución en esta proporción se considera un indicativo de EO. El nivel de glutatión total (GSH+GSSG) también aumentó de manera significativa (Fig. 19D). Cabe señalar que si bien se registró un incremento en la cantidad total de GSH en presencia de los oncogenes E6, no fue suficiente para revertir el aumento del EO, lo que se determinó por la reducción en la relación GSH/GSSG, así como por la presencia de altos niveles de ROS intracelulares.

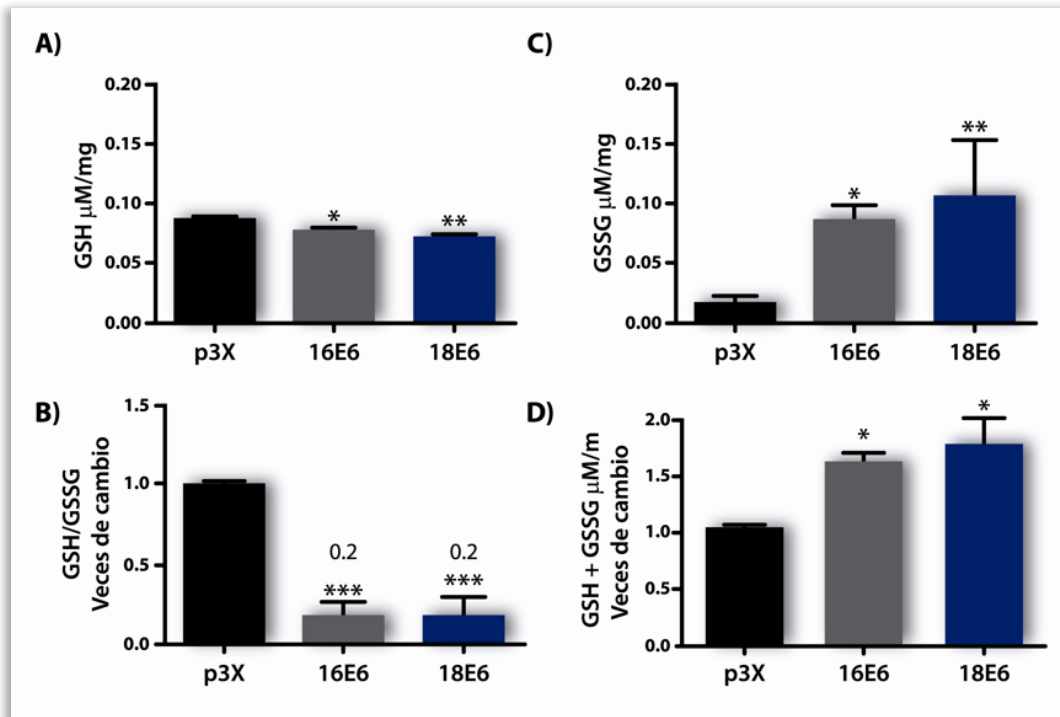


Figura 19. Cuantificación de GSH y GSSG en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 sin RI ^{137}Cs . Ensayo de reciclado enzimático. A) concentración de GSH. B) Concentración de GSSG. C) Relación GSH/GSSG. D) Concentración de glutatión total. Los datos se expresan como media \pm DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs control p3X, $n = 3$.

8. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 aumentan los niveles de γH2AX

Con el fin de determinar si el incremento en los niveles de ROS derivado de la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH induce daño en el ADN, se evaluó la presencia de la forma fosforilada de la histona H2AX (γH2AX). La histona H2AX es fosforilada en el residuo ser139 por la proteína ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM-Rad3-related), o DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) del sistema DDR (DNA damage repair) cuando se presenta un rompimiento de doble cadena de ADN por lo que se considera un marcador de daño al ADN [81]. Al realizar la evaluación de la presencia de γH2AX en las células FaDu transfectadas de manera estable se observó un aumento significativo de 3.2 veces en el caso de las células FaDu-16E6 y de 5.4 veces en el caso de las células FaDu-18E6. (Fig. 20). Estos resultados sugieren que la expresión de las oncoproteínas induce daño al ADN por el aumento de OE.

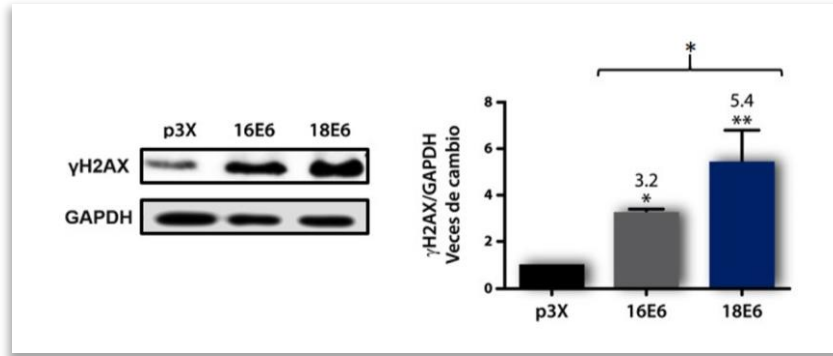


Figura 20. Niveles de expresión de γ H2AX en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6. A) Inmunoblot y B) densitometría que muestran los niveles de γ H2AX (17 KDa) en células FaDu transfectadas de manera estable. Como control de carga se utilizó GAPDH (37 KDa). Los datos se expresan como media \pm DE. Prueba ANOVA y prueba de Tukey * p < 0.05, ** p < 0.005 vs control p3X, n = 3.

9. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modifican los niveles del factor Nrf2 antes y después del tratamiento con RI.

El EO puede inducir la activación de diferentes factores de transcripción asociados a la respuesta antioxidante [55], por esta razón se cuantificaron los niveles del factor relacionado al factor nuclear eritroide E2 (Nrf2).

En condiciones constitutivas el factor Nrf2 se mantiene en el citosol por su regulador negativo KEAP1 y posteriormente la ubiquitina ligasa culina 3 lo marca para su degradación proteosomal. El EO induce la oxidación de los grupos tioles de KEAP1 permitiendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1, una vez liberado Nrf2 migra al núcleo donde aumenta la expresión de proteínas antioxidantes como GCLM, GST, HO-1, CAT, SOD, entre otros. La fosforilación en el residuo ser40 de Nrf2 (pNrf2) por diversas cinasas facilita la activación de Nrf2 y su translocación al núcleo [61].

Los niveles de Nrf2 total y de pNrf2 se evaluaron en las células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 no irradiadas mediante inmunoblot. Se encontró un incremento significativo de la expresión de Nrf2 total de 4.15 en las células FaDu-18E6 con respecto al control; en contraste, aún cuando las células FaDu-16E6 mostraron un incremento de Nrf2, este no fue significativo (Fig. 21A). En el caso de la evaluación de pNrf2 el incremento fue significativo en presencia de ambos oncogenes, 3.6 veces mayor en las células FaDu-16E6 y 3.8 veces mayor en las células FaDu-18E6 (Fig. 21B). Estos resultados sugieren que el aumento de ROS intracelulares inducido

por la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH activa al factor Nrf2. Sin embargo, al tratar las células con 1 Gy de RI el resultado obtenido fue inverso, se observó una disminución a 0.35 y 0.22 en presencia de los oncogenes 16E6 y 18E6 respectivamente (Fig. 21C).

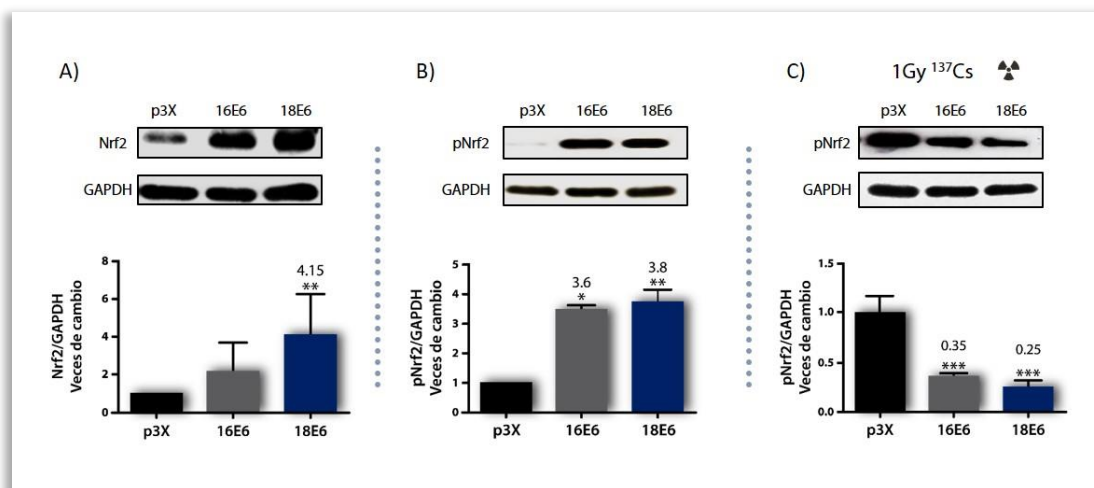


Figura 21. Modificación de los niveles del factor Nrf2 en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷Cs. A) Inmunoblot y densitometría que muestran los niveles de expresión del factor Nrf2 (66 KDa) y B) los niveles del factor Nrf2 fosforilado (110 KDa) en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 no irradiadas, así como C) el factor fosforilado en células radiadas. Se utilizó GAPDH (37 KDa) como control de carga. Los datos se expresan como la media ±DE. Prueba de Tukey * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005 vs control p3X, n =3

10. Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modifican los niveles de las enzimas antioxidantes SOD1 y SOD2 antes y después del tratamiento con RI.

Uno de los blancos del factor Nrf2 es la proteína SOD. Esta proteína antioxidante favorece la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno por lo cual está relacionada con la respuesta al EO [55].

La evaluación de los niveles de expresión de SOD1 y SOD2 en las células FaDu transfectadas irradiadas y sin irradiar se realizó mediante inmunoblot. La expresión de SOD1 se incrementó significativamente en las células FaDu-16E6 (2 veces) y FaDu-18E6 (1.9 veces) con respecto al vector vacío (Fig. 22A). Este incremento significativo fue de mayor magnitud en las células irradiadas FaDu-16E6 (3 veces) y FaDu-18E6 (2.8 veces) (Fig. 22C). Por otra parte, los niveles de SOD2 aumentaron sólo en las células no irradiadas (Fig. 22B y 22D), el incremento fue de 4.3 veces en presencia de la oncoproteína 16E6 y de 3.5 veces en el caso de la oncoproteína 18E6. Finalmente, la actividad enzimática se evaluó mediante espectrofotometría utilizando NBT

como indicador. En este ensayo se observó que la actividad de SOD aumenta 1.9 veces en presencia de la oncoproteína 16E6, en tanto que disminuye en las células FaDu-18E6 (Fig. 22E).

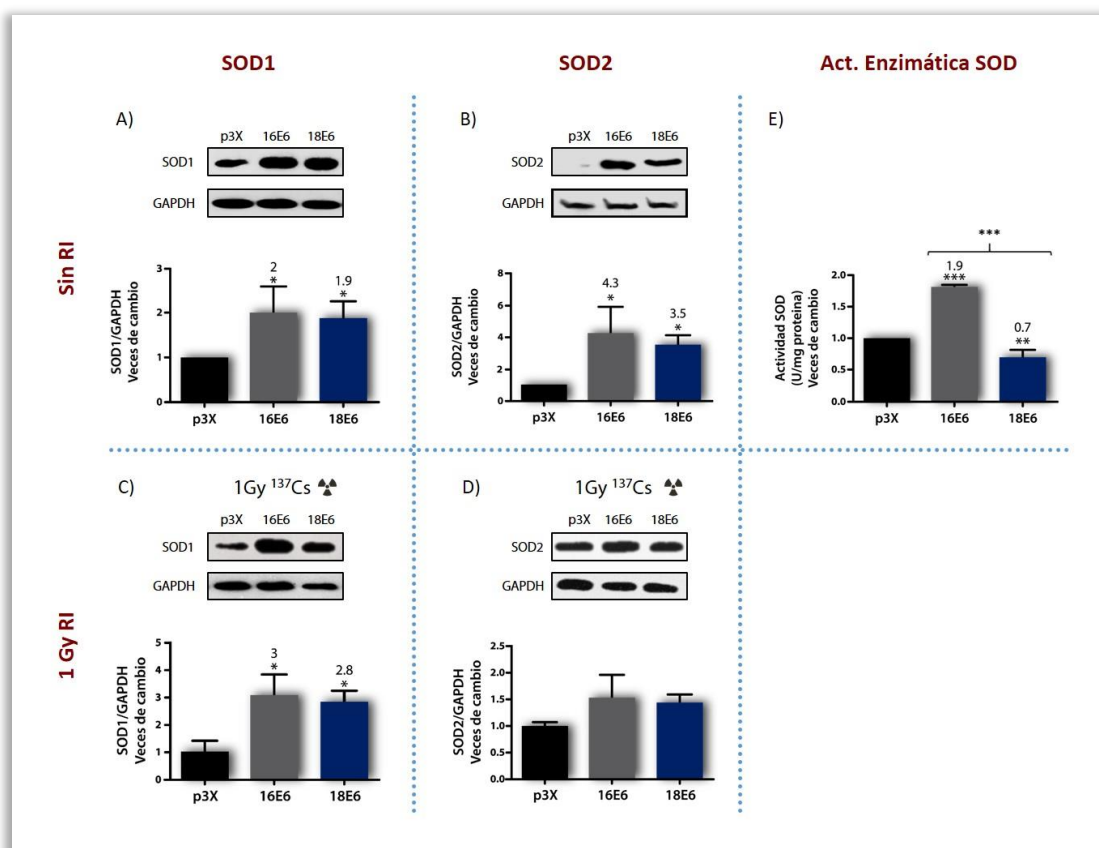


Figura 22. Niveles de expresión de SOD1 y SOD2 y actividad enzimática de SOD en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ^{137}Cs . A) Inmunoblot y densitometría que muestran los niveles de expresión de la proteína SOD1 (23 KDa) en células FaDu transfectadas y C) tratadas con 1 Gy de ^{137}Cs . B) Inmunoblot y densitometría que muestran los niveles de expresión de la proteína SOD2 (22 KDa) en células FaDu transfectadas y D) tratadas con 1 Gy de ^{137}Cs . Se utilizó GAPDH (37 KDa) como control de carga. E) Actividad enzimática de la proteína SOD utilizando NBT. Los datos se expresan como la media \pm DE. Prueba de Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ vs control p3X, $n = 3$.

11. Los niveles de la actividad enzimática de la catalasa sólo aumentan en presencia del oncogen E6 del VPH 16

La expresión de la enzima CAT también está regulada por el factor Nrf2 y asimismo, está relacionada con la respuesta al EO ya que acelera la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [52,82]. Al realizar la evaluación de los niveles de expresión de CAT no se encontraron diferencias significativas entre las células FaDu-16E6, FaDu-18E6 y FaDu-p3X no irradiadas (Fig. 23A) ni irradiadas (Fig. 23C). En contraste, la cuantificación de la actividad

enzimática mostró un aumento significativo de 5.4 veces en las células que expresan la oncoproteína 16E6, mientras que en las células FaDu-18E6 no se observaron cambios significativos (Fig. 23B). La actividad de esta enzima fue evaluada mediante espectrofotometría siguiendo la degradación del H₂O₂.

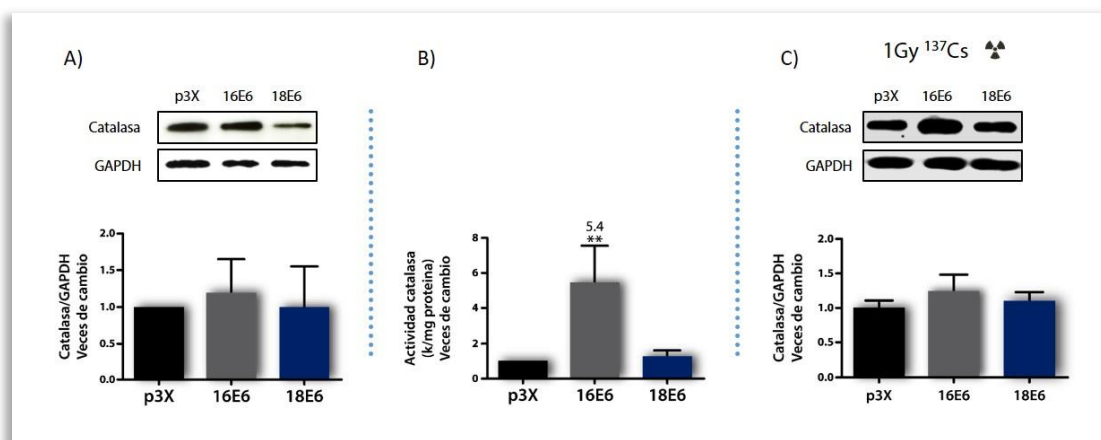


Figura 23. Niveles de expresión y actividad enzimática de la proteína catalasa en células FaDu-p3X, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 con y sin RI ¹³⁷Cs. A) Inmunoblot y densitometría que muestran los niveles de la proteína CAT (60 KDa) en células FaDu transfectadas no irradiadas y B) tratadas con 1 Gy de ¹³⁷Cs. Como control de carga se utilizó GAPDH (37 KDa). C) Actividad enzimática de la proteína CAT. Los datos se expresan como la media ±DE. Prueba ANOVA y Tukey, ** p < 0.005 n=3.



El profundo impacto del VPH en la respuesta a la radiación del CECyC parece indiscutible. A pesar de tener una enfermedad avanzada debido a la afectación ganglionar, los pacientes con tumores VPH(+) tienen un mejor resultado en comparación con aquellos con enfermedad negativa para el VPH, tanto en términos de control locoregional como de supervivencia. No obstante, el estándar de atención actual ofrece los mismos enfoques de tratamiento independientemente del estado del VPH, sin considerar la capacidad de respuesta a la radiación inherente de los CECyC-VPH(+). En este grupo de pacientes el uso de programas intensivos que conllevan a una morbilidad significativa podrían ser innecesariamente agresivos [5,7,25,28,34,49].

Por consiguiente, actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos centrados en la desintensificación terapéutica en pacientes con tumores VPH(+) en un esfuerzo por preservar los excelentes resultados clínicos minimizando al mismo tiempo la toxicidad aguda y a largo plazo. Sin embargo, para lograr la individualización del tratamiento de los CECyC-VPH(+) aún se requieren más investigaciones que revelen los mecanismos biológicos asociados con la mayor radiosensibilidad [4,5,7,9,18,20,25,28,34].

En consecuencia, la contribución al conocimiento sobre la influencia del VPH en la respuesta a la radiación en el CECyC, incluidas las evaluaciones de las modificaciones radiobiológicas predominantes de la radioterapia, parece altamente relevante. En este sentido, el estudio de la regulación redox es significativo ya que está estrechamente relacionada con la respuesta a la radioterapia. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar si las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 generan estrés oxidante y evaluar su efecto sobre la radiosensibilización en un modelo celular de CECyC. Para tal efecto, se utilizó un modelo celular de CECyC, en particular células FaDu, que se transfectaron de manera estable con los genes de E6 del VPH-16 y 18 y se radiaron con ^{137}Cs .

El primer procedimiento realizado fue la determinación de la DI_{50} en células FaDu sin transfectar a través de ensayos clonogénicos. El valor obtenido de la DI_{50} fue de ~ 1 Gy. Previamente se ha reportado que el valor de la DI_{50} de la RI es de 2Gy en células FaDu. No obstante, en estos estudios se utilizaron dosis de 2 a 8 Gy y la fuente de radiación utilizada fue de rayos X, lo que podría explicar la diferencia entre los valores obtenidos [83,84].

Para la transferencia artificial de los genes E6 del VPH16 y 18 se utilizó el método de lipofección. Las transfecciones estables del ADN del vector con la inserción del transgén recombinante de interés en las líneas celulares cultivadas han sido una herramienta predominante para la investigación de las funciones de genes/proteínas específicos. La suposición general es que dicha plataforma puede vincular efectivamente un determinado gen/proteína a fenotipos adquiridos, revelando el mecanismo de funcionamiento de un gen. Cabe señalar que la introducción del ADN plasmídico en las células puede dar como resultado su integración estable en el genoma del huésped [85].

La eficacia de la transfección estable se evaluó mediante dos metodologías, RT-PCR y WB. Utilizando la técnica de RT-PCR fue posible observar un amplicón de ~456 pb en el caso de la amplificación del gen E6 del VPH-16 y un amplicón de ~501 pb en la amplificación del gen E6 del VPH-18. Por otro lado, a través de la técnica de WB fue posible observar dos isoformas del gen E6; a saber, la forma completa (24 kD) y la isoforma trunca E6* (15 kD).

E6 de longitud completa (E6L) se expresa a partir de ARNm sin empalme dentro del ORF de E6, mientras que la isoforma E6* se produce por empalme alternativo que genera diferentes patrones de expresión de ARNm. El sitio donante deriva de un sitio de empalme dentro del ORF de E6 y los diferentes sitios aceptores se ubican en el ARNm temprano. Se ha observado que existen variaciones en la expresión de las isoformas de E6 de acuerdo al tipo viral de alto riesgo, tipo de tejido, grado de la lesión, tipo de líneas celulares y al estado físico del genoma (episomal o integrado). Adicionalmente, los patrones E6L/E6* cambian a lo largo del ciclo celular, siendo la transcripción de E6* más abundante que de E6L durante la fase G2/M. Las discrepancias encontradas en los patrones de expresión de E6 en diversos modelos de estudio podrían deberse a la presencia de factores reguladores específicos según el contexto celular [51].

En el presente análisis, cuando se evaluaron los niveles de mRNA por RT-PCR no se observó la expresión de E6* mientras que mediante la técnica de WB si fue posible detectar los niveles de proteína de dicha isoforma. Se ha descrito que comparar los patrones de expresión de E6 con diferentes herramientas metodológicas resulta complicado debido, principalmente, a las discordancias de sensibilidad entre ambas técnicas [51].

Biológicamente, los niveles de ARNm solo se correlacionan parcialmente con las concentraciones de proteínas correspondientes. De hecho, se ha estimado que solo un 20% - 40% de los niveles de proteínas están determinados por las concentraciones de ARNm correspondientes. Entre las razones propuestas para estas diferencias se encuentran las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales, diferentes velocidades de producción y degradación de ambas moléculas, inclusión de proteínas en vesículas de secreción y difusión fuera de la célula. Se ha postulado que las constantes de velocidad de transcripción y elongación tienen mayor importancia en el control de los niveles de proteínas. En las células de mamíferos, los ARNm se producen a una velocidad mucho menor que las proteínas; en promedio, una célula de mamífero produce dos copias de un ARNm determinado por hora, mientras que produce docenas de copias de la proteína correspondiente por ARNm por hora. De manera similar, la velocidad de degradación es mayor para los ARNm que para las proteínas [86,87].

Es importante tener en cuenta estas diferencias al comparar los resultados de ambas técnicas y considerar que las proteínas y sus concentraciones absolutas determinan el estado fisiológico de una célula.

Una vez obtenidas las células transfectadas de manera estable con los oncogenes del VPH-16 y 18 se evaluó la influencia de estos en la viabilidad celular de las células FaDu aplicando el reactivo MTS y cuantificando espectrofotométricamente la reacción. En este ensayo no se observaron diferencias significativas entre las células transfectadas con los oncogenes y el plásmido control.

Asimismo, en el ensayo publicado por Cruz-Gregorio y colaboradores encontraron que la transfección transitoria de los oncogenes E6 del VPH-16 y 18 en células de cáncer de cérvix C33 no inducen variaciones en la actividad mitocondrial relativa [72]. Análogamente, Yu Jin y colaboradores reportaron que la oncoproteína E6 del VPH-16 transfectada de manera estable no se relaciona con un incremento en la viabilidad de las células HN4 (carcinoma escamoso de laringe) y HN30 (carcinoma escamoso de faringe). Aunque en el sexto día de cultivo si observaron un incremento significativo [88]. Tomando en cuenta estos resultados es posible sugerir que las oncoproteínas E6 del VPH-AR no inducen cambios en la viabilidad celular en líneas celulares transformadas.

El siguiente planteamiento que se abordó fue conocer si las oncoproteínas E6 modificaban la respuesta a la RI. Se realizaron ensayos clonogénicos en los que se observó una mayor radiosensibilidad de las células transfectadas con E6 del VPH-16 y 18 siendo mayor para las células que expresaban E6 del VPH-18.

Múltiples estudios *in vitro* han abordado el efecto del VPH con relación a la radioterapia en líneas celulares de CECyC positivas y negativas al VPH. Aunque existen resultados contradictorios que sugieren una sensibilidad reducida o nula, gran parte de las investigaciones más recientes han reportado una mayor sensibilidad en las células de CECyC-VPH (+)[15]. Los estudios se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Radiosensibilidad de las líneas celulares de CECyC de acuerdo al estado del VPH.

Autores	Líneas celulares VPH (+)	Líneas celulares VPH (-)	Resultado radiosensibilidad
Spanos y col 2009 [89]	UMSCC-47, UPCISCC-90	UMSCC-1, 19, 84	VPH (-) más radiosensibles
Nagel y col 2013 [90]	UDSCC-2, UMSCC-47, UPCISCC-90, VUSCC-147	VUSCC: 1131, 1365, 40, 96, 120, 17, OE, FaDu, UMSCC: 6, UMSCC-11B, 14 C, 22A, 22B, 38	No hay diferencias en relación al estado del VPH
Arenz y col 2014* [91]	UMSCC-47, 104, UPCISCC-152, 93VU-147T	UDSCC-1, UMSCC-6, 11B, UTSCC-33	VPH (+) más radiosensibles
Dok y col 2014 [92]	SCC-154, UPCISCC-90	SQD9, SC263, CAL27	VPH (+) más radiosensibles
Rieckmann y col 2013* [93]	93VU-147T, UDSCC-2, UMSCC-47, UTSCC-47, UTSCC-45, UPCISCC-154	HSC4, CAL33, SAT, UTSCC-5, FaDu	VPH (+) más radiosensibles
Kimble y col 2013* [94]	UDSCC-2, UMSCC47, UPCISCC-90, 93VU-147T	UMSCC-1,6, 22B, SCC-1483	VPH (+) más radiosensibles
Zhang y col 2020 [95]	UPCISCC-99	UPCISCC-089	VPH (+) más radiosensibles
Reid y col 2020 [96]	UM-SCC-47, UPCISCC-154, 90.	UM-SCC-1, 17a, 22a	VPH(+) más radiosensibles primera generación No hay diferencias en las siguientes generaciones

*Estudios en los que se comprobó la presencia del ADN del VPH y/o el mRNA de E6/E7 en las líneas celulares positivas

Spanos y col. han sugerido que es poco probable que aumente la sensibilidad de las células cancerosas positivas para el VPH a la radioterapia. En su investigación realizaron ensayos clonogénicos con dosis crecientes de RI, las líneas celulares positivas al VPH fueron ligeramente más resistentes a la RI en comparación a las líneas negativas [89]. Análogamente, Nagel y col. encontraron que la respuesta a la radiación no difería significativamente en relación al estado del VPH, su análisis incluyó 4 líneas celulares positivas y 14 líneas celulares negativas [90]. En contraste, Kimple y col. observaron que la fracción de supervivencia (FS) después de 2 Gy fue de 22% para las líneas VPH positivas frente a 59% para las células negativas para el VPH [94]. Del mismo modo, Rieckman y col. informaron un aumento significativo en la sensibilidad a la radiación en células VPH positivo en comparación con las células negativas para VPH en un rango de dosis de radiación (Fracción de supervivencia después de 3 Gy = 28.3% vs. 44.6% y después de 6 Gy = 4.2% vs. 14.7%) [93]. Zhang y col contrastaron la fracción de supervivencia de una línea celular positiva y una negativa y encontraron una menor fracción de supervivencia en la línea celular positiva al VPH [95]. Los factores que podrían estar relacionados con las discrepancias entre estos análisis se centran en los sesgos metodológicos como la falta de comprobación de la positividad de las líneas celulares [31].

Recientemente, el estudio de Reid y colaboradores se enfocó en identificar la respuesta de las líneas celulares de CECyC VPH(+) y (-) a la RI fraccionada. Aunque corroboraron los hallazgos anteriores; es decir, que las líneas positivas al VPH son más radiosensibles, este efecto sólo se pudo observar en la primera generación de células. Posteriormente, cuando las células se re-irradiaron (2ª, 3ª y 4ª generación) no encontraron diferencias significativas en la radiosensibilidad fraccional, evaluado por parámetros de α y β del modelado MCL, entre las líneas celulares según el estado del VPH [96].

Por otro lado, la función de las oncoproteínas del VPH en la modulación de la radiosensibilidad ha sido analizada por tres grupos de investigación. Deweese y col. evaluaron la supervivencia clonogénica a la radioterapia de baja tasa de dosis (0.025 Gy/h) de las células de carcinoma de colon (RKO) diseñadas para expresar E6 y E7. A pesar de que observaron diferencias en la detención del ciclo celular, no observaron variaciones en la supervivencia clonogénica. Esto es contrario a las expectativas, ya que las células que se han detenido en G1 y G2 no suelen entrar en la fase mitótica y por lo tanto, existe un efecto citostático. Estos resultados discordantes

pueden explicarse por la modalidad de irradiación (baja tasa de dosis) y el tipo de célula estudiada. La línea celular de carcinoma de colon no es una neoplasia inducida por el VPH, por lo tanto, pueden activarse diferentes vías del ciclo celular [97].

Posteriormente, el grupo de Pang y col. compararon los efectos de las isoformas de E6 sobre la radiosensibilidad en las líneas de carcinoma escamoso de lengua UN-SCC4 y WSU-HN6 que expresan de manera estable las isoformas E6 del VPH-16 marcadas con GFP (Green fluorescent protein). Observaron que tanto E6L como la isoforma E6* confirieron mayor radiosensibilidad en todas las dosis [98].

Por último, Kimple y col. investigaron las contribuciones individuales de las oncoproteínas del VPH, utilizaron un sistema de células HTE (epitelio tonsilar humano) que expresaban de manera estable los oncogenes E6 y E6/E7 del VPH-16. En estas células realizaron ensayos de formación de colonias y observaron una disminución similar en la supervivencia clonogénica con la expresión de ambos oncogenes [94].

Tomando en cuenta los resultados anteriormente descritos asociados con la respuesta a la RI, se puede plantear que el VPH incrementa la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares y que la expresión de los oncogenes E6L, E6* y E6/E7 están involucrados con esta respuesta. En el presente estudio se pudo corroborar que los oncogenes E6 están relacionados con la radiosensibilidad y además se demostró que este efecto depende del tipo viral ya que la oncoproteína E6 del VPH-18 incrementa aún más este efecto. Será interesante demostrar si este efecto se observa en otras líneas celulares derivadas de CECyC.

La muerte celular potenciada por E6 del VPH 16 y 18 no parece requerir la transcripción mediada por p53, ya que la línea celular FaDu expresa mutaciones disruptivas en el gen p53 (c.743G>T; c.376-1G>A). Asimismo, en el estudio realizado por Pang y col. utilizaron líneas celulares que expresan formas mutadas de p53. Sin embargo, la función de p53 en la radiosensibilidad asociada a la infección por el VPH sigue siendo un tema de intenso debate que escapa a los alcances de esta investigación.

Consecutivamente, se evaluaron los niveles de las ROS con la finalidad de determinar si en presencia de los oncogenes E6 se incrementa el EO ya que éste podría estar actuando como un factor sinérgico en la reducción de la fracción de supervivencia de las células radiadas. Se

observó que ambos oncogenes (del VPH-16 y 18) promueven un aumento en las ROS y que el incremento es más notable en las células transfectadas con E6 del VPH-18. Es importante resaltar que la producción de ROS en las mitocondrias se evaluó posteriormente en nuestro laboratorio. Del mismo modo, la expresión de ambos oncogenes elevó los niveles de ROS mitocondriales; no obstante, el incremento fue mayor en las células que expresaban E6 del VPH-16. Se concluyó que E6 induce alteraciones mitocondriales bioenergéticas que están ligadas al incremento de ROS en las mitocondrias que después pueden ser liberadas al citosol [99].

Los niveles de ROS han sido ampliamente estudiados en el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCu). En el trabajo desarrollado por Warowicka y col reportaron que los niveles de ROS se vieron incrementados en las muestras de pacientes con cáncer cervical en comparación con las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado [100]. Williams y col evaluaron los niveles de ROS en líneas celulares de cáncer cervical. Determinaron que las células Caski mostraban mayor índice de ROS en comparación con las células SiHa, por lo cual sugirieron que la isoforma de la oncoproteína E6* podría estar implicada con el aumento de ROS ya que dicha isoforma se expresa con mayor intensidad en las células Caski. Razón por la cual evaluaron la concentración de ROS en células NOK (queratinocitos orales normales) transfectadas transitoriamente con los genes E6L y E6* del VPH-16 y observaron que sólo la isoforma trunca eleva las ROS [73]. Chen Wongworawat y col encontraron el mismo resultado en las células NOK transfectadas de manera estable con E6L y la isoforma E6* [101].

En nuestro laboratorio se demostró la modulación diferencial de las especies reactivas de oxígeno por las proteínas de expresión temprana E1, E2, E6 y E7 de los genotipos 16 y 18 del VPH en la línea celular C33A de cáncer cervical. Las proteínas E1 y E7 no inducen un incremento en las ROS, mientras que E2 y E6 sí lo inducen. Por otro lado, se evaluó la transfección conjunta de E1 y E2 en la que se observó del mismo modo el aumento de estas especies, a diferencia de la co-expresión de E6 y E7 que inhibió el incremento mediado por E6 sólo, por lo que se postuló que E7 tiene un efecto antagónico de E6 [72].

Cabe mencionar que el aumento de las ROS mediado por la presencia de la proteína E2 del VPH-18 también se observó en células HaCat transfectadas de manera transitoria [102].

Utilizando el mismo modelo de células HaCat, Hochmann y col evaluaron la expresión de los oncogenes E5, E6/E7 y la co-expresión de E5 y E6/E7 del VPH-18 relacionada con los niveles de ROS. Encontraron que en las células transfectadas de manera estable se incrementó la concentración de ROS, siendo más notable en las células que co-expresaban E5 y E6/E7 [103].

En lo concerniente al CECyC el grupo de Marullo y col analizaron el estado redox en un grupo de células VPH (+) y (-). Sus resultados mostraron que las líneas que expresaban las secuencias de E6 y E7 tenían mayores niveles de ROS. Basados en estos resultados sugirieron que las oncoproteínas podrían estar relacionadas con el aumento en el EO; por lo tanto, transfectaron células PCI-15A (cáncer de laringe) con el gen bistrónico de E6 y E7 y observaron la misma respuesta [74].

Considerando los resultados anteriormente descritos es posible deducir que el VPH está relacionado con el incremento de las especies reactivas de oxígeno, aunque en cierto modo no está bien definido cuál de las proteínas del virus está implicada en dicho aumento. Por un lado la asociación de E2 se ha demostrado en dos investigaciones independientes, la relación de E5 sólo se ha observado en el estudio más reciente y la implicación de E6 es imprecisa en ciertos estudios. El grupo liderado por Duerksen Hughes postularon en sus investigaciones del 2014 y 2016 que sólo la isoforma E6* es la que modula la producción de ROS y no E6L. En nuestro grupo se observó la expresión de ambas isoformas en los dos estudios independientes que se han realizado, por lo que no queda completamente definido cuál de las dos isoformas está actuando en esta respuesta. Por otra parte, Hochmann y Marullo analizaron la expresión del gen bistrónico E6/E7 y no se dilucidaron los efectos individuales de las oncoproteínas. De cualquier modo, en todos los estudios la oncoproteína E6 se ha visto vinculada con el aumento de las ROS.

Con la finalidad de caracterizar el EO promovido por el aumento en las ROS, se cuantificaron las proteínas carboniladas y encontramos que la expresión de las oncoproteínas E6 del VPH induce oxidación proteica, siendo mayor en el caso de la expresión de E6 del VPH-18. A la fecha, este es el primer estudio que analiza las modificaciones oxidativas en las proteínas en un modelo celular de CECyC y su asociación con las oncoproteínas E6. Anteriormente, sólo han sido evaluadas en muestras de tejidos de pacientes con displasia o cáncer cervical, se concluyó que

el aumento de las proteínas carboniladas depende del grado de la lesión ya que se observó un incremento en las muestras de pacientes con displasia y no con cáncer cervical [104].

A continuación, se determinó la relación GSH/GSSG que se considera un indicador representativo del entorno redox celular. Se registró una disminución de esta relación al expresar las oncoproteínas E6 sugiriendo un incremento en el EO mediada por el VPH. Este dato es importante ya que una de las funciones del GSH es disminuir la formación de disulfuros mixtos en las proteínas con tioles críticos como los receptores, proteínas quinasas y factores de transcripción. La alteración de estas proteínas podría conducir a su función aberrante [66].

Durante la revisión de la literatura no fue posible encontrar un estudio que investigará las alteraciones del sistema del GSH en el CECyC. En cambio, existen diversos reportes de su relación con el CaCu. Por ejemplo, se ha encontrado una disminución significativa del contenido de GSH en el tejido cervical neoplásico en comparación con el grupo de pacientes control [62].

En el modelo celular de CaCu, Cruz y col evaluaron la proporción GSH/GSSG y encontraron una modulación diferencial mediada por las proteínas de expresión temprana del VPH-16 y 18. E1, E2, E6 y la co-expresión de E1 y E2 disminuyeron la relación GSH/GSSG. Por el contrario, E7 la aumentó y la co-expresión de E6 y E7 no promovió ningún cambio significativo [72].

Recientemente, en el trabajo publicado por Hochmann y col. determinaron los niveles de GSH utilizando la técnica de HPLC. La expresión combinada de E5 y E6/E7 en células HaCat incrementó la concentración de GSH, mientras que la expresión de E5 y E6/E7 no modificó este valor. Sin embargo, no se evaluaron los niveles de GSSG por lo que no se registró el valor de la proporción [103].

Con estos datos es posible sugerir que la presencia del VPH modifica el sistema del GSH y que la proteína E6 está relacionada con esta regulación.

Una de las características más relevantes del daño oxidativo son las modificaciones al ADN, se ha observado que las ROS causan SSB, DSB, bases de nucleótidos dañadas o sitios abásicos y enlaces cruzados con otras moléculas. Todas estas alteraciones pueden contribuir a la carcinogénesis o a la progresión de las neoplasias [42,63]. Por ello en el presente proyecto se examinaron los niveles de γ H2AX. La histona H2AX se forforila en el residuo ser139 por las proteínas ATM, ATR, o DNA-PK del sistema DDR cuando se presenta un rompimiento de doble

cadena de ADN por lo que se considera un marcador de daño al ADN. Se observó un incremento de los niveles de γ H2AX en las células que expresaban los oncogenes E6, siendo mayor en las que expresaban E6 del VPH-18.

El daño oxidativo en el ADN ha sido examinado previamente por diversos autores. Williams y col. realizaron ensayos cometa y la cuantificación por citometría de flujo de los niveles de 8-oxiguanina encontrando que las células caski y las células NOK que expresaban E6* de manera estable mostraron un mayor grado de daño en el ADN [73].

Siguiendo esta línea de ideas; la investigación realizada por Cruz y col reportó que los niveles de γ H2AX incrementan cuando se expresan transitoriamente las proteínas E6 y la co-expresión de E1 y E2 en las células C33. En cambio la expresión de E1, E2, E7 y la expresión simultánea de E6 y E7 no promovieron daño en el ADN [72].

Al contrastar líneas celulares de CECyC negativas y positivas al VPH, Marullo y col. observaron un mayor daño al ADN en aquellas células positivas al VPH evaluado por ensayos cometa. Del mismo modo, las células PCI-15A que expresaban el gen bicistrónico E6/E7 mostraron un mayor grado de daño al ADN [74].

Estos datos en conjunto indican que la expresión conjunta de E1 y E2, de las oncoproteínas E6, así como la isoforma E6* del VPH inducen incremento en el daño en el ADN. Adicionalmente, retomando los resultados de los experimentos hasta aquí descritos del presente proyecto, es posible sugerir que los DSB del ADN se producen por un aumento en el EO producido por la expresión de las oncoproteínas de E6. Este planteamiento se corroboró posteriormente en el laboratorio, las células FaDu-p3x, FaDu-16E6 y FaDu-18E6 fueron tratadas con 10 mM de NAC (N-acetil-cisteína) y se observó que el antioxidante mitigaba el daño en el ADN, con lo que se concluyó que efectivamente era causado por un incremento en el EO [99].

Debido a que el EO puede inducir la activación de la respuesta antioxidante se procedió a la evaluación de las proteínas implicadas en dicha respuesta. Además, se ha sugerido que la radioresistencia se asocia con una intensificación de la respuesta antioxidante, por lo cual también se evaluó este factor después de tratar las células con la DI_{50} de la RI.

Un mecanismo inicial en respuesta al aumento de ROS es la activación de factores transcripcionales, como el factor Nrf2, que induce la expresión de enzimas antioxidantes

[52,55,68]. El factor Nrf2 puede activarse mediante la fosforilación de su residuo serina 40 que facilita su migración al núcleo. Razón por la cual se evaluaron los niveles totales y de la forma fosforilada de Nrf2. Se observó que tanto la forma fosforilada como el total se elevaron en las células transfectadas con los oncogenes E6. De nuevo el oncogen E6 del VPH-18 estuvo asociado con un mayor incremento. El tratamiento posterior con el antioxidante NAC atenuó estos valores, por lo que se concluyó que el EO provocado por las oncoproteínas E6 está relacionado con los niveles del factor Nrf2 [99].

Se ha informado que Nrf2 puede ejercer efectos beneficiosos al estimular la transcripción de enzimas antioxidantes y reducir los niveles de EO. No obstante, también puede tener efectos nocivos ya que induce la proliferación celular, inhibe la apoptosis y disminuye el efecto de los agentes quimioterapéuticos [45,55].

En las muestras de pacientes con CaCu se han observado mayores niveles de la proteína Nrf2 nuclear en comparación con los tejidos normales. Además su silenciamiento puede sensibilizar a las células Caski al tratamiento con cisplatino [105].

Paralelamente, los estudios en CECyC han mostrado mutaciones activadoras en la vía Nrf2/Keap1/Cul3, principalmente en CECyC negativos al VPH, que se han asociado con la progresión de la neoplasia, resistencia a tratamiento y peor prognosis [69,106,107].

En relación a las oncoproteínas del VPH, esta es la primera investigación que evalúa la relación entre los oncogenes E6 y el factor de transcripción Nrf2. Sin embargo, recientemente se publicó un estudio donde observaron que la expresión de la oncoproteína E7 en queratinocitos del piso de la boca (OKF6-TERT2 y SCC143) también induce la sobreexpresión de Nrf2 [108]. Se ha postulado que la sobreexpresión de Nrf2 protege a las células cancerosas contra el incremento en las ROS debido al estrés metabólico [69]. En el presente estudio se observó que después del tratamiento con RI, los niveles de Nrf2 disminuyeron en las células FaDu transfectadas de manera estable con los oncogenes de E6, siendo la disminución más notable en aquellas transfectadas con E6 del VPH-18.

Se ha demostrado que el silenciamiento o la inhibición farmacológica de Nrf2 en células de cáncer de pulmón, próstata y páncreas disminuyen la expresión de los genes antioxidantes y sensibiliza a la muerte celular inducida por ROS después de la exposición a radioterapia y a

agentes quimioterapéuticos. Asimismo, se ha reportado que la radioresistencia se asocia con mayor respuesta antioxidante que inhibe la apoptosis [69,109].

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación es posible sugerir que el EO inducido por el VPH promueve una mayor expresión de proteínas antioxidantes, que si bien no disminuyen el daño oxidativo, inhiben la apoptosis inducida por las ROS y por tanto participan en la carcinogénesis y la progresión de la neoplasia. Sin embargo, después de la radioterapia esta respuesta disminuye promoviendo la apoptosis y la radiosensibilidad.

Con la finalidad de caracterizar más detalladamente la respuesta antioxidante asociada a la expresión de E6 del VPH-16 y 18, se evaluaron los niveles de las enzimas antioxidantes SOD1 y SOD2, así como su actividad enzimática antes y después de la radioterapia. En este ensayo se observó que los niveles de ambas proteínas se elevaron en presencia de E6 del VPH-16 y 18, en este caso el aumento fue mayor en las células que expresaban E6 del VPH-16. De manera similar, la actividad enzimática de SOD incremento con la expresión de E6 del VPH-16 y disminuyó con la expresión de E6 del VPH-18. En este punto es importante señalar que los cambios en los niveles de expresión de SOD no necesariamente reflejan la actividad de la enzima ya que SOD puede estar regulada por muchas modificaciones post-traduccionales como la oxidación, acetilación, desacetilación, ubiquitinación, fosforilación, S-glutacionilación y nitración [110].

La actividad de las enzimas SOD pueden tener funciones dicotómicas en las células, por un lado disminuyen el daño oxidativo ocasionado por la generación del anión superóxido pero de forma contraria pueden contribuir al incremento del EO al aumentar la producción de peróxido de hidrógeno que es una especie reactiva con mayor capacidad de difusión en la célula. Los aumentos de H₂O₂ mediados por SOD pueden restringir la actividad de muchos miembros de la familia de las proteínas tirosina fosfatasa como PTEN y MAPK fosfatasas que desempeñan una función importante en la restricción de la invasión, migración, el recambio de la matriz, la proliferación celular, la angiogénesis y la supervivencia celular. Es por esta razón que la función de SOD en el desarrollo de las neoplasias aún se encuentra en debate [55,62,111,112]. Balasubramaniyan y col reportaron que en el tejido neoplásico cervical se encuentra una reducción notable en la actividad de SOD en las etapas II, III y IV [113]. Diversos estudios han informado el mismo resultado; sin embargo también existen informes opuestos que indican una

mayor actividad de SOD en pacientes con cáncer de cuello uterino en comparación con el grupo control. Los resultados contrastantes entre estos análisis podría originarse en la falta de especificidad de los ensayos de la actividad enzimática que no distinguen entre las diferentes isoformas de SOD, mientras que en los otros análisis se llevó a cabo la técnica IHQ con anticuerpos para SOD2 [62,112].

La mayor parte de las investigaciones sobre la enzima SOD se centran en la enzima mitocondrial SOD2, poco se sabe sobre la contribución de SOD1 en las neoplasias [71].

En lo concerniente a la enzima SOD2 se ha observado que su expresión es más alta en las neoplasias de estadio avanzado, invasivos y metastásicos. Se ha descrito de igual modo que SOD2 participa en la regulación de la integridad y función de las mitocondrias, así como también inhibe la muerte apoptótica dependiente de ROS. Por estas razones se ha sugerido que el aumento en la actividad de SOD2 propaga aún más el fenotipo maligno [65,71,111].

No obstante, la expresión elevada de SOD2 no se correlacionó estadísticamente con la presencia del VPH-16 o 18 [112].

Aunado a este resultado, Williams y col observaron que las células Caski muestran niveles menores de SOD1 y SOD2. Mientras que la expresión de E6* en células NOK disminuyó los niveles de SOD2 pero no de SOD1. La expresión de E6L no originó cambios significativos en ninguna de las dos enzimas [73].

Cruz y col encontraron resultados similares en el modelo celular de cáncer cervical C33A, la expresión de las oncoproteínas E6 no modificaron ni los niveles ni la actividad enzimática de SOD1/2; en cambio, la expresión de las oncoproteínas E7 disminuyeron la actividad enzimática y los niveles de SOD1, así como la expresión de las proteínas E1, E2 y E1/E2 disminuyeron los niveles de SOD1/2 y la actividad enzimática [72].

Estos datos aparentemente contradictorios con los resultados de la presente investigación podrían indicar que la regulación del VPH, y de su oncoproteína E6, sobre la enzima SOD depende del tipo de tejido donde se produce la infección. Por ello, resulta necesario ampliar la comprensión de los complejos mecanismos bioquímicos que gobiernan la naturaleza pro-oxidativa y antioxidante de SOD2 durante la tumorigénesis de las neoplasias asociadas al VPH, especialmente de los CECyC [111].

Estudios publicados de forma independiente han demostrado un aumento de la actividad de SOD2 en estadios avanzados del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con metástasis regionales, aunque no se ha determinado su asociación con el VPH [71,111].

A continuación, se cuantificaron los niveles de SOD 1 y 2 después del tratamiento con RI en las células que expresaban los oncogenes E6. Se registró un incremento de la enzima SOD1 siendo mayor con la expresión de E6 del VPH-16, mientras que SOD2 no mostró variaciones.

Al día de hoy se desconoce la asociación de la enzima SOD1 con la respuesta al tratamiento. Por el contrario, se conoce que el aumento de la actividad de SOD2 incrementa significativamente la viabilidad de las células cancerosas después de la RI y activa el bloqueo del punto de control G2, lo que finalmente induce la radioresistencia en las células neoplásicas. Muchos estudios han demostrado que la protección de las células contra la muerte celular inducida por el EO mitocondrial puede promover el desarrollo de radiorresistencia [54].

Aquí, la acción de SOD2 se ha atribuido principalmente a su actividad antioxidante, en lugar de cambiar el equilibrio redox a un estado pro-oxidante. Se ha demostrado que SOD2 estabiliza la membrana mitocondrial y conduce a una disminución de la activación de caspasa 3 cuando las células neoplásicas se tratan con RI, en comparación con las células que carecen de una alta expresión de SOD2. Además, SOD2 puede inhibir la apoptosis inducida por ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) al inhibir la liberación del citocromo c y Smac/DIABLO. Se ha planteado la hipótesis de que dentro de las células tumorales, los altos niveles de ROS mitocondriales, que normalmente impulsan la liberación de Smac/DIABLO, son neutralizados por SOD2, para prevenir la apoptosis. Los altos niveles de SOD2 en las células tumorales son, por lo tanto, perjudiciales para la radioterapia. Se ha demostrado que la sobreexpresión de SOD2 confiere resistencia a numerosos estímulos apoptóticos. Los efectos antiapoptóticos de SOD2 se atribuyen a su actividad de dismutación del superóxido. Un trabajo reciente sugiere que los aumentos en el estado estacionario [H₂O₂] resultantes de la sobreexpresión de SOD2 son responsables de restringir la muerte celular apoptótica inducida por TNF [50,55,71,111].

Tomando en cuenta estos hallazgos y los propios de la presente investigación, es posible sugerir que el VPH, en particular la expresión del oncogen E6, está relacionado con la radiosensibilidad

a través de la disminución de la respuesta antioxidante, ya que la enzima SOD2 no mostró variaciones significativas y la función de SOD1 se desconoce en la radiosensibilidad.

Uno de los posibles mecanismos por los que el VPH podría regular la sobreexpresión de SOD es a través de la inhibición de la actividad de p53. Se ha descrito que los niveles bajos o nulos de p53 aumentan la transcripción de SOD2 al incrementar la unión del factor NF- κ B al promotor de SOD2 promoviendo de este modo un estado de supervivencia aberrante. Por el contrario, los niveles altos de p53 evitan la unión al promotor de SOD2 induciendo un incremento de ROS y altas tasas de apoptosis. Es relevante mencionar que p53 puede regular la actividad de SOD2 independientemente de la transcripción ya que tiene la capacidad de trasladarse a las mitocondrias e inhibir directamente la actividad de la enzima antioxidante [71,111].

El último ensayo realizado fue la determinación de los niveles y la actividad enzimática de la CAT que favorece la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua. Se observó que la expresión del oncogen E6 del VPH-16 incrementó la actividad enzimática de esta proteína. Sin embargo, no se presentó un aumento de los niveles de proteína en ningún caso. Así como en el caso de la proteína SOD, el aumento en la actividad enzimática de la CAT no necesariamente está relacionado con el aumento en la traducción ya que esta enzima también se encuentra regulada por modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación y la fosforilación [65,82].

Se ha informado que la actividad de CAT disminuye en diversas condiciones patológicas, incluido el CaCu y el CECyC. Se ha propuesto que la disminución de la actividad de CAT conduce a un aumento de H₂O₂ y crea un entorno intracelular favorable al daño del ADN, inflamación, mutagénesis, inhibición de la apoptosis y finalmente la promoción del cáncer [55,62,111,113,114].

Por otra parte, Jung Hyun y col. estudiaron la función de la CAT en células HaCaT transfectadas de manera transitoria con E7. Indicaron que la expresión de E7 incrementó tanto la expresión de la CAT como los niveles y la actividad. Esto lo verificaron a través las técnicas RT-PCR, WB y MALDITOF (Matrix-assited laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). El incremento de la expresión de la CAT fue regulado por el factor de transcripción NF- κ B. También observaron que la actividad de la CAT promovía la resistencia a la muerte celular mediada por el peróxido de hidrógeno [114].

El mismo grupo de investigadores publicaron años más tarde que el oncogen E7 regula la resistencia a la apoptosis dependiente del EO modulando la expresión de la CAT así como de Bcl-xL, IL-18, Fas, Bad y citocromo C [115].

Posteriormente, Cruz y col reportaron que la expresión ectópica de E6 disminuye los niveles y la actividad de la CAT, mientras que E7 incrementa ambas características y la expresión de E1, E2, E1/E2 y E6/E7 no generan cambios significativos [72].

En la publicación más reciente de Hochmann y col se demostró que la expresión de E5 incrementa la actividad enzimática de CAT pero la expresión de E6/E7 o de E5/E6/E7 disminuye dicha actividad [103].

Aún no ha sido ampliamente explorada la relación de las proteínas del VPH con la regulación de la actividad de la CAT en respuesta a la RI, con los resultados aquí vertidos se puede suponer que la radiosensibilidad vinculada a la infección con el VPH no está relacionada con los niveles de la CAT.

El análisis global de todos los resultados derivados del presente proyecto permite especular que las oncoproteínas del VPH 16 y 18 favorecen un entorno pro-oxidativo caracterizado por un incremento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno, un aumento del daño oxidativo en las proteínas, una disminución de la relación GSH/GSSG y un incremento en los rompimientos de doble cadena.

Se ha planteado la hipótesis que durante el establecimiento de la infección viral la respuesta inmune puede inducir una elevación del EO que a su vez daña todo tipo de macromoléculas biológicas, contribuyendo de este modo en la carcinogénesis. Una vez establecida la neoplasia, en las células altamente proliferativas se produce una mayor tasa de ROS debido probablemente a la presencia de mutaciones oncogénicas que promueven un metabolismo aberrante. El daño oxidativo en el ADN contribuye a que se generen eventos mutagénicos adicionales, así como la integración del ADN viral al hospedero, que facilitan la progresión de la neoplasia. En las células normales con altos niveles de EO se inician los procesos de apoptosis o necrosis. Al contrario de lo que sucede en las células infectadas con VPH que no pueden iniciar la apoptosis debido a que la oncoproteína E6 impulsa la degradación proteosómica de p53 [69,73,116].

Se ha observado que la infección por el VPH es una condición necesaria pero insuficiente para el desarrollo del tumor y que gran parte de las infecciones por VPH se pueden revertir. No obstante, en algunas de las células infectadas se establece un equilibrio de estado estacionario entre la generación de EO y la desintoxicación, en parte debido a la respuesta antioxidante inducida por el virus. Por tanto, las células infectadas adaptan su metabolismo para beneficiar su crecimiento y supervivencia, probablemente creando una paradoja de alta producción de ROS en presencia de altos niveles de antioxidantes, que no tienen la capacidad de contrarrestar los altos niveles de daño oxidativo pero contribuyen a la inhibición de la apoptosis. Esta modulación oxidativa adaptada del metabolismo celular convierte el ambiente tumoral refractario y altamente oxidante en un factor de selección positivo para células cancerosas adaptadas [41,69].

Adicionalmente, se mostró que en las células transfectadas con los oncogenes E6, el tratamiento con RI provocó disminución en la fracción de supervivencia que sustenta la hipótesis de mayor radiosensibilidad intrínseca asociada a los CECyC-VPH(+), además las células mostraron una disminución de la respuesta antioxidante mediada por Nrf2, SOD1/2 y CAT. Como se mencionó anteriormente, la disminución de las enzimas antioxidantes está relacionada con mayor sensibilidad al tratamiento con radiación [69].

Se ha propuesto que la radiación, en las células transformadas por VPH, induce una supresión general de la transcripción viral que puede restaurar el control celular sobre los mecanismos de apoptosis y detención del ciclo celular mediada por p53 y pRB, respectivamente [23,61].

Sin embargo, en el presente estudio se utilizaron células FaDu que muestran mutaciones disruptivas en el gen TP53, por lo que las respuestas observadas en este trabajo son independientes de la actividad de este supresor de tumores. Sugiriendo que podría haber otros mecanismos involucrados en la regulación del sistema REDOX en respuesta a la radioterapia.

Por otro lado, en este estudio se observó una modulación diferencial del estado redox por parte de los oncogenes E6. En cuanto la regulación del estado oxidativo E6 del VPH-18 estuvo relacionado con un mayor incremento, mientras que en la respuesta oxidativa E6 del VPH-16 promovió más los niveles de las enzimas antioxidantes SOD y la actividad de la CAT. Este hallazgo podría ser explicado por las diferentes interacciones entre las proteínas E6 del VPH con

las proteínas celulares que pueden afectar las modificaciones pos-transcripcionales de las enzimas antioxidantes.

Comprender las bases moleculares de la mayor radiosensibilidad de los CECyC-VPH(+) es particularmente importante con el fin de optimizar el índice terapéutico. La presente investigación aporta datos que sobre la asociación entre la radioterapia y la modulación del estado redox por las oncoproteínas E6 del VPH-16 y 18, que es uno de los posibles mecanismos que contribuyen a la mejor respuesta de los tumores VPH(+).

No obstante, actualmente se encuentran en curso investigaciones sobre otros elementos que podrían contribuir a la radiosensibilidad, relacionados con las 6 “R” de la radiobiología; a saber, la reoxigenación, reparación del ADN, redistribución del ciclo celular, reactivación de la respuesta inmune antitumoral, la repoblación y la radioresistencia intrínseca de las células cancerosas. La oncogénesis del VPH afecta a cada uno de estos componentes: los tumores positivos al VPH muestran una cinética única de hipoxia durante el tratamiento con radiación, el VPH secuestra la maquinaria celular para la reparación del ADN, altera la distribución del ciclo celular de las células infectadas regulando los mediadores de los puntos de control, mayor reclutamiento de linfocitos infiltrantes de tumor e induce una rápida proliferación celular posiblemente mediante la modificación de las CSC [20,69].



1. Conclusiones particulares

Se observó un incremento en el EO en las células transfectadas de manera estable con los oncogenes 16E6 y 18E6 en relación a las células transfectadas con el vector control p3X. Este incremento está caracterizado por el aumento en la producción de ROS, en las proteínas carboniladas y en el daño al ADN, así como la disminución de la proporción GSH/GSSG.

Es posible que el aumento en el EO induzca la activación del factor de transcripción Nrf2, así como el incremento en los niveles y/o actividad de las proteínas antioxidantes que están reguladas por dicho factor como SOD1, SOD2 y CAT (Fig. 24A)

No se observaron cambios en la capacidad proliferativa de las células FaDu transfectadas sin irradiar. Sin embargo, las células que fueron tratadas con 1 Gy de RI ^{137}Cs mostraron una disminución significativa de ~50% en la fracción de supervivencia, la cual se exacerbó en las células FaDu con expresión estable de E6 del VPH-16 y 18 que mostraron una diferencia significativa en la fracción de supervivencia en relación a las que no expresan E6. A diferencia de las células no irradiadas, el nivel de expresión del factor pNrf2 en las células FaDu-16E6 y FaDu-18E6 disminuyó significativamente respecto al control p3X y la expresión de la proteína SOD2 no incremento. Sin embargo, fue mayor la magnitud del incremento de la expresión de SOD1. No se modificaron los niveles de CAT en las células irradiadas (Fig. 24B)

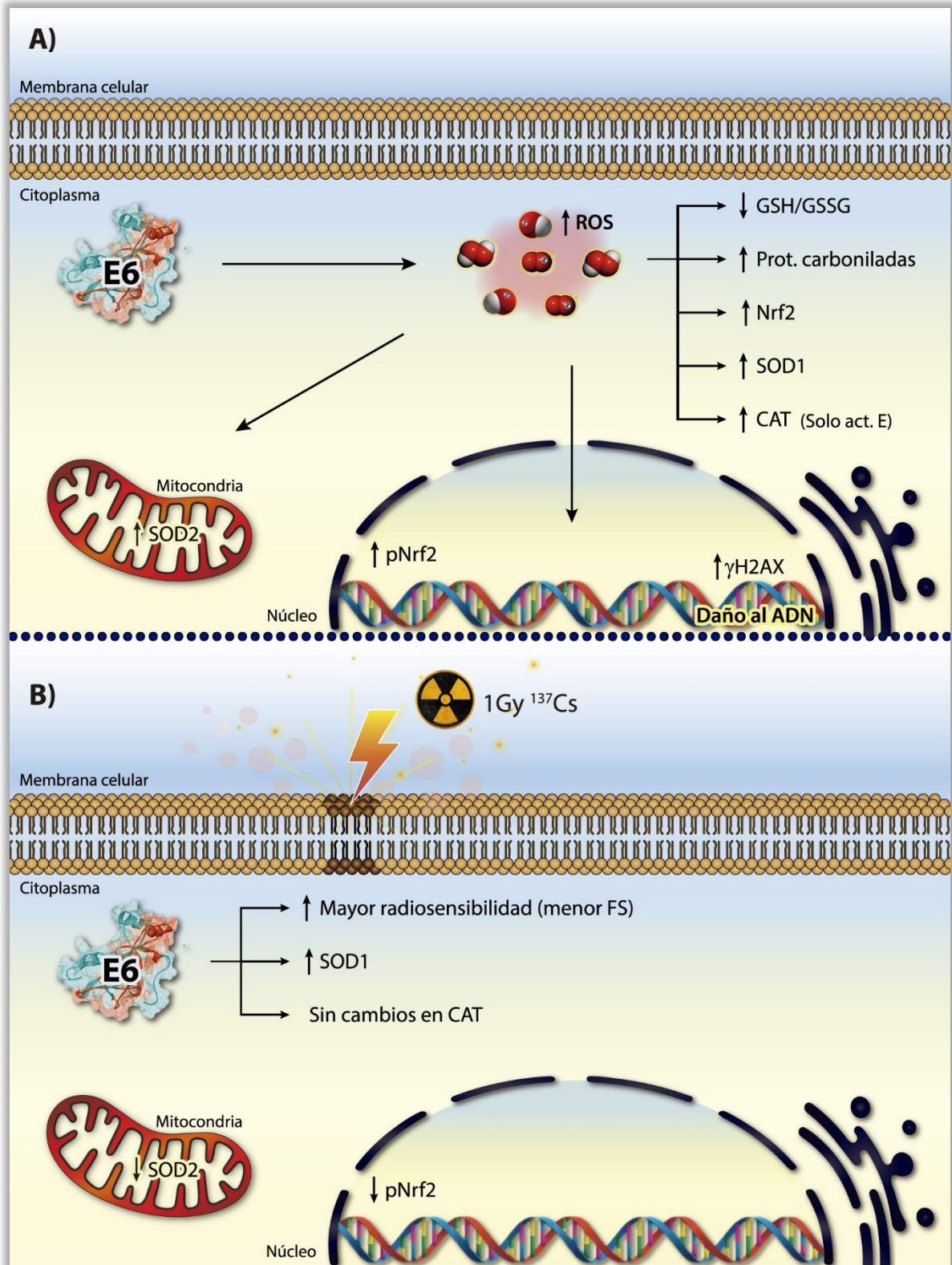


Figura 24. Modulación diferencial del EO en células FaDu transfectadas con los oncogenes E6 del VPH-16 y 18 (A) antes y (B) después de tratarlas con 1 Gy de RI ^{137}Cs .

2. Conclusión general

Las oncoproteínas E6 del VPH 16 y 18 modulan diferencialmente los mecanismos de la regulación redox, incrementando el EO, el daño al ADN así como un incremento de las enzimas antioxidantes. Por otro lado, después de la RI, los oncogenes inducen una menor fracción de supervivencia y reducción de la respuesta antioxidante en comparación con las células no irradiadas. Este trabajo aporta información sobre los mecanismos que podrían regular la radiosensibilidad intrínseca de los tumores asociados a la infección por el VPH.

XI. PERSPECTIVAS



Como principal perspectiva es la evaluación del EO de las células transfectadas con los oncogenes E6 después de la RI.

Adicionalmente, la función de p53 en respuesta a la radioterapia en células infectadas con VPH parece ser altamente controvertido, por lo que su evaluación en células de CECyC es relevante. El silenciamiento con siRNA del oncogen E6 del VPH en líneas celulares positivas al virus podría ayudar a dilucidar la función de p53 con respecto a la radioterapia.

Finalmente, se ha demostrado que las CSC son una variable relevante en la recurrencia y la resistencia a la radioterapia en los CECyC y como tal, su eliminación es necesaria para lograr una remisión permanente. Para lo cual es importante el estudio de las características biológicas que subyacen a estas células en respuesta a la radioterapia y cuál es la función de la oncogénesis mediada por el VPH en parámetros como dinámica poblacional, estado de EO y daño al ADN.



- [1] Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L. (2015). **Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.** *Nature*; 517(7536):576-582. doi:10.1038/nature14129.
- [2] Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. (2018). **The molecular landscape of head and neck cancer.** *Nat Rev Cancer*; 18(5):269-282. doi:10.1038/nrc.2018.11.
- [3] Lu W, Feng L, Li P, *et al.* (2016). **Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells.** *Oncol Rep*;35(1):99-106. doi:10.3892/or.2015.4340.
- [4] Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. (2017). **Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers.** *Head Neck.*; 39(9):1920-1932. doi:10.1002/hed.24848.
- [5] Beck TN, Golemis EA. (2016). **Genomic insights into head and neck cancer.** *Cancers Head Neck*; 1(1). doi:10.1186/s41199-016-0003-z.
- [6] Liu X, Gao XL, Liang XH, Tang YL. (2016). **The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients.** *Oncotarget*; 7(40):66226-66238. doi:10.18632/oncotarget.11265.
- [7] Zaravinos A. (2014) **An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas.** *Oncotarget*; 5(12):3956-3969. doi:10.18632/oncotarget.1934.
- [8] Zhou C, Parsons JL. (2020). **The radiobiology of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma.** *Expert Rev Mol Med*; 22:e3. doi:10.1017/erm.2020.4.
- [9] Ganci F, Sacconi A, Manciocco V, *et al.* (2015). **Radioresistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Possible Molecular Markers for Local Recurrence and New Putative Therapeutic Strategies.** *Contemporary Issues in Head and Neck Cancer Management*; doi:10.5772/60081.
- [10] Liu C, Mann D, Sinha UK, Kokot NC. (2018) **The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): An extensive review.** *J Otolaryngol - Head Neck Surg*; 47(1). doi:10.1186/s40463-018-0302-y.
- [11] Sano D, Oridate N. (2016) **The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Clin Oncol*; 21(5):819-826. doi:10.1007/s10147-016-1005-x.
- [12] Shaikh MH, McMillan NAJ, Johnson NW. (2015) **HPV-associated head and neck cancers in the Asia Pacific: A critical literature review & meta-analysis.** *Cancer Epidemiol*; 39(6):923-938. doi:10.1016/j.canep.2015.09.013.
- [13] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA Cancer J Clin.* 2018. doi:10.3322/caac.21492.
- [14] Perri F, Pacelli R, Della Vittoria Scarpata G, *et al.* (2015). **Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications.** *Head Neck*; 37(5):763-770. doi:10.1002/hed.23837.
- [15] Göttgens EL, Ostheimer C, Span PN, Bussink J, Hammond EM. (2019). **HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer.** *Br J Radiol*; 92(1093). doi:10.1259/bjr.20180047.
- [16] Ho AS, Kraus DH, Ganly I, Lee NY, Shah JP, Morris LGT. (2014). **Decision making in the management of recurrent head and neck cancer.** *Head Neck.* 2014. doi:10.1002/hed.23227.
- [17] Lacko M, Braakhuis BJM, Sturgis EM, *et al.* (2014). **Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 89(1):38-48. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.09.034.

- [18] Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, *et al.* (2013). **New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma.** *Acta Otorhinolaryngol Ital*; 33(2):77-87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853396>. Accessed July 23, 2020.
- [19] Bol V, Grégoire V. (2014). **Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers.** *Biomed Res Int*; doi:10.1155/2014/696028.
- [20] Cleary C, Leeman JE, Higginson DS, *et al.* (2016). **Biological Features of Human Papillomavirus-related Head and Neck Cancers Contributing to Improved Response.** *Clin Oncol*; 28(7):467-474. doi:10.1016/j.clon.2016.03.001.
- [21] Chandel V, Raj S, Kumar P, *et al.* (2020). **Metabolic regulation in HPV associated head and neck squamous cell carcinoma.** *Life Sci*; 258. doi:10.1016/j.lfs.2020.118236.
- [22] Joseph AW, D'Souza G. (2012). **Epidemiology of Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer.** *Otolaryngol Clin North Am.* doi:10.1016/j.otc.2012.04.003.
- [23] O'Rorke MA, Ellison M V., Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. (2012). **Human papillomavirus related head and neck cancer survival: A systematic review and meta-analysis.** *Oral Oncol.* 2012;48(12):1191-1201. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.06.019.
- [24] Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY. (2015). **Genetic landscape of human papillomavirus-associated head and neck cancer and comparison to tobacco-related tumors.** *J Clin Oncol*; 33(29):3227-3234. doi:10.1200/JCO.2015.62.1086.
- [25] Reid P, Marcu LG, Olver I, Moghaddasi L, Staudacher AH, Bezak E. (2019). **Diversity of cancer stem cells in head and neck carcinomas: The role of HPV in cancer stem cell heterogeneity, plasticity and treatment response.** *Radiother Oncol*; 135:1-12. doi:10.1016/j.radonc.2019.02.016.
- [26] Jou A, Hess J. (2017). **Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer.** *Oncol Res Treat*; 40(6):328-332. doi:10.1159/000477127.
- [27] Kofler B, Laban S, Busch CJ, Lörintz B, Knecht R. (2014). **New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer.** *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*; 271(7):1861-1867. doi:10.1007/s00405-013-2603-0.
- [28] Andersen AS, Koldjær Sølling AS, Ovesen T, Rusan M. (2014). **The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Cancer*; 134(12):2755-2763. doi:10.1002/ijc.28411.
- [29] Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, *et al.* (2015). **Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas.** *Clin Cancer Res*; 21(3):632-641. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3310.
- [30] Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. (2014). **The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas.** *Oral Oncol.* doi:10.1016/j.oraloncology.2013.09.008.
- [31] Mirghani H, Amen F, Tao Y, Deutsch E, Levy A. (2015). **Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives.** *Cancer Treat Rev.* 2015;41(10):844-852. doi:10.1016/j.ctrv.2015.10.001.
- [32] Dillon MT, Harrington KJ. (2015). **Human papillomavirus-negative pharyngeal cancer.** *J Clin Oncol*; 33(29):3251-3261. doi:10.1200/JCO.2015.60.7804.
- [33] Özcan-Wahlbrink M, Schiffers C, Riemer AB. (2019). **Enhanced Radiation Sensitivity of Human Papillomavirus-Driven Head and Neck Cancer: Focus on Immunological Aspects.** *Front Immunol*; 10. doi:10.3389/fimmu.2019.02831.

- [34] Mallen-St Clair J, Alani M, Wang MB, Srivastan ES. (2016). **Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease.** *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*; 1866(2):141-150. doi:10.1016/j.bbcan.2016.07.005.
- [35] Altioirem. **Amigdalectomía intracapsular con bisturí de plasma.** <https://altioirem.com/informacion-pacientes-cirugias/amigdalectomia/amigdalectomia/>. Accessed October 16, 2020.
- [36] Roberts S, Evans D, Mehanna H, Parish JL. (2019). **Modelling human papillomavirus biology in oropharyngeal keratinocytes.** *Philos Trans R Soc B Biol Sci*; 374(1773):20180289. doi:10.1098/rstb.2018.0289.
- [37] Rothenberg SM, Ellisen LW. (2012). **The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma.** *J Clin Invest*; 122(6):1951-1957. doi:10.1172/JCI59889.
- [38] Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. (2017). **Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer.** *Ann Oncol*; 28(10):2386-2398. doi:10.1093/annonc/mdx304.
- [39] Vidal L, Gillison ML. (2008). **Human Papillomavirus in HNSCC: Recognition of a Distinct Disease Type.** *Hematol Oncol Clin North Am*; 22(6):1125-1142. doi:10.1016/j.hoc.2008.08.006.
- [40] Ow TJ, Pitts CE, Kabarriti R, Garg MK. (2015). **Effective biomarkers and radiation treatment in head and neck cancer.** *Arch Pathol Lab Med*; 139(11):1379-1388. doi:10.5858/arpa.2014-0574-RA.
- [41] Foppoli C, De Marco F, Cini C, Perluigi M. (2015). **Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm.** *Biochim Biophys Acta Gen Subj*; 1850(8):1622-1632. doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.016.
- [42] Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI, *et al.* (2018). **New insights in the pathogenesis of HPV infection and the associated carcinogenic processes: The role of chronic inflammation and oxidative stress.** *J Immunol Res*; doi:10.1155/2018/5315816.
- [43] Song S, Gong S, Singh P, Lyu J, Bai Y. (2018). **The interaction between mitochondria and oncoviruses.** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*; 1864(2):481-487. doi:10.1016/j.bbadis.2017.09.023.
- [44] Choi YB, Harhaj EW. (2014). **Functional implications of mitochondrial reactive oxygen species generated by oncogenic viruses.** *Front Biol (Beijing)*; 9(6):423-436. doi:10.1007/s11515-014-1332-0.
- [45] Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. (2019). **Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy.** *J Cell Biochem*; 120(5):6868-6877. doi:10.1002/jcb.28007.
- [46] Doorbar J, Quint W, Banks L, *et al.* (2012). **The biology and life-cycle of human papillomaviruses.** *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.083.
- [47] López S. A, Lizano S. M. (2006). **Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina.** *Unidad Investig Biomédica en Cáncer UNAM - INCan.*
- [48] Spriggs CC, Laimins LA. (2017). **Human papillomavirus and the DNA damage response: Exploiting host repair pathways for viral replication.** *Viruses*. doi:10.3390/v9080232.
- [49] Krause M, Dubrovskaya A, Linge A, Baumann M. (2017). **Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments.** *Adv Drug Deliv Rev*; 109:63-73. doi:10.1016/j.addr.2016.02.002.
- [50] Cruz-Gregorio A, Martínez-Ramírez I, Pedraza-Chaverri J, Lizano M. (2019). **Reprogramming of energy metabolism in response to radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma.** *Cancers (Basel)*; 11(2). doi:10.3390/cancers11020182.
- [51] Olmedo-Nieva L, Muñoz-Bello JO, Contreras-Paredes A, Lizano M. (2018). **The role of E6 spliced isoforms (E6*) in Human Papillomavirus-induced carcinogenesis.** *Viruses*; 10(1). doi:10.3390/v10010045.

- [52] Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, Lizano M. (2018). **Cellular redox, cancer and human papillomavirus**. *Virus Res*. doi:10.1016/j.virusres.2018.01.003.
- [53] Hall EJ, Giaccia AJ. **Radiobiology for the Radiologist**: Seventh Edition.; 2012.
- [54] Tang L, Wei F, Wu Y, *et al.* (2018). **Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods**. *J Exp Clin Cancer Res*; 37(1). doi:10.1186/s13046-018-0758-7.
- [55] Chen X, Mims J, Huang X, *et al.* (2018). **Modulators of redox metabolism in head and neck cancer**. *Antioxidants Redox Signal*; 29(16):1660-1690. doi:10.1089/ars.2017.7423.
- [56] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W, Baskar R, Phil M. (2012). **Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions**. *Int J Med Sci*; 9(3):193-199. doi:10.7150/ijms.3635.
- [57] Orth M, Lauber K, Niyazi M, *et al.* (2014). **Current concepts in clinical radiation oncology**. *Radiat Environ Biophys*; 53(1): 1–29. doi:10.1007/s00411-013-0497-2.
- [58] University D. (2020). **What is Cancer? Mission to Mars**. <https://sites.duke.edu/missiontomars/the-mission/cancer/what-is-cancer/>. Accessed October 16, 2020.
- [59] Somosy Z. (2000). **Radiation response of cell organelles**. *Micron*.; 31(2):165-181. doi:10.1016/S0968-4328(99)00083-9.
- [60] Pizarro T. (2016). **LQlab, una solución informática para el análisis y mejora de los tratamientos en radioterapia desde un punto de vista radiobiológico**.
- [61] Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. (2012). **Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols**. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*; 1822(5):737-747. doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.005.
- [62] Jiang B, Xiao S, Khan MA, Xue M. (2013). **Defective antioxidant systems in cervical cancer**. *Tumor Biol*; 34(4):2003-2009. doi:10.1007/s13277-013-0804-1.
- [63] De Marco F. (2013). **Oxidative stress and HPV carcinogenesis**. *Viruses*; 5(2):708-731. doi:10.3390/v5020708.
- [64] Zhang Y, Martin SG. (2014). **Redox Proteins and Radiotherapy**. *Clin Oncol*; 26(5):289-300. doi:10.1016/j.clon.2014.02.003.
- [65] Kim EK, Jang M, Song MJ, Kim D, Kim Y, Jang HH. (2019). **Redox-mediated mechanism of chemoresistance in cancer cells**. *Antioxidants*; 8(10). doi:10.3390/antiox8100471.
- [66] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007). **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. *Int J Biochem Cell Biol*. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- [67] Damiano S, Sozio C, La Rosa G, *et al.* (2020). **Metabolism Regulation and Redox State: Insight into the Role of Superoxide Dismutase 1**. *Int J Mol Sci*; 21(18):6606. doi:10.3390/ijms21186606.
- [68] Cruz-Gregorio A, Aranda-Rivera AK, Pedraza-Chaverri J. (2020). **Human Papillomavirus-related Cancers and Mitochondria**. *Virus Res*; 286:198016. doi:10.1016/j.virusres.2020.198016.
- [69] Ramesh PS, Devegowda D, Singh A, Thimmulappa RK. (2020). **NRF2, p53, and p16: Predictive biomarkers to stratify human papillomavirus associated head and neck cancer patients for de-escalation of cancer therapy**. *Crit Rev Oncol Hematol*; 148. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.102885.
- [70] May OL. (2020). **Nrf2 Antioxidant Stress Response. News & Announcements. Cayman Chemical**. <https://www.caymanchem.com/news/nrf2-antioxidant-stress-response>. Accessed October 17, 2020.
- [71] Robbins D, Zhao Y. (2014). **Manganese superoxide dismutase in cancer prevention**. *Antioxidants Redox Signal*; 20(10):1628-1645. doi:10.1089/ars.2013.5297.

- [72] Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, González-García MC, *et al.* (2018). **Human papillomavirus types 16 and 18 early-expressed proteins differentially modulate the cellular redox state and DNA damage.** *Int J Biol Sci.* doi:10.7150/ijbs.21547.
- [73] Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. (2014). **Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage.** *J Virol.* doi:10.1128/jvi.03355-13.
- [74] Marullo R, Werner E, Zhang H, Chen GZ, Shin DM, Doetsch PW. (2015). **HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells.** *Carcinogenesis.* doi:10.1093/carcin/bgv126.
- [75] Olmedo-Nieva L. (2014). **Efecto de las proteínas E6 y E6*I de VPH-18 en la modulación de proteínas blanco de la vía de Wnt.** UNAM.
- [76] Irazusta V, Moreno-Cermeño A, Ros J, *et al.* (2008). **Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas.** *Proteómica Rev la Soc Española Proteómica.*
- [77] Aebi H. (1984). **Catalase in Vitro.** *Methods Enzymol;* 105(C):121-126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [78] Freshney RI. (2011). **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.** Sixth Edition. doi:10.1002/9780470649367.
- [79] Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. (2005). **Clonogenic cell survival assay.** *Methods Mol Med.* doi:10.1385/1-59259-869-2:021.
- [80] Bodgi L, Canet A, Pujó-Menjouet L, Lesne A, Victor JM, Foray N. (2016). **Mathematical models of radiation action on living cells: From the target theory to the modern approaches. A historical and critical review.** *J Theor Biol.* doi:10.1016/j.jtbi.2016.01.018.
- [81] Kuo LJ, Yang LX. (2008). **γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks.** *In Vivo (Brooklyn).*
- [82] Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. (2015). **Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells.** *Free Radic Biol Med.* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017.
- [83] Saleh EM. (2015). **Inhibition of topoisomerase II α sensitizes FaDu cells to ionizing radiation by diminishing DNA repair.** *Tumor Biol;* 36(11):8985-8992. doi:10.1007/s13277-015-3587-8.
- [84] Matzinger O, Viertl D, Tsoutsou P, *et al.* (2015). **The radiosensitizing activity of the SMAC-mimetic, Debio 1143, is TNF α -mediated in head and neck squamous cell carcinoma.** *Radiotherapy and Oncology.* Vol 116. Elsevier Ireland Ltd: 495-503. doi:10.1016/j.radonc.2015.05.017.
- [85] Stepanenko AA, Heng HH. (2017). **Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts.** *Mutat Res - Rev Mutat Res;* 773:91-103. doi:10.1016/j.mrrev.2017.05.002.
- [86] Vogel C, Marcotte EM. (2012). **Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.** *Nat Rev Genet;* 13(4):227-232. doi:10.1038/nrg3185.
- [87] Vogel C, De Sousa Abreu R, Ko D, *et al.* (2010). **Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line.** *Mol Syst Biol;* 6:400. doi:10.1038/msb.2010.59.
- [88] Jin Y, Li Y, Wang X, Yang Y. (2019). **Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses HPV E6-expressing HNSCC progression by mediating NF- κ B and Akt pathways.** *Cancer Cell Int;* 19(1):220. doi:10.1186/s12935-019-0942-7.
- [89] Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, *et al.* (2009). **Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer.** *Arch Otolaryngol Head Neck Surg;* 135(11):1137-1146. doi:10.1001/archoto.2009.159.

- [90] Nagel R, Martens-De Kemp SR, Buijze M, Jacobs G, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. (2013). **Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines.** *Oral Oncol*; 49(6):560-566. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.03.446.
- [91] Arenz A, Ziemann F, Mayer C, *et al.* (2014). **Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis.** *Strahlentherapie und Onkol*; 190(9):839-846. doi:10.1007/s00066-014-0605-5.
- [92] Dok R, Kalev P, Van Limbergen EJ, *et al.* (2014). **P16INK4a impairs homologous recombination-mediated DNA repair in human papillomavirus-positive head and neck tumors.** *Cancer Res*; 74(6):1739-1751. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2479.
- [93] Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, *et al.* (2013). **HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity.** *Radiother Oncol*; 107(2):242-246. doi:10.1016/j.radonc.2013.03.013.
- [94] Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, *et al.* (2013). **Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer.** *Cancer Res*; 73(15):4791-4800. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0587.
- [95] Zhang M, Hong AM. (2020). **The human papillomavirus confers radiosensitivity in oropharyngeal cancer cells by enhancing DNA double strand break.** *Oncotarget*; 11(16):1417-1426. doi:10.18632/oncotarget.27535.
- [96] Reid P, Staudacher AH, Marcu LG, *et al.* (2020). **Intrinsic Radiosensitivity Is Not the Determining Factor in Treatment Response Differences between HPV Negative and HPV Positive Head and Neck Cancers.** *Cells*. 2020;9(8). doi:10.3390/cells9081788.
- [97] Deweese TL, Walsh JC, Dillehay LE, *et al.* (1997). **Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter cell cycle progression but not radiosensitivity of carcinoma cells treated with low-dose-rate radiation.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 37(1):145-154. doi:10.1016/S0360-3016(96)00448-8.
- [98] Pang E, Delic NC, Hong A, Zhang M, Rose BR, Lyons JG. (2011). **Radiosensitization of oropharyngeal squamous cell carcinoma cells by human papillomavirus 16 oncoprotein E6I.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 79(3):860-865. doi:10.1016/j.ijrobp.2010.06.028.
- [99] Cruz-Gregorio A, Aranda-Rivera AK, Aparicio-Trejo OE, Coronado-Martínez I, Pedraza-Chaverri J, Lizano M. (2019). **E6 oncoproteins from high-risk human papillomavirus induce mitochondrial metabolism in a head and neck squamous cell carcinoma model.** *Biomolecules*; 9(8). doi:10.3390/biom9080351.
- [100] Warowicka A, Kwasniewska A, Gozdzicka-Jozefiak A. (2013). **Alterations in mtDNA: A qualitative and quantitative study associated with cervical cancer development.** *Gynecol Oncol*; 129(1):193-198. doi:10.1016/j.ygyno.2013.01.001.
- [101] Chen Wongworawat Y, Filippova M, Williams VM, Filippov V, Duerksen-Hughes PJ. (2016). **Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes.** *Am J Cancer Res*; 6(4):764-780. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186429>.
- [102] Lai D, Tan CL, Gunaratne J, *et al.* (2013). **Localization of HPV-18 E2 at Mitochondrial Membranes Induces ROS Release and Modulates Host Cell Metabolism.** *PLoS One*; 8(9). doi:10.1371/journal.pone.0075625.
- [103] Hochmann J, Parietti F, Martínez J, *et al.* (2020). **Human papillomavirus type 18 e5 oncoprotein cooperates with e6 and e7 in promoting cell viability and invasion and in modulating the cellular redox state.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 115. doi:10.1590/0074-02760190405.

- [104] de Marco F, Bucaj E, Foppoli C, *et al.* (2012). **Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: Redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues.** PLoS One; 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0034366.
- [105] Ma X, Zhang J, Liu S, Huang Y, Chen B, Wang D. (2012). **Nrf2 knockdown by shRNA inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy in cervical cancer.** Cancer Chemother Pharmacol; 69(2):485-494. doi:10.1007/s00280-011-1722-9.
- [106] Namani A, Matiur Rahaman M, Chen M, Tang X. (2018). **Gene-expression signature regulated by the KEAP1-NRF2-CUL3 axis is associated with a poor prognosis in head and neck squamous cell cancer.** BMC Cancer; 18(1):46. doi:10.1186/s12885-017-3907-z.
- [107] Noman ASM, Parag RR, Rashid MI, *et al.* (2020). **Widespread expression of Sonic hedgehog (Shh) and Nrf2 in patients treated with cisplatin predicts outcome in resected tumors and are potential therapeutic targets for HPV-negative head and neck cancer.** Ther Adv Med Oncol; 12. doi:10.1177/1758835920911229.
- [108] Carrillo-Beltrán D, Muñoz JP, Guerrero-Vásquez N, *et al.* (2020). **Human papillomavirus 16 E7 promotes EGFR/PI3K/AKT1/NRF2 signaling pathway contributing to PIR/NF-κB activation in oral cancer cells.** Cancers (Basel); 12(7):1-22. doi:10.3390/cancers12071904.
- [109] Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. (2018). **NRF2 and the Hallmarks of Cancer.** Cancer Cell; 34(1):21-43. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.022.
- [110] Kim YS, Vallur PG, Phaëton R, Mythreye K, Hempel N. (2017). **Insights into the dichotomous regulation of SOD2 in cancer.** Antioxidants. doi:10.3390/antiox6040086.
- [111] Hempel N, M. Carrico P, Melendez JA. (2012). **Manganese Superoxide Dismutase (Sod2) and Redox-Control of Signaling Events That Drive Metastasis.** Anticancer Agents Med Chem; 11(2):191-201. doi:10.2174/187152011795255911.
- [112] Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, *et al.* (2018). **Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer.** Oncotarget; 9(31):21630-21640. doi:10.18632/oncotarget.24850.
- [113] Balasubramanian N, Subramanian S, Govindasamy S. (1994). **Status of antioxidant systems in human carcinoma of uterine cervix.** Cancer Lett; 87(2):187-192. doi:10.1016/0304-3835(94)90221-6
- [114] Shim JH, Cho KJ, Lee KA, *et al.* (2005). **E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase.** Proteomics; 5(8):2112-2122. doi:10.1002/pmic.200401106.
- [115] Shim JH, Kim KH, Cho YS, *et al.* (2008). **Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene.** Amino Acids; 34(1):135-141. doi:10.1007/s00726-007-0499-y.
- [116] Liu Y, Guo JZ, Liu Y, *et al.* (2018). **Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α-hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth.** Nat Commun; 9(1). doi:10.1038/s41467-018-06841-7.



Article

E6 Oncoproteins from High-Risk Human Papillomavirus Induce Mitochondrial Metabolism in a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Model

Alfredo Cruz-Gregorio ¹ , Ana Karina Aranda-Rivera ^{1,2} , Omar Emiliano Aparicio-Trejo ³,
Iris Coronado-Martínez ^{1,4}, José Pedraza-Chaverri ^{3,*}  and Marcela Lizano ^{1,5,*} 

¹ Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, México/Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, Ciudad de México 14080, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

³ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

⁴ Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

⁵ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico

* Correspondence: pedraza@unam.mx (J.P.-C.); lizanosoberon@gmail.com (M.L.); Tel.: +51-5622-3878 (J.P.-C.); +51-5628-0400 (ext. 31035) (M.L.)

Received: 22 July 2019; Accepted: 6 August 2019; Published: 8 August 2019



Abstract: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells that are positive for human papillomavirus (HPV+) favor mitochondrial metabolism rather than glucose metabolism. However, the involvement of mitochondrial metabolism in HNSCC HPV+ cells is still unknown. The aim of this work was to evaluate the role of E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 in the mitochondrial metabolism in an HNSCC model. We found that E6 from both viral types abates the phosphorylation of protein kinase B-serine 473 (pAkt), which is associated with a shift in mitochondrial metabolism. E6 oncoproteins increased the levels of protein subunits of mitochondrial complexes (I to IV), as well as the ATP synthase and the protein levels of the voltage dependent anion channel (VDAC). Although E6 proteins increased the basal and leak respiration, the ATP-linked respiration was not affected, which resulted in mitochondrial decoupling. This increase in leak respiration was associated to the induction of oxidative stress (OS) in cells expressing E6, as it was observed by the fall in the glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) rate and the increase in reactive oxygen species (ROS), carbonylated proteins, and DNA damage. Taken together, our results suggest that E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 are inducers of mitochondrial metabolism.

Keywords: HNSCC; HPV16 and HPV18 E6 oncoproteins; mitochondrial metabolism; oxidative stress; DNA damage; cellular respiration; mitochondrial decoupling; oxidative phosphorylation

1. Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has the sixth place of cancer death and the fourth place of cancer prevalence worldwide, being more predominant in males than in females, presenting a 3:1 ratio [1]. HNSCC is associated with alcohol consumption, smoking, and infection with human papillomavirus (HPV), mainly types 16 and 18, which contribute up to 95% of HNSCC HPV-positive (HPV+) cases [2]. HNSCC HPV+ cases have increased in the last few years [2,3].

HNSCC HPV+ differ from HPV negative (HPV−) cases in genomic profiles, etiology, epidemiology, response to treatments, DNA damage response (DDR), and metabolic processes [4–8]. It has been shown that HNSCC HPV− cells prefer glucose metabolism, rather than oxidative phosphorylation (OXPHOS), in comparison with HNSCC HPV+, which favor OXPHOS [9–11]. However, why mitochondrial metabolism prevails in HPV+ cells remains unknown.

Otto Warburg hypothesized that some cancer cell types reprogram their metabolism, favoring the metabolism of glucose (Warburg effect) instead of OXPHOS, because the mitochondria of these cells are damaged [12]. However, it has been shown in other tumor cell types that their mitochondria are intact and fully functional [13]. Moreover, mitochondria are essential for inducing and maintaining the tumoral profile, by performing bioenergetic and biosynthetic processes, such as tricarboxylic acid (TCA) cycle, electron transport system (ETS), OXPHOS, fatty acid oxidation (FAO), synthesis of amino acids, lipids, nucleotides, heme and iron sulfur groups, even in cell death regulation via apoptosis [13,14]. Thus, mitochondria undertake critical functions for metabolism, growth, and cell survival, maintaining a key role in cancer [15].

During HPV infection, the HPV genome can be integrated into the genome of host cells, which promotes the overexpression of the E6 and E7 oncoproteins mainly by the break or deletion of the open reading frame of the viral transcriptional regulator E2 [16,17]. The HPV viral oncoproteins E7 and E6 promote the immortalization and the transformation of host cells through the interaction with a myriad cellular key proteins, such as pRb and p53, respectively, which promotes their degradation [18–20]. Moreover, it has been demonstrated that E6 augments the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress (OS) [21,22], which is associated with cell transformation [23,24]. On the other hand, mitochondria are the main organelles that produce ROS, with ETS being an important ROS source [25]. The increase in ROS production may activate transcriptional factors that involved in the antioxidant response such as the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and the forkhead box O3 (FoxO3a), increasing antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase (SOD), and thioredoxin (Trx) to regulate ROS levels [26,27]. However, OS appears if the antioxidant defense is overwhelmed, which causes damage in the DNA, in proteins, lipids, and carbohydrates [28,29]. We hypothesized that E6 influences the phenotype of HNSCC HPV+ cells by altering mitochondrial metabolism since E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 generate OS and have a crucial role in the transformation of host cells, which induces OS and DNA damage. Thus, the aim of this work was to evaluate the role of E6 oncoproteins in mitochondrial metabolism in a head and neck cancer cell model. We found that E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 favor the mitochondrial oxygen consumption and the increase in mitochondrial mass, which was associated with a decrease in the phosphorylation of protein kinase B (Akt) in serine 473 (pAkt). Although E6 increased the basal respiration, the ATP-linked respiration (or OXPHOS linked respiration) was not significantly affected. Nevertheless, E6 proteins increased the respiration leak and mitochondrial decoupling, which was associated with the induction of OS and the increase in DNA damage that were observed in the HPV16 E6 expressing cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The FaDu epithelial cell line was acquired from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) that was supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) in a humidified incubator with 5% CO₂.

2.2. Plasmids

The HPV16 and HPV18 E6 open reading frames were cloned into the p3XFLAG-CMV10 vector (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by standard PCR techniques. p3XFLAG-CMV10 vector harbors an ampicillin resistance cassette, a geneticin resistance marker, and a CMV promoter. This plasmid

encodes three adjacent FLAG[®] epitopes (Asp-Tyr-Lys-Xaa-Xaa-Asp) for its detection while using the ANTI-FLAG M2 antibody.

2.3. Stable Transfections

FaDu epithelial cells were stably transfected with the empty vector (p3X), or plasmids expressing E6 from HPV16 or HPV18. For this, the cells were seeded and transfected in 24-well plates (4×10^4 cells per well) with 2.5 μ g of each plasmid, while using 2.5 μ L of PolyFect Transfection reagent (Qiagen, Hyliden, Germany), according to the manufacturer's instructions. 24 h post-transfection, for stable selection cells were incubated with 600 μ M of Geneticin (G-418, Sigma-Aldrich), for a month. After this time, clones were selected for each condition and they were grown to perform corresponding assays. The expression of the E6 protein was verified for each clone through immunoblot.

2.4. Chemicals

Antimycin, dihydroethidium (DHE), sodium L-ascorbate, sodium azide (NaN₃), 5,5'-dithio-bis (2 nitrobenzoic) acid (DTNB), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), sodium L-ascorbate, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, glutathione reductase (GR), tetramethyl-*p*-phenylene diamine (TMPD), diphenylene iodonium (DPI), horseradish peroxidase (HRP), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), nitroblue tetrazolium (NBT), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), rotenone, sodium succinate dibasic, rotenone, sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄), sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), sodium dodecyl sulfate (SDS), oligomycin, xanthine, *N,N,N,N*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) triethanolamine, xanthine oxidase, and 2-vinylpyridine (2-VP) were purchased from Sigma-Aldrich. Ethanol, hydrochloric acid, ethylacetate, and trichloroacetic acid, hydrogen peroxide (H₂O₂), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) were obtained from JT Baker (Xalostoc, Edo. Mexico, Mexico). Acrilamide/Bis was purchased from Bio-Rad (Hercules, California, USA). The protease inhibitor cocktail was purchased from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from ATCC. MitoSOX[™] Red was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). 2-Morpholin-4-yl-8-phenylchromen-4-one (LY 294002) was purchased from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

2.5. Cell Viability

The viability of FaDu cells stably transfected with the different plasmids was evaluated by their mitochondrial activity, using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. MTS is reduced to formazan salt by the activity of mitochondrial dehydrogenases. The formazan salt was quantified by measuring its absorbance at 490 nm and the absorbance is directly proportional to the viable cells. Cell viability was expressed as a percentage of MTS reduction to formazan salt.

2.6. Cell Respirometry.

The oxygen consumption experiments in intact cells was performed while using a high resolution respirometry equipment O2k meter (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), as previously described [30]. Briefly, measures in stably transfected cells were made using 2 mL of culture medium with 10% FBS. Each experiment was initiated by the addition of the cells; the respiratory parameters were defined as: 1. Basal respiration, corresponding to the oxygen consumption in presence of cells. 2. Leak of the respiration, corresponding to cellular oxygen consumption in presence of 5 μ M oligomycin. 3. Respiratory control index (RCI) corresponding to the ratio basal/leak. 4. ATP-linked respiration or OXPHOS linked respiration was calculated by the formula: Basal/Routine-Leak. All of the parameters were corrected by subtracting the non-mitochondrial respiration, which was obtained

by the addition of 2 μM rotenone plus 11.25 μM diphenyleneiodonium chloride plus 5 μM antimycin A, and normalized by the number of cells.

2.7. Complex I (CI) Linked Respiration and Complex IV (CIV) Activity

CI linked respiration was measured, as previously described [31]. Briefly, we determined the CI linked respiration resting the basal respiration minus the basal respiration inhibited with 2 μM rotenone. The activity of CIV was evaluated in whole cells in culture medium that was supplemented with 2 μM rotenone plus 5 μM antimycin A, the CIV was stimulated by the addition of 0.5 mM TMPD plus 2 mM sodium L-ascorbate and it was corrected by oxygen consumption in the presence of the appropriate inhibitor (100 mM NaN_3). The number of cells normalized the results.

2.8. Western Blot Analysis

The protein extracts were obtained by adding lysis buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%) to the cells, which were scraped and lysed by pipetting and boiling. Equal amounts of protein were loaded and separated in SDS-PAGE; subsequently, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and then incubated with the proper primary antibody. The membranes were blocked while using 5% milk in tris-buffer saline with tween 20 (TBS/T) buffer. Primary antibodies were prepared in TBS/T buffer in the following concentrations: anti-glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 1:1000 (SC-32233, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA); anti-actinin 1:1000 (SC-17829, Santa Cruz Biotechnologies); anti-SOD2 1:1000 (#13141, Cell Signaling); anti-SOD1 1:1000 (#4266, Cell Signaling); anti-Akt 1:2000 (#2920, Cell Signaling); anti-phospho-Nrf2 Ser40 (pNrf2) 1:500 (ab76026, Abcam, Cambridge, UK); anti-phospho-Akt (Ser473) 1:2000 (#4060, Cell Signaling); anti-FoxO3a 1:1000 (#99199, Cell Signaling); Glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) 1:500 (ab55436, Abcam); anti-catalase 1:500 (#12980, Cell Signaling); anti-gamma H2A histone family member X (γH2AX) 1:1000 (clone JBW301, Merck Millipore Upstate, Burlington, MA, USA); anti-FLAG M2 1:2000 (F1804, Sigma-Aldrich); anti-voltage dependent anion channel (VDAC) 1:1000 (sc-390996, Santa Cruz Biotechnologies); and, anti-total OXPHOS cocktail 1:1000 (ab110413, Abcam), which targets the following proteins: subunit of Complex I (NDUFB8-20 kD), subunit of Complex II (SDHB-30kD), subunit Complex III-Core protein 2 (UQCRC2-48 kD), subunit Complex IV subunit I (MTCO1-40 kD), and subunit Complex V alpha (ATP5A-55 kD). The membranes were washed three times with PBS/T and then incubated with horseradish peroxidase (HRP) coupled to secondary anti-mouse or rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnologies). Membranes were finally developed using the Chemo Luminescent Reagent (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), accordingly to the manufacturer's instructions. Densitometric analysis was performed while using the ImageJ program ver.1.48h3, National Institutes of Health (NIH).

2.9. ROS Quantification

ROS production was measured while using the fluorescent probe, MitoSOXTM Red, dihydroethidium (DHE) and 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA), as previously described by Pedraza-Chaverri et al. [32]. MitoSOXTM Red is a highly selective fluorogenic dye for mitochondrial superoxide. DHE is oxidized to 2-hydroxyethidium (2-OH-Et) and ethidium (Et) in the cytosol by superoxide anion. Both of the compounds are then retained in the nucleus, which is then stained, due to their DNA binding capacity. H_2DCFDA is a cell-permeable non-fluorescent probe that is de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation by ROS. Subsequently, ROS was identified as a red and green fluorescent signal at the microscope and then quantified by fluorometry. Stably transfected cells were seeded and after forty-eight 5 μM MitoSOXTM Red, 15 μM DHE and 15 μM H_2DCFDA were independently added to culture media without phenol red, incubating for 30 min. at 37 °C. The quantitative data of ROS and cell images were collected through the CytationTM 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader from Biotek (Winoosky, VT, USA), which combines digital wide field microscopy with a conventional multi-mode microplate, which provides high

sensitivity in ROS quantification. Thus, cellular ROS production was visualized and measured at 510 nm excitation and at 580 nm emission for MitoSOX™ Red; at 510 nm excitation and 590 nm emission for DHE and 480 nm excitation and at 520 nm emission for DCF. ROS were visualized and then quantified in three independent experiments, while using Gen5™ 3.0 software (<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>, Biotek) for data acquisition and analysis.

2.10. Protein Carbonyls

Protein carbonyls were evaluated, as previously described by Levine et al. [33]. Briefly, the cell extracts were incubated with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine for 1 h, and then proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid. Proteins were washing fourth times with an ethanol-ethyl acetate mixture (1:1 *v/v*), solubilized in 6 M guanidine hydrochloride, and the absorbance was measured at 370 nm.

2.11. GSH and GSSG Quantification

Total glutathione [glutathione (GSH) + glutathione disulfide (GSSG)] was measured by the enzymatic recycling method that was described by Rahman et al. [34], in which GSH is oxidized by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB, detectable at $\lambda = 412$ nm) and TNB glutathione adducts (GS-TNB). Both GS-TNB and GSSG are reduced by glutathione reductase (GR) in the presence of NADPH, to GSH, which in turn is oxidized by DTNB to TNB. Thus, the amount of total glutathione calculated represents the sum of GSH and GSSG. Subsequently, GSSG was evaluated by the enzymatic recycling method that was mentioned above, where samples were previously treated with 2-vinylpyridine (2-VP). 2-VP, that can covalently associate with GSH, remove all reduced glutathione, leaving the oxidized form of glutathione as the only measurable substrate of the assay. Finally, GSH was calculated by subtracting GSSG from the total glutathione (GSH + GSSG). Briefly, the cell extract of each transfection was diluted with 200 μ L of potassium phosphate EDTA (KPE) buffer (0.1 M potassium phosphate, 5 mM disodium EDTA, pH 7.5). Afterwards, two separate samples of 20 μ L each and treated with 2-VP, were used to measure either total glutathione or GSSG, mixed with DTNB (2.5 mM) and GR (250 U/mL). Finally, β -NADPH was added and the absorbance at $\lambda = 412$ nm was measured at intervals of 60 secs, for 2 min. The rate of change in absorbance for each experiment was compared with the GSH or GSSG standards.

2.12. Antioxidant Enzyme Activity Assays

The antioxidant enzyme activities were evaluated, as previously described by Cruz-Gregorio et al. [21]. Briefly, SOD activity was spectrophotometrically measured at 560 nm based on nitro blue tetrazolium (NBT) reduction to formazan. The level of protein that inhibits NBT reduction to 50% was defined as one unit of superoxide dismutase (SOD) activity, including the activity of SOD1 and SOD2. Catalase activity was assayed at 240 nm by a method that is based on the decomposition of H₂O₂ by catalase contained in the samples. Units of catalase enzymatic activity are expressed as K/mg protein, as previously described by Aebi [35].

2.13. Statistical Analysis

All of the experiments were done in triplicate and the data were analyzed as the mean \pm SD. ANOVA and the Tukey's test were used to determine the statistical significance of the experimental condition versus the control.

3. Results

3.1. E6 Oncoproteins Reduce pAkt

Fadu cells were stably transfected with E6 oncoprotein of human papillomavirus 16 or 18 (16E6 or 18E6). Similar E6 protein levels were observed in different clones, as demonstrated by immunoblot through the expression of E6 and E6* (E6 spliced product) from 16E6 and 18E6 in FaDu-transfected cells (Figure 1A). We analyzed the effect of E6 on pAkt protein levels by immunoblot since protein kinase B phosphorylated in serine 253 (pAkt) is a significant driver of glucose metabolism [36,37], whose inhibition increases the activation of mitochondrial metabolism [38]. We found that the pAkt levels were significantly diminished in 1.7 and 1.5-fold in HPV16 and HPV18 E6-transfected cells, respectively (Figure 1A,B), concluding that E6 oncoproteins decreases Akt phosphorylation. To test whether E6 oncoproteins impact FaDu cell viability, we measured cell viability through MTS assay, which measures metabolic activity by tetrazolium reagent reduction to formazan. We found that E6 oncoproteins did not affect FaDu cell viability with respect to the control (Figure 1C).

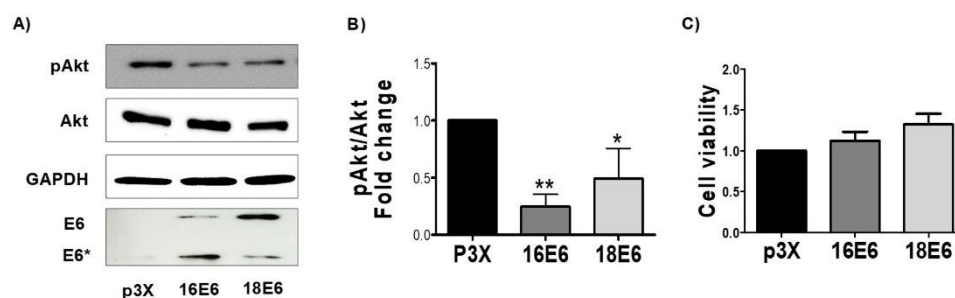


Figure 1. 16E6 and 18E6 oncoproteins decrease pAkt without changing cell viability in FaDu cells. FaDu cells were transfected with p3X, HPV16 E6- or HPV18 E6-expressing plasmids and were seeded in a 96 well plate. (A) Representative immunoblot; and (B) quantitative densitometry showing Flag-tagged E6 and E6* (E6 spliced product), protein kinase B (Akt) phosphorylated in serine 473 (pAkt) and total Akt. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins reduce pAkt. (C) Cell viability was quantified after 48 h by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) reduction and expressed as fold change in relation to the control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.2. E6 Oncoproteins Increase Mitochondrial Proteins

We proceeded to evaluate the relation of the reduction in pAkt levels with mitochondrial proteins. Therefore, voltage dependence anion channel (VDAC) levels were evaluated by immunoblot, as a marker of mitochondrial mass. We found that 16E6 and 18E6 increased VDAC by 4 and 3.8-fold, respectively (Figure 2A), which suggested an increase in mitochondrial mass due to the reduction of pAkt. In order to corroborate such effect, the LY 294,002 a pAkt inhibitor, was tested. We found that a concentration of 25 μ M LY 294,002 increases the VDAC protein in FaDu cells that were transfected with the control p3X (Figure S1). Therefore, the effect of E6 proteins in the overexpression of VDAC can be attributed to the decrease in pAkt.

Several models of mitochondrial dysfunction have reported a reduction in protein levels of mitochondrial complexes I to V, as well as in levels of their mRNAs, which have been related to a reduction in mitochondrial biogenesis and bioenergetics in such models [39–44]. Therefore, we measured, through immunoblot, the effect of E6 on the subunits of mitochondrial complexes I to V while using an OXPHOS cocktail. We found that 16E6 and 18E6 increased, respectively, the subunit CI-NDUFB8 of complex I in 1.9 and 1.5-fold; the subunit CII-SDHB of complex II in 2.4 and 2.8-fold; the subunit CIII-UQCRC2 of complex III in 1.9 and 1.9-fold; the subunit CIV-MTCO1 of complex IV in

1.4 and 1.5-fold; and, the subunit of CV-ATP5A complex V in 1.4 and 1.4-fold, in relation to the cells that were transfected with the control vector (Figure 2B). Based on all of these results, we conclude that E6 from HPV16 and HPV18 increase the mitochondria mass, especially the proteins of the electron transfer system (ETS), which is related to a reduction in pAkt levels.

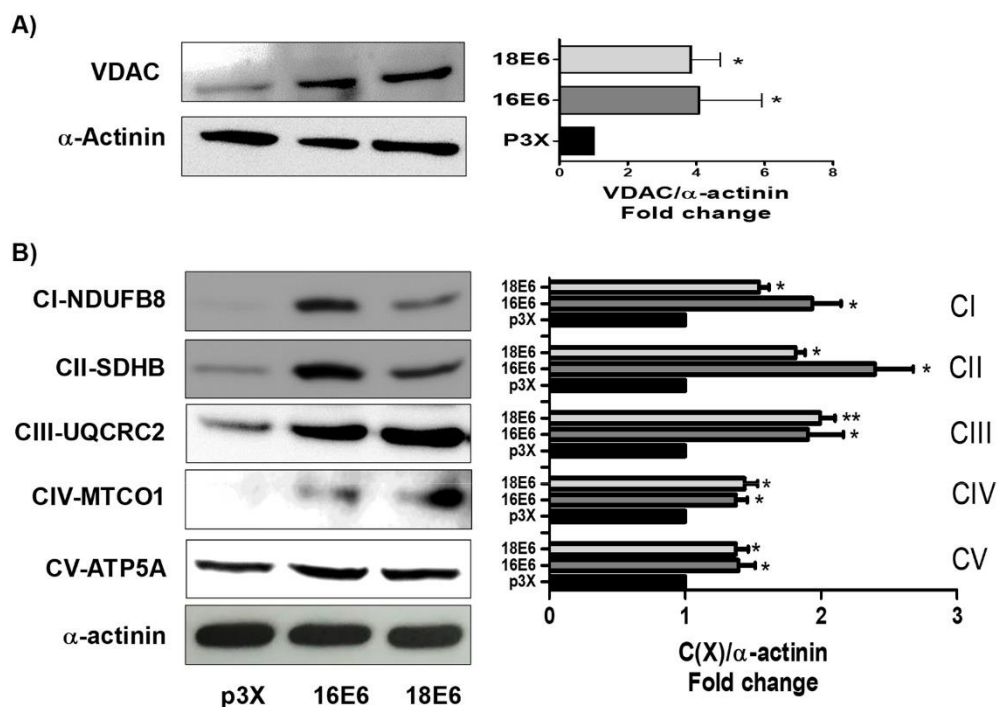


Figure 2. 16E6 and 18E6 oncoproteins increase mitochondrial metabolism in FaDu cells. Human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins increase the protein levels of the subunits of mitochondrial complexes I to IV: Complex I subunit CI-NDUFB8, Complex II subunit CII-SDHB, Complex III-Core protein 2 (CIII-UQCRC2), Complex IV subunit I (CIV-MTCO1), and ATP synthase alpha subunit (CIV-ATP5A), as well as the voltage dependence anion channel (VDAC). (A) Representative immunoblot and densitometric analysis of VDAC; and (B) Representative immunoblot and densitometric analysis of mitochondrial complexes subunits I-IV and ATP synthase subunit in FaDu transfected cells. α -actinin was used as a loading control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.3. E6 Oncoproteins Promote Mitochondrial Electron Transport System Activity

The increase in the subunits of mitochondrial complexes suggests changes in mitochondrial bioenergetics, which could be especially related to an increase in the activity of the whole ETS. Accordingly, we evaluated the CI linked respiration and the CIV activity. We found that 16E6 and 18E6 increased CI linked respiration in 2.1 and 2-fold (Figure 3A) and CIV activity in 1.8 and 1.5-fold (Figure 3B), respectively. These results, together with the increase in mitochondrial mass, imply an augment in the activity of whole ETS that is caused by E6 oncoproteins.

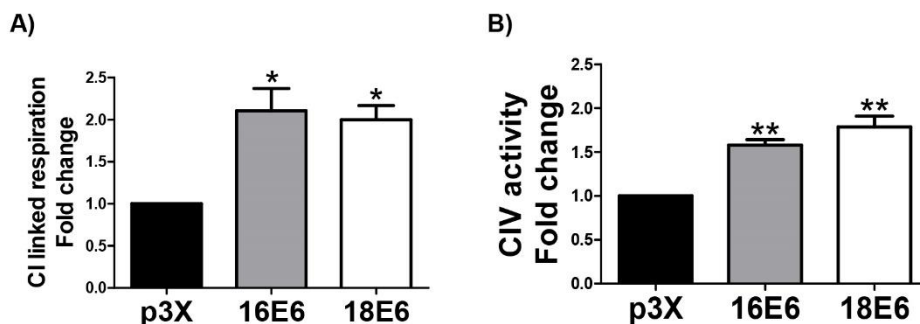


Figure 3. 16E6 and 18E6 oncoproteins promote the increase in mitochondrial electron transport system (ETS) activity in FaDu cells. (A) Complex I (CI) linked respiration; (B) Complex IV (CIV) activity. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.4. E6 Proteins Increase Cellular Respiration Rates, Inducing Mitochondrial Decoupling

The respiratory parameters were evaluated in whole cells, including ATP-linked respiration, basal and leak respirations, and the respiratory control index (RCI) to determine whether the increase in mitochondrial proteins by E6 is related to mitochondrial bioenergetic. Cell respiration is regulated according to physiological activity, at intracellular adenosine diphosphate (ADP) levels, which is named "basal respiration". When incubated in the corresponding culture medium, cells maintain a basal level of oxygen consumption activity [45,46]. We found in 16E6 and 18E6 expressing cells an increase of 2.7 and 3.4-fold in basal respiration and 4.6 and 6.3-fold in leak respiration, respectively (Figure 4A,B), which is congruent with the increase in ETS activity and protein levels (Figures 2 and 3). However, the observed increase in leak respiration indicates that only non-phosphorylating respiration is increased, which suggests that the increase in the oxygen consumption that was observed in basal respiration is generated to compensate the electron and proton leak, since ATP-linked respiration did not show significant changes (Figure 4C). Furthermore, RCI parameter displayed a lessening of 1.6 and 1.8-fold, respectively, reaffirming the mitochondrial decoupling (Figure 4D), which suggests that oxygen is not efficiently used by the mitochondria, which could trigger the ROS production.

3.5. E6 Promotes Mitochondrial ROS Production

The respiratory parameter showed that E6 triggered a significant increase in the basal respiration rate. Nevertheless, the increase in respiration leak and the decrease in RCI (Figure 4D) suggest that oxygen is not efficiently used for OXPHOS, which could trigger the increase in mitochondrial ROS production. We use MitoSOX Red assay in order to assess ROS production in the mitochondria. We found an increase in the ROS levels evaluated by MitoSOX of 1.8- and 1.5-fold, in the presence of E6 from HPV16 and HPV18 E6, respectively (Figure 5A,B). MitoSOX is mainly oxidized by O_2^- and exhibits red fluorescence in mitochondria. From this result, we conclude that the induced mitochondrial bioenergetic alterations by E6 oncoproteins (Figure 4) is linked to the increase in ROS production in the mitochondria.

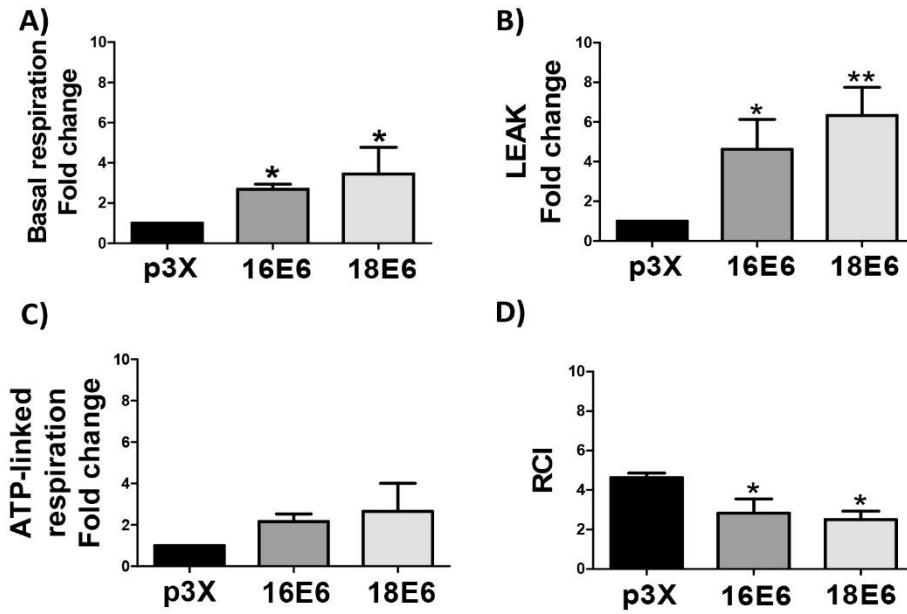


Figure 4. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 promote cellular respiration and mitochondrial decoupling in FaDu cells. Mitochondrial respiratory parameters: (A) basal respiration, (B) leak, (C) ATP-linked respiration and (D) respiratory control index (RCI). Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey’s test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. p3X control, $n = 3$.

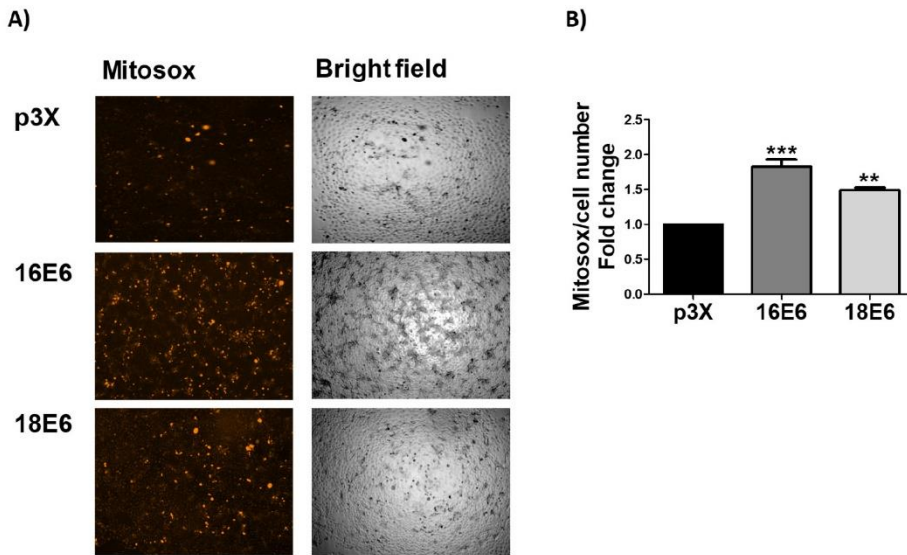


Figure 5. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 increase reactive oxygen species (ROS) in mitochondria of FaDu cells. (A) Representative images and (B) quantitative data of ROS generated by E6 proteins from HPV types 16 and 18. Quantitative data were obtained from cells expressing E6 from each viral type, comparing with p3X-transfected cells. The mean intensity of MitoSOX fluorescence was measured using Gen5™ 3.0 software for image acquisition and quantification. The fluorescence intensity is expressed as the mean \pm SD. Tukey’s test ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ vs. control (p3X), $n = 3$.

3.6. E6 Promotes the Increase in ROS Levels in Whole Cells

Mitochondrial ROS are released to the cytosol [47,48]. Accordingly, we measured ROS levels in the whole cells. We found an increase in ROS levels of 2- and 2.5-fold, as evaluated by DHE, which is oxidized by $O_2^{\cdot-}$ to ethidium (Et), in the presence of 16E6 and 18E6, respectively. We measured another ROS by H_2DCFDA , taking a bigger picture of the ROS production induced by E6, since DHE assay mainly measures $O_2^{\cdot-}$. The evaluation by DCF showed an increase of 2.2- and 2.7-fold in cells expressing 16E6 and 18E6, respectively (Figure 6A,B).

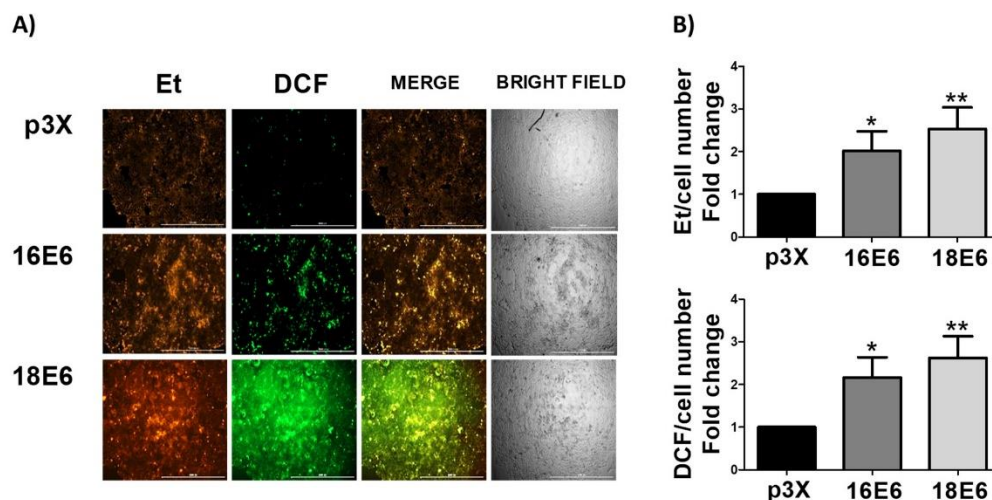


Figure 6. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 increase reactive oxygen species (ROS) in FaDu cells. (A) Representative images and (B) quantitative data of ROS generated by E6 proteins from HPV types 16 and 18. Quantitative data were obtained from cells expressing E6 from each viral type, comparing with p3X-transfected cells as control. The mean intensity of ethidium (Et) and dichlorofluorescein (DCF) fluorescence were measured using Gen5TM 3.0 software for image acquisition and quantification. The fluorescence intensity is expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ vs. control (p3X), $n = 3$.

3.7. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 Induce Oxidative Stress through the Increase in Protein Carbonyls and GSSG and the Decrease in GSH and GSH/GSSG Ratio

We decided to measure proteins carbonyls and we found that this OS marker increased with E6 from both HPV types in 1.3- and 1.4-fold, respectively, since ROS can react with proteins to produce protein carbonyls (Figure 7A). This result suggests that E6 oncoprotein induce OS and this was associated with oxidative damage to proteins. Moreover, we evaluated GSH levels as a main marker of OS and we found that both E6 proteins significantly decreased GSH levels (Figure 7B), while the GSSG levels augmented (Figure 7C), resulting in a decrement in GSH/GSSG ratio of 1.8-fold for both proteins (Figure 7D). We concluded that E6 oncoproteins induce OS in whole cells from this result.

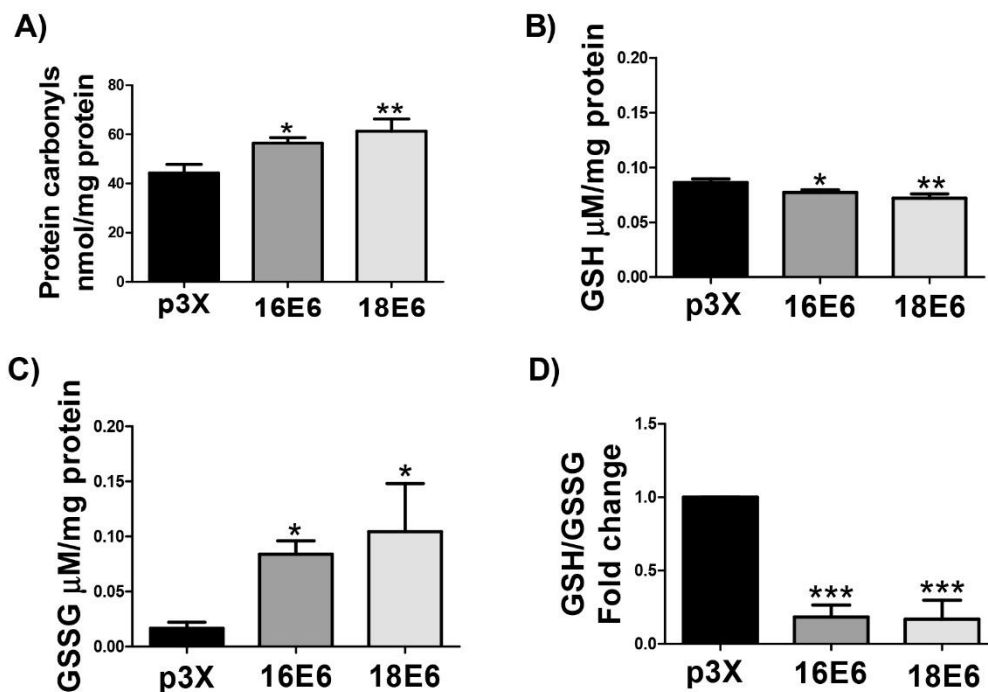


Figure 7. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 promote oxidative stress in FaDu cells. (A) protein carbonyls; (B) GSH levels; (C) GSSG; and, (D) GSH/GSSG ratio, in comparison with the control vector. Protein carbonyls, GSH, and GSSG levels are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$.

3.8. E6 from HPV16 and HPV18 Increase pNrf2 and FoxO3a Levels

OS response activates different transcription factors (TF) that are associated to antioxidant response, such as Nrf2 and FoxO3a. OS induces Nrf2 activation through its phosphorylation in Ser40 (pNrf2), leading Nrf2 to the nucleus [49]. Therefore, the effect of E6 oncoproteins on pNrf2 was evaluated. As shown in Figure 8A, pNrf2 (~100 kDa) augmented in the presence of 16E6 and 18E6 oncoproteins in 3.6-fold and 3.8-fold, respectively. Since glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) is a downstream target of pNrf2, we also measured its levels. As expected, a significant increase of GCLM was found in the presence of 16E6 (2.5-fold) and 18E6 (2.9-fold), in comparison with the control cells (Figure S2A,B). Therefore, the Nrf2 pathway is active in the presence of E6 oncoproteins.

The antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) was added in order to demonstrate the implication of E6-induced OS in the increased pNrf2 levels. Figure S3A shows that NAC scavenges ROS induced by 16E6. Similar results were observed in cells harboring 18E6 (data not shown). Moreover, as is shown in Figure S3B, NAC treatment prevented E6 from increasing pNrf2. We conclude that ROS induced by the E6 oncoproteins are implicated in the activation of Nrf2 response.

Since Forkhead box O3 (FoxO3a) is downregulated via Akt and it is activated in response to OS, we analyzed if this TF is also affected by the E6 oncoproteins. As shown in Figure 8B, FoxO3a protein levels increased 1.5-fold in cells with 16E6 and in 1.4-fold in cells with 18E6. Therefore, we conclude that FoxO3a is active in response to OS in E6 expressing cells, being associated to the decrease in pAkt.

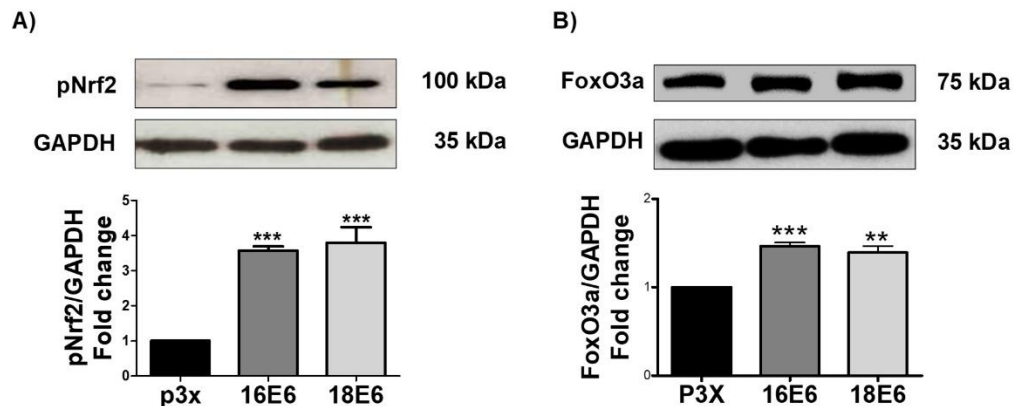


Figure 8. 16E6 and 18E6 oncoproteins increase pNrf2 and FoxO3a levels in FaDu cells. Representative immunoblot and quantitative densitometric analysis of (A) nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) phosphorylated in serine 40 (pNrf2); and, (B) forkhead box O3 (FoxO3a) in FaDu E6-transfected cells. GAPDH was used as a loading control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.9. E6 Oncoproteins Increase SOD1 and SOD2 Levels and Activity

We measured, by immunoblot, the enzymes superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1 and SOD2) and their activity, by spectrometry, in order to determine if an antioxidant response is activated by the transcription factors pNrf2 and FoxO3a. We observed that the 16E6 and 18E6 oncoproteins increased the protein levels of SOD1 in 2-fold and 1.9-fold, respectively; while the SOD2 levels were increased in 4.3-fold and 2.5-fold, respectively (Figure 9A). However, we found differences in SOD activation, where 16E6 promoted SOD activity, while it declined in cells with 18E6 (Figure 9B). From these results, we conclude that both E6 oncoproteins increase SOD levels, although only 16E6 augmented SOD activity.

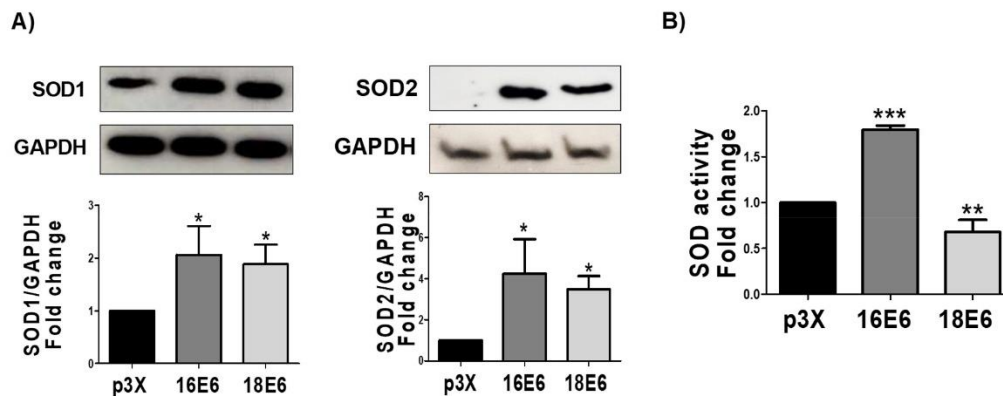


Figure 9. 16E6 and 18E6 oncoproteins increase superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1/2) levels in FaDu cells. (A) Representative immunoblot and quantitative densitometric analysis of superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1 and SOD2); and (B) total SOD activity, which is augmented in FaDu 16E6 expressing cells. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.0005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.10. 16E6 Increases Catalase Activity without Changing Catalase Levels

SOD enzymes dismutate $O_2^{\cdot -}$ molecules to H_2O_2 , allowing for catalase and other peroxidases to degrade H_2O_2 to water. Therefore, we measured the catalase levels by immunoblot and its activity,

by spectrophotometry. We found that even that E6 oncoproteins did not raise catalase expression (Figure 10A), 16E6 increased catalase activity by 5.4-fold (Figure 10B), while 18E6 had no effect. This result correlates with the activation of SOD exclusively by 16E6 oncoprotein.

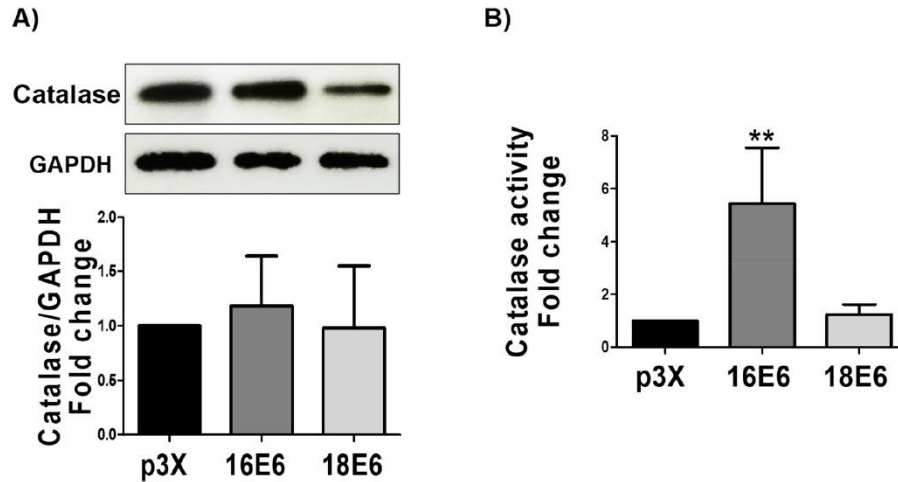


Figure 10. Effect of E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 on catalase levels and activity. (A) Representative immunoblot and quantitative densitometric analysis of catalase; (B) catalase activity in FaDu transfected cells. GAPDH was used as a loading control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test ** $p < 0.005$ vs. p3X control, $n = 3$.

3.11. 16E6 and 18E6 Oncoproteins Induce DNA Damage

The DNA marker gamma H2AX (γ H2AX) was analyzed in the presence of E6 oncoproteins since OS promotes DNA damage. As shown in Figure 11A,B, 16E6 and 18E6 increased DNA damage in 3.2- and 5.4-fold, respectively, in relation to the control. The induction of DNA damage was higher in 18E6 transfected cells. The cells were treated with the antioxidant NAC in order to determine whether the OS induced by E6 oncoproteins is responsible of the observed DNA damage. As shown in Figure S4A,B, NAC alleviated the DNA damage induced by E6 oncoproteins. From these results, we conclude that 16E6 and 18E6 induce DNA damage by OS induction. The highest effect observed in 18E6 expressing cells may be related to its demonstrated lowest antioxidant activity in relation to those harboring 16E6 (Figures 9B and 10B).

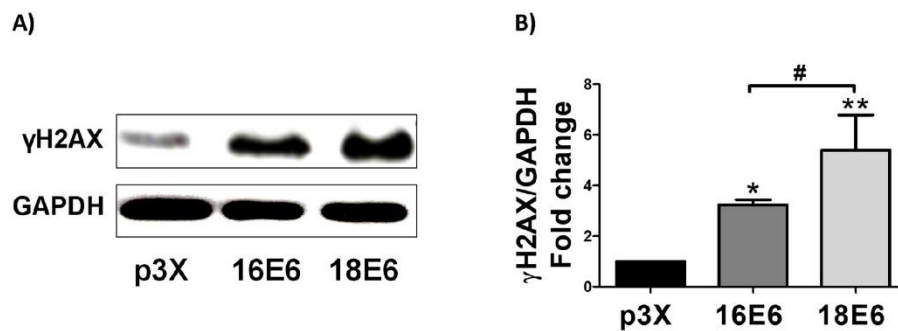


Figure 11. E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 induce DNA damage in FaDu cells. (A) Representative immunoblot; and (B) quantitative densitometric analysis of gamma H2A histone family member X (γ H2AX) in FaDu-transfected cells. GAPDH was used as a loading control. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs. p3X control; # $p < 0.05$ 16E6 vs. 18E6, $n = 3$.

4. Discussion

Mitochondria perform bioenergetic and biosynthetic processes, such as fatty acid oxidation (FAO), Krebs cycle, ETS, and cell death induction via apoptosis, as well as the synthesis of amino acids, lipids, and nucleotides [13,14]. The Krebs cycle produces NADH and flavin adenine dinucleotide (FADH₂) that enter the ETS to generate a proton gradient in the inner membrane of the mitochondria, which is utilized to produce ATP through ATP synthase [50]. However, during this process, ROS can be generated as a side product of ETS, especially when the mitochondria is decoupled [51]. When ROS are excessively accumulated and the cellular antioxidant system is overcome, OS is produced, which leads to cell death [29]. Nevertheless, ROS in lower concentration act as secondary messengers, activating several signaling pathways and enzymes, such as Mitogen-Activated Protein Kinases, which control cell proliferation and transformation [52]

Mitochondria coordinate a wide range of functions that are critical for metabolism, growth, and cell survival, having a principal role in cancer development [15], where mitochondrial ROS and its antioxidant systems are involved in modulating cell fate. It has been shown that HNSCC HPV⁻ and HNSCC HPV⁺ differ in genomic and metabolic profiles [4,6,7]. Regarding metabolic requirements, it has been reported that HNSCC HPV⁻ prefer glucose metabolism, while HNSCC HPV⁺ favor mitochondrial metabolism [9–11]. For instance, it has been shown that HNSCC HPV⁻ cells express genes that are related to glycolytic and OXPHOS pathways, which suggests that these cells use both mechanisms to obtain energy; while HNSCC HPV⁺ cells favor the expression of genes that are related to the OXPHOS pathway [53]. However, the mechanisms that are associated to mitochondrial metabolism in HNSCC HPV⁺ are unknown. In this work, we explored the role of HPV E6 oncoprotein in mitochondrial metabolism. We found that E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 raise the mitochondrial oxygen consumption, increasing the levels of mitochondrial proteins, which is associated to a reduction in pAkt (Figure 1). In line with this, De Rosa et al. showed that, in lung epithelial cells, the inhibition of pAkt activates mitochondrial metabolism and increases ETS complexes [38]. Furthermore, pAkt is downregulated in HNSCC HPV⁺ tumors and derived cell lines [54,55]. Moreover, it has been demonstrated that the transfection of E6/E7 in HNSCC HPV⁻ cells decay pAkt [54].

In this study we found that E6 oncoproteins enhance cellular respiration, matching with the increase in mitochondrial protein content (Figures 2 and 3). Nevertheless, although mitochondrial respiration increased, ATP-linked respiration did not show significant changes. It is possible that 16E6 and 18E6 favor the biosynthetic pathways that are implicated in the production of amino acids, nucleic acids, and fatty acids, among other biomolecules, instead of energy in ATP form during the mitochondrial metabolism [13,14,56]. We found that the increase in mitochondrial respiration was associated to the decoupling of mitochondria and the electron leak in the presence of E6 oncoproteins, which was reflected by the decline of the RCI parameter (Figure 4). In agreement with our results, Evans et al. (2016) reported that E6* boosts mitochondrial dysfunction in cervical cancer cell lines, which increases several ETS complex subunits [57]. Moreover, it has been shown that E6 deregulates different metabolic pathways [58]. Furthermore, it has been reported that mitochondrial decoupling promotes ROS production, since it favors the electron leak that partially reduces oxygen, in order to produce O₂⁻ [25], which contributes to OS and cell damage [59,60]. Concordantly, we found that E6 oncoproteins promote a leak respiration that is associated to the induction of ROS in mitochondria and the whole cells, triggering the observed oxidative stress (Figures 4–7).

We also showed that the increase in ROS by E6 generated OS, as shown by the increase in carbonyl proteins and GSSG, contributing to the fall in GSH/GSSG ratio (Figure 7). We also measured the effect of E6 on these proteins since pNrf2 and FoxO3a are activated under OS conditions [26,27]. We found that the FoxO3a and pNrf2 levels increased in the presence of E6 from HPV16 and HPV18 (Figure 8), which suggests its translocation to the nucleus to regulate the antioxidant response. This was demonstrated by the increase of GCLM (Figure S2), one canonical pNrf2 target gene.

By the other side, it has been reported that pAkt inactivates FoxO3a via its phosphorylation in threonine 32 and serine 253 and 315, which is related to its activity inhibition and proteasomal

degradation [61]. However, in the presence of low levels of pAkt [62], FoxO3a resides in the nucleus and triggers target genes, such as SOD2 and catalase [27]. It is probable that the activation of FoxO3a is due to low levels of pAkt and/or activation of oxidative stress by the E6 oncoproteins. Moreover, FoxO3a is an essential molecule for inducing mitochondrial biogenesis [63], which could be related to the increase in mitochondrial mass in the presence of the E6 oncoproteins.

We measured the expression of SOD1, SOD2, and catalase as the target genes of pNrf2 and FoxO3a [28,64], finding that E6 proteins was associated to the elevation of SOD2 and SOD1 levels (Figure 9). We did not find changes in catalase levels (Figure 10), which was perhaps due to epigenetic modulation of catalase by other factors, such as miRNA 30b [65], which is modulated by the E6 oncoprotein [66].

We set out to analyze this activity in the presence of E6 since the levels of antioxidant enzymes do not necessarily reflect their antioxidant activity. We found that the activity of SOD and catalase only increased in the presence of 16E6 (Figures 9 and 10) and not with 18E6. This could be partially explained by differential interactions between E6 proteins from HPV16 and 18 with cellular proteins [67], which could affect the post-translational modifications of antioxidant enzymes, such as acetylation, phosphorylation, nitration, glycation, and glutathionylation [68], which are known to impact in the enzymatic activity.

It has been shown that E6 enhances OS and DNA damage in cervical cancer [21], so we evaluated whether E6 also produces DNA damage in an HNSCC model, measuring the levels of γ H2AX. We demonstrated that E6 also causes DNA damage in HNSCC (Figure 11). Previous reports have shown that 16E6 upregulate proteins related to DNA damage response (DDR), such as Checkpoint kinase 1 and 2 (Chk1 and Chk2) inducing their activation [68]. The cellular hormesis, related to the increase of ROS and the response of Nrf2 and FoxO proteins, occurs continuously in cancer cells, mainly induced by the high metabolic requirements that are associated with the high rate of cell proliferation, which is the way in which hormesis determines the adaptation to environmental stress and cell survival [69].

As shown in Figure 12, the E6 oncoproteins promote mitochondrial metabolism and cellular respiration; however, there is also a decoupling of mitochondria associated with increased levels of ROS presented in FaDu cells. Although ROS production is counteracted with the increase of antioxidants, these are overcome, inducing OS and DNA damage, without affecting cell viability.

Our results suggest that the induction of the mitochondrial metabolism by E6 may confer growth advantage to HNSCC HPV+ tumoral cells. However, it is necessary to understand the possible effects in mitochondrial metabolism that are given by other HPV proteins, such as E7, E2, and E1, which deserves further studies. For example, it has been shown that E2 associates with ETS complexes, inducing ROS in immortalized keratinocytes [70], while E7 decrease the ROS levels [21].

On the other hand, our data could partially explain why HPV+ tumor cells are more radiosensitive, due to the increase in ROS levels that may favor cell death in the presence of ionizing radiation. Therefore, in order to design the improved therapeutic strategies, it is important to continue investigating the role of E6, as well as other HPV proteins, in the cellular redox state to determine the differences between HNSCC HPV+ and HPV– tumors in response to treatment.

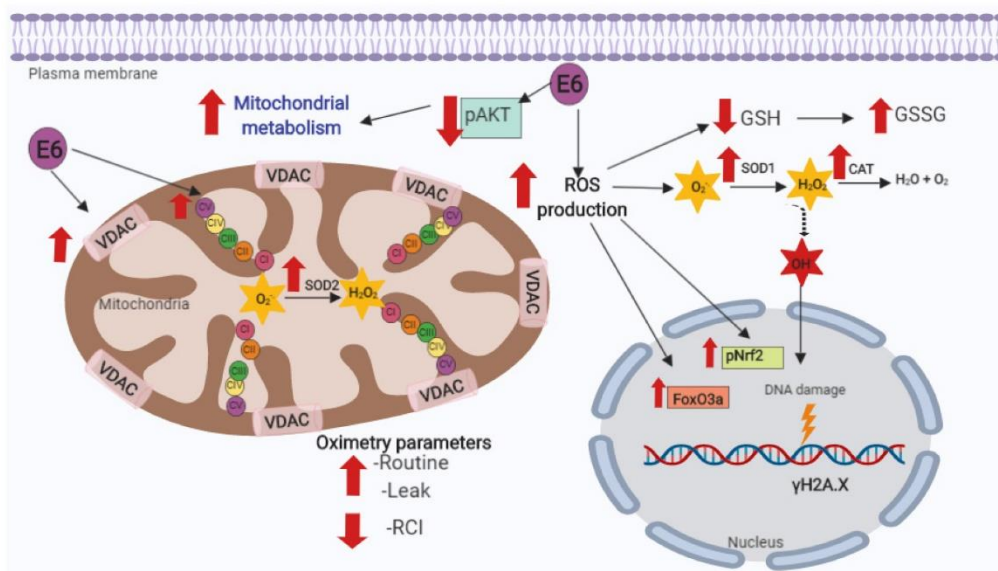


Figure 12. Integrative scheme. E6 oncoproteins from human papillomavirus type 16 (HPV16) and 18 (HPV18) decrease the levels of serine 473 phosphorylated-protein kinase B (pAkt), favoring the mitochondrial oxygen consumption and mitochondrial mass increase. E6 increases basal respiration (Routine), respiration leak and mitochondrial decoupling, while respiratory control index (RCI) significantly decreases, which could be associated to the increase in reactive oxygen species (ROS), oxidative stress (OS), and deoxyribonucleic acid (DNA) damage. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), voltage-dependent anion channels (VDAC), superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^-), nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) phosphorylated in serine 40 (pNrf2), forkhead box O3 (FoxO3a), gamma H2A histone family member X (γ H2AX), and mitochondrial complexes I to V (CI, CII, CIII, CIV, CV). The yellow ray indicates damage to DNA.

5. Conclusions

E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 promoted the rise in mitochondrial protein levels and cell respiration, which was associated with the reduction of pAkt levels. In addition, E6 generated the mitochondrial decoupling, as shown by the increase in respiration leak and by the RCI decrease, raising ROS, OS, and DNA damage (Figure 12). These results suggest that the E6 oncoproteins from HPV16 and HPV18 are inducers of mitochondrial metabolism, oxidative stress, and DNA damage in FaDu cells, which may be linked with the reported differences in biological behavior between HNSCC HPV- and HPV+ tumors.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/9/8/351/s1>.

Author Contributions: All the authors listed made substantial contributions to the manuscript and qualify for authorship, and no authors have been omitted. Conception and design: A.C.-G. and M.L.; development of methodology and acquisition of data: A.C.-G., A.K.A.-R., O.E.A.-T. and I.C.-M.; analysis and interpretation of data: A.C.-G., A.K.A.-R., O.E.A.-T., I.C.-M., J.P.-C. and M.L.; wrote the paper: A.C.-G., A.K.A.-R., O.E.A.-T. and M.L. performed the figures: A.C.-G. and A.K.A.-R., contributed in the revision of the manuscript: A.C.-G., A.K.A.-R., O.E.A.-T., I.C.-M., J.P.-C. and M.L.

Funding: This research was partially supported by CONACyT-FOSISS grant 261499 and Instituto Nacional de Cancerología, México Ref: (015/039/IBI) (CEI/998/15).

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

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chaturvedi, A.K.; Engels, E.A.; Pfeiffer, R.M.; Hernandez, B.Y.; Xiao, W.; Kim, E.; Jiang, B.; Goodman, M.T.; Sibug-Saber, M.; Cozen, W.; et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4294–4301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pytynia, K.B.; Dahlstrom, K.R.; Sturgis, E.M. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* **2014**, *50*, 380–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Dok, R.; Nuyts, S. HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jou, A.; Hess, J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res. Treat.* **2017**, *40*, 328–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Solomon, B.; Young, R.J.; Rischin, D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *52*, 228–240. [[CrossRef](#)]
7. Stransky, N.; Egloff, A.M.; Tward, A.D.; Kostic, A.D.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A.; Kryukov, G.V.; Lawrence, M.S.; Sougnez, C.; McKenna, A.; et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* **2011**, *333*, 1157–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Agrawal, N.; Frederick, M.J.; Pickering, C.R.; Bettegowda, C.; Chang, K.; Li, R.J.; Fakhry, C.; Xie, T.-X.; Zhang, J.; Wang, J.; et al. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science* **2011**, *333*, 1154–1157. [[CrossRef](#)]
9. Mims, J.; Bansal, N.; Bharadwaj, M.S.; Chen, X.; Molina, A.J.; Tsang, A.W.; Furdai, C.M. Energy metabolism in a matched model of radiation resistance for head and neck squamous cell cancer. *Radiat. Res.* **2015**, *183*, 291–304. [[CrossRef](#)]
10. Jung, Y.-S.; Najy, A.J.; Huang, W.; Sethi, S.; Snyder, M.; Sakr, W.; Dyson, G.; Hüttemann, M.; Lee, I.; Ali-Fehmi, R.; et al. HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 51530–51541. [[CrossRef](#)]
11. Cruz-Gregorio, A.; Martínez-Ramírez, I.; Pedraza-Chaverri, J.; Lizano, M. Reprogramming of Energy Metabolism in Response to Radiotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wallace, D.C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 685–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zong, W.-X.; Rabinowitz, J.D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 667–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Porporato, P.E.; Filigheddu, N.; Pedro, J.M.B.-S.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res.* **2018**, *28*, 265–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Badaracco, G.; Venuti, A.; Sedati, A.; Marcante, M.L. HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J. Med. Virol.* **2002**, *67*, 574–582. [[CrossRef](#)]
17. Romanczuk, H.; Howley, P.M. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3159–3163. [[CrossRef](#)]
18. Mantovani, F.; Banks, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **2001**, *20*, 7874–7887. [[CrossRef](#)]
19. Boyer, S.N.; Wazer, D.E.; Band, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4620–4624.
20. Thomas, M.; Pim, D.; Banks, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **1999**, *18*, 7690–7700. [[CrossRef](#)]
21. Cruz-Gregorio, A.; Manzo-Merino, J.; González-García, M.C.; Pedraza-Chaverri, J.; Medina-Campos, O.N.; Valverde, M.; Rojas, E.; Rodríguez-Sastre, M.A.; García-Cuellar, C.M.; Lizano, M. Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 21–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Cruz-Gregorio, A.; Manzo-Merino, J.; Lizano, M. Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res.* **2018**, *246*, 35–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Federico, A.; Morgillo, F.; Tuccillo, C.; Ciardiello, F.; Loguercio, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2381–2386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Quinlan, C.L.; Perevoshchikova, I.V.; Hey-Mogensen, M.; Orr, A.L.; Brand, M.D. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 304–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13291–13295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Klotz, L.-O.; Sánchez-Ramos, C.; Prieto-Arroyo, I.; Urbánek, P.; Steinbrenner, H.; Monsalve, M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 51–72. [[CrossRef](#)]
28. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1–40. [[CrossRef](#)]
29. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84. [[CrossRef](#)]
30. Aparicio-Trejo, O.E.; Reyes-Fermín, L.M.; Briones-Herrera, A.; Tapia, E.; León-Contreras, J.C.; Hernández-Pando, R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Protective effects of N-acetyl-cysteine in mitochondria bioenergetics, oxidative stress, dynamics and S-glutathionylation alterations in acute kidney damage induced by folic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *130*, 379–396. [[CrossRef](#)]
31. Reyes-Fermín, L.M.; Avila-Rojas, S.H.; Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Rivero, I.; Pedraza-Chaverri, J. The Protective Effect of Alpha-Mangostin against Cisplatin-Induced Cell Death in LLC-PK1 Cells is Associated to Mitochondrial Function Preservation. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pedraza-Chaverri, J.; Reyes-Fermín, L.M.; Nolasco-Amaya, E.G.; Orozco-Ibarra, M.; Medina-Campos, O.N.; González-Cuahutencos, O.; Rivero-Cruz, I.; Mata, R. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2009**, *61*, 491–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* **1994**, *233*, 346–357. [[PubMed](#)]
34. Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3159–3165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aebi, H. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126. [[PubMed](#)]
36. Elstrom, R.L.; Bauer, D.E.; Buzzai, M.; Karnauskas, R.; Harris, M.H.; Plas, D.R.; Zhuang, H.; Cinalli, R.M.; Alavi, A.; Rudin, C.M.; et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3892–3899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Robey, R.B.; Hay, N. Is Akt the “Warburg kinase”?—Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 25–31. [[CrossRef](#)]
38. De Rosa, V.; Iommelli, F.; Monti, M.; Fonti, R.; Votta, G.; Stoppelli, M.P.; Del Vecchio, S. Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 5110–5120. [[CrossRef](#)]
39. Zhao, M.; Zhou, Y.; Liu, S.; Li, L.; Chen, Y.; Cheng, J.; Lu, Y.; Liu, J. Control release of mitochondria-targeted antioxidant by injectable self-assembling peptide hydrogel ameliorated persistent mitochondrial dysfunction and inflammation after acute kidney injury. *Drug Deliv* **2018**, *25*, 546–554. [[CrossRef](#)]
40. Wang, C.; Li, L.; Liu, S.; Liao, G.; Li, L.; Chen, Y.; Cheng, J.; Lu, Y.; Liu, J. GLP-1 receptor agonist ameliorates obesity-induced chronic kidney injury via restoring renal metabolism homeostasis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193473. [[CrossRef](#)]
41. Svensson, K.; Schnyder, S.; Cardel, B.; Handschin, C. Loss of Renal Tubular PGC-1 α Exacerbates Diet-Induced Renal Steatosis and Age-Related Urinary Sodium Excretion in Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sun, L.; Yuan, Q.; Xu, T.; Yao, L.; Feng, J.; Ma, J.; Wang, L.; Lu, C.; Wang, D. Pioglitazone Improves Mitochondrial Function in the Remnant Kidney and Protects against Renal Fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Smith, J.A.; Stallons, L.J.; Collier, J.B.; Chavin, K.D.; Schnellmann, R.G. Suppression of mitochondrial biogenesis through toll-like receptor 4-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in endotoxin-induced acute kidney injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, *352*, 346–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Sánchez-Lozada, L.G.; Pedraza-Chaverri, J. Mitochondrial bioenergetics, redox state, dynamics and turnover alterations in renal mass reduction models of chronic kidney diseases and their possible implications in the progression of this illness. *Pharmacol. Res.* **2018**, *135*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Gnaiger, E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis*; OROBOROS INSTRUMENTS Corp.: Innsbruck, Austria, 2014; ISBN 9783950239966.
46. Makrecka-Kuka, M.; Krumschnabel, G.; Gnaiger, E. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules* **2015**, *5*, 1319–1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Liou, G.-Y.; Storz, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 479–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Han, D.; Antunes, F.; Canali, R.; Rettori, D.; Cadenas, E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5557–5563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Huang, H.-C.; Nguyen, T.; Pickett, C.B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 42769–42774. [[CrossRef](#)]
50. Osellame, L.D.; Blacker, T.S.; Duchon, M.R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *26*, 711–723. [[CrossRef](#)]
51. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13. [[CrossRef](#)]
52. Holmström, K.M.; Finkel, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 411–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fleming, J.C.; Woo, J.; Moutasim, K.; Mellone, M.; Frampton, S.J.; Mead, A.; Ahmed, W.; Wood, O.; Robinson, H.; Ward, M.; et al. HPV, tumour metabolism and novel target identification in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **2019**, *120*, 356–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sewell, A.; Brown, B.; Biktasova, A.; Mills, G.B.; Lu, Y.; Tyson, D.R.; Issaeva, N.; Yarbrough, W.G. Reverse-phase protein array profiling of oropharyngeal cancer and significance of PIK3CA mutations in HPV-associated head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2300–2311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gupta, A.K.; Lee, J.H.; Wilke, W.W.; Quon, H.; Smith, G.; Maity, A.; Buatti, J.M.; Spitz, D.R. Radiation response in two HPV-infected head-and-neck cancer cell lines in comparison to a non-HPV-infected cell line and relationship to signaling through AKT. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2009**, *74*, 928–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Vyas, S.; Zaganjor, E.; Haigis, M.C. Mitochondria and Cancer. *Cell* **2016**, *166*, 555–566. [[CrossRef](#)]
57. Evans, W.; Filippova, M.; Filippov, V.; Bashkirova, S.; Zhang, G.; Reeves, M.E.; Duerksen-Hughes, P. Overexpression of HPV16 E6* Alters β -Integrin and Mitochondrial Dysfunction Pathways in Cervical Cancer Cells. *Cancer Genom. Proteom.* **2016**, *13*, 259–273.
58. Paget-Bailly, P.; Meznad, K.; Bruyère, D.; Perrard, J.; Herfs, M.; Jung, A.C.; Mougín, C.; Prétet, J.-L.; Baguet, A. Comparative RNA sequencing reveals that HPV16 E6 abrogates the effect of E6*1 on ROS metabolism. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5938. [[CrossRef](#)]
59. Zorov, D.B.; Juhaszova, M.; Sollott, S.J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 909–950. [[CrossRef](#)]
60. Baffy, G. Mitochondrial uncoupling in cancer cells: Liabilities and opportunities. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2017**, *1858*, 655–664. [[CrossRef](#)]
61. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmund, M.J.; Lin, M.Z.; Juo, P.; Hu, L.S.; Anderson, M.J.; Arden, K.C.; Blenis, J.; Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **1999**, *96*, 857–868. [[CrossRef](#)]
62. Kyoung Kim, H.; Kyoung Kim, Y.; Song, I.-H.; Baek, S.-H.; Lee, S.-R.; Hye Kim, J.; Kim, J.-R. Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2005**, *60*, 4–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Tseng, A.H.H.; Shieh, S.-S.; Wang, D.L. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *63*, 222–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Greer, E.L.; Brunet, A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **2005**, *24*, 7410–7425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Haque, R.; Chun, E.; Howell, J.C.; Sengupta, T.; Chen, D.; Kim, H. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chiantore, M.V.; Mangino, G.; Iuliano, M.; Zangrillo, M.S.; De Lillis, I.; Vaccari, G.; Accardi, R.; Tommasino, M.; Columba Cabezas, S.; Federico, M.; et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: Additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2016**, *142*, 1751–1763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Boon, S.S.; Banks, L. High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14-3-3 ζ in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* **2013**, *87*, 1586–1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Chen, B.; Simpson, D.A.; Zhou, Y.; Mitra, A.; Mitchell, D.L.; Cordeiro-Stone, M.; Kaufmann, W.K. Human papilloma virus type16 E6 deregulates CHK1 and sensitizes human fibroblasts to environmental carcinogens independently of its effect on p53. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1775–1787. [[CrossRef](#)]
69. Bhakta-Guha, D.; Efferth, T. Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin. *Pharmaceuticals (Basel)* **2015**, *8*, 865–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lai, D.; Tan, C.L.; Gunaratne, J.; Quek, L.S.; Nei, W.; Thierry, F.; Bellanger, S. Localization of HPV-18 E2 at Mitochondrial Membranes Induces ROS Release and Modulates Host Cell Metabolism. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75625. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).