



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“NANOG, EN COOPERACIÓN CON AP1, INCREMENTA LOS
NIVELES DE EXPRESIÓN DE E6/E7 DE VPH 16 Y 18”**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M en C. Yakelin Díaz Tejeda

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro García Carrancá
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, INCAN

COMITÉ TUTOR:

Dra. Marcela Lizano Soberón
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Patricio Gariglio-Vidal
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2022.



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.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract.....	3
2. Introducción.....	5
2.1. VPH y Cáncer.....	5
2.2. Estructura de VPH.....	5
2.3. E6 y E7 en la desarrollo del cáncer	7
2.4. Ciclo replicativo de VPH e integración.....	7
2.5. Relación células troncales cancerosas-VPH-Nanog.....	8
2.6. Nanog. Características generales.....	8
2.7. Nanog y Cáncer.....	9
2.8. Estructura de Nanog.....	10
2.9. Cristalografía y unión de Nanog al ADN.....	10
2.10. Modificaciones traduccionales de Nanog.....	11
2.11. Variantes de Nanog.....	11
2.12. Relación Nanog-AP1-VPH.....	12
2.13. AP1 y Cáncer.....	12
2.14. Estructura de AP1.....	13
3. Preguntas de investigación	14
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivos.....	14
6. Materiales y Métodos.....	16
7. Resultados.....	27
8. Discusión.....	43
9. Conclusiones.....	49
10. Perspectivas.....	50
11. Agradecimientos.....	51
10. Referencias.....	52

1. Resumen:

El Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, particularmente de los tipos 16 y 18, constituye el principal factor etiológico para el desarrollo del cáncer cervicouterino. Aunado a esto, factores del huésped interactúan con el virus y potencian su actividad oncogénica. Nanog es un factor de transcripción de células troncales y el incremento en su expresión se asocia a la progresión del cáncer cervical, al igual que sucede con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH. Por otra parte, Nanog aumenta la expresión del factor de transcripción c-Jun, el cual está implicado en la activación de la LCR de VPH a través de su unión directa. De modo que Nanog podría aumentar la expresión de los oncogenes de VPH al unirse a la LCR, o a través del factor c-Jun. En este estudio demostramos que el oncogén E7 de VPH16 se encuentra sobreexpresado en células SiHa enriquecidas en células troncales con respecto a las no enriquecidas. También, mostramos que Nanog incrementa la actividad de la LCR y la expresión de los oncogenes E6 y E7 de los VPH16 y 18. Realizamos un análisis *in silico* de los sitios putativos de unión a Nanog en la LCR de VPH 18 y demostramos que la mutagénesis *in vitro* de cualquiera de los dos sitios presentes disminuye la activación mediada por Nanog sobre la LCR. Sorpresivamente, observamos que las mutaciones de los dos sitios AP1 presentes en la LCR también afectan la activación de la misma mediada por Nanog. Además, demostramos que Nanog se une *in vivo* a la LCR de VPH18 y su sobreexpresión aumenta la cantidad de Nanog y de c-Jun unido a la misma. La transfección simultánea de Nanog y c-Jun incrementan la actividad de la LCR de VPH18 más que la de Nanog o c-Jun por separado, sugiriendo que existe una cooperación por parte de ambos factores. Finalmente, determinamos la existencia de sitios putativos de Nanog en las LCR de distintos tipos de VPH y encontramos sitios solamente en los de alto riesgo y no en los de bajo riesgo oncogénico. Por último, se demostró que las células no tumorigénicas 444 (VPH18+) que constituyen un híbrido de HeLa y fibroblastos, forman colonias en agar al ser transducidas con Nanog. Este estudio muestra por

primera vez el papel de Nanog en la regulación de la transcripción de E6 y E7 de VPH de alto riesgo.

Abstract:

Human Papillomavirus (HPV), particularly HPV 16 and 18 constitute the main etiological factor for the development of cervical cancer. Cellular factors are capable to interact with the virus and potentiate its activity. Nanog, a stem cell transcription factor, increases its expression with cervical cancer progression, just like happens with the viral oncoproteins. On the other side, Nanog increases the expression of the transcriptional factor c-Jun. This last factor augments the HPV LCR activity through LCR binding. Therefore, Nanog could increase the transcriptional activity of the LCR through direct binding or through c-Jun overexpression. In this study we demonstrated that the HPV E7 oncogene is overexpressed in stem cell-enriched SiHa cell line with regard to the regular SiHa line. It was also shown that Nanog increases LCR activity and E6/E7 oncogene expression from HPV16/18. An in silico analysis of the putative Nanog binding sites was performed. Mutation of any of the two identified sites leads to a decrease in LCR activity mediated by Nanog. Surprisingly, it was observed that mutations at the AP1 sites on the LCR also affect Nanog mediated activation of the LCR. Also, we demonstrated, by CHIP assay, that Nanog binds in vivo to the HPV18 LCR, and its overexpression increases c-Jun protein levels bound to the LCR. The simultaneous transfection of Nanog and c-Jun increases HPV18 LCR activity more than any of these factors alone, suggesting a cooperation between them. Finally, we looked for Nanog putative sites in the LCR of other HPV and found that they were present only in high risk HPV and not in the low risk HPV 6 and 11. Lastly, it was shown that the 444 non-tumorigenic cell line (HPV18+), which is a hybrid between HeLa and fibroblasts, was able to form colonies once transduced with Nanog. This study shows for the first time the role of Nanog in the regulation of E6 and E7 high risk HPV transcription.

1. Introducción:

2.1. VPH y Cáncer

Las infecciones persistentes con ciertos tipos de Virus del Papilloma Humano (VPH) de alto riesgo pertenecientes al género *Alfapapilomavirus* son consideradas necesarias para el desarrollo del cáncer (Walboomers et al 1999; zur Hausen, 2002). Los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 59 se incluyen en este grupo (Bosh et al 2008)(Figura 1). Mientras los VPH 6 y 11 son considerados *Alfapapilomavirus* de bajo riesgo que solo producen lesiones benignas (Kerge et al 2018). Dentro de los Betapapilomavirus también encontramos tipos relacionados con cáncer, como el 5 y el 8 (Ramezani et al 2020). Finalmente hay virus no humanos del género alfa que también son capaces de afectar macacos y causar cáncer. Entre ellos encontramos los MmPV1 y MmPV2.

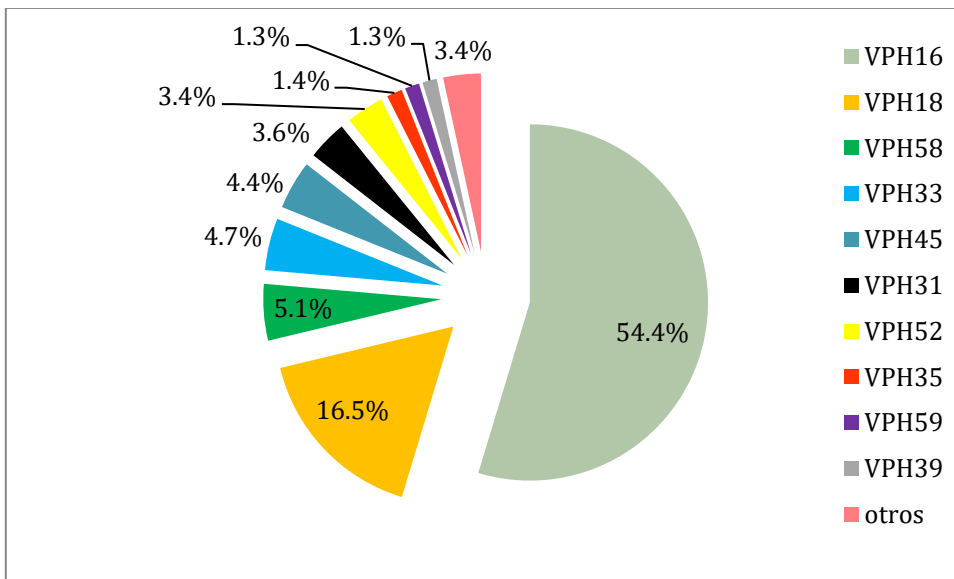


Figura 1. Incidencia de VPH de alto riesgo a nivel mundial.

2.2. Estructura de VPH

Los genomas de VPH miden aproximadamente 8000 pares de bases (pb) y se dividen en tres regiones: una regulatoria o LCR que incluye el origen de replicación y secuencias de unión de factores de transcripción, una de expresión temprana que contiene los genes no estructurales: E1, E2, E4, E5, E6, y E7 y una de expresión tardía que contiene los genes estructurales L1 y L2 (Burley et al 2020).

La LCR comprende de 800 a 900 pb e incluye el promotor temprano que dirige la expresión de los oncogenes E6 y E7. Es una región no codificadora que comprende el 10 % del genoma viral, desde el final de L1 hasta el inicio de E6. Este a su vez se divide en tres segmentos que incluyen el 5', el central y el 3'. El segmento central funciona como un potenciador de transcripción epitelio específico (Cid et al 1993; Cripe et al 1990). En este segmento se encuentran la mayoría de los sitios de unión a factores de transcripción capaces de estimular o inhibir la actividad transcripcional, entre los que se encuentran AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-3a, NF-IL6, KRF-1, NF-kB, FOXA1 y GATA3 (O'Connor y Bernard, 1995; Bernard, 2002; Sichero et al 2012; Bernard, 2013; Harden and Munger, 2017; Burley et al 2020).

La activación o represión del promotor temprano de VPH depende en parte del sinergismo entre los factores que se unen a la LCR, los cuales varían en afinidad para los elementos cis de diferentes tipos de VPH y variantes. P97 y P105 son los promotores tempranos de los VPH 16 y 18, respectivamente. Para ambos VPH, los transcritos iniciados en E6 son editados diferencialmente y determinan la transcripción de los genes tempranos. Adicionalmente, para ambos tipos virales una parte del ARN mensajero (ARNm) de E6 es cortado para lograr una traducción eficiente de este (Ribeiro et al, 2018). Mientras los ARNm de E6 y E7 son los más abundantes en carcinoma cervical, en verrugas benignas los transcritos E1∧E4 son los más prevalentes (Oft et al 1993, Liu et al 2018).

El inicio y mantenimiento de los tumores depende de la expresión continua de E6 y E7 (Prati et al 2018). Estas oncogenes promueven inmortalización y transformación de las células del hospedero mediante la degradación de proteínas regulatorias claves, incluyendo la del retinoblastoma o pRB y p53 o guardián del genoma.

2.3. E6 y E7 en la desarrollo del cáncer

E6 no solo inhibe p53, también regula negativamente a la proteína BAK y Bax, reguladores claves de apoptosis (Vogt et al 2006). Además, E6 promueve la proliferación celular al aumentar la actividad de la telomerasa y de la familia de quinasas SRC, al inhibir la transactivación del factor regulador de interferón -3 (IRF-3) y al unirse a múltiples proteínas PDZ (White et al 2014). E6 también se asocia a paxilina, una proteína involucrada en la metástasis, por su capacidad de unirse y modular proteínas que regulan la organización del citoesqueleto de actina. Además, E6 es capaz de modificar la transcripción al inhibir la función de CBP y p300 (Brimer et al 2014).

La inhibición de pRB por E7 conlleva a la liberación del factor de transcripción E2F y a la inactivación de p16, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CKI), lo cual conlleva a la alteración del ciclo celular. E7 también estimula la producción de las ciclinas A y E e inactiva a los CKIs p21 y p27 promoviendo además la proliferación (Fisher et al 2017). Finalmente, E7 produce la multiplicación de los centriolos (Duensing y M. nger, 2003).

2.4. Ciclo productivo de VPH e integración

El VPH puede unirse a receptores en la membrana basal e infectar a las células basales del epitelio. De forma alternativa, puede entrar en las células de la unión escamo-columnar, las cuales tienen características de células troncales. La mayoría de los casos de cáncer cervical se derivan de esta zona. La división de una célula basal infectada amplifica el virus a las capas más altas del epitelio. La diferenciación de los queratinocitos permite un patrón orquestado de expresión

genética viral. Primeramente se expresan E1 y E2, luego E6, E7, E4 y E5. Finalmente se expresan L2 y L1 y se ensamblan los viriones (Graham, 2017).

La persistencia del DNA se genera en las células basales. En ocasiones la integración viral ocurre en regiones del DNA huésped susceptible a stress replicativo, llamadas sitios frágiles. Este evento provoca la ruptura de E2 y la consecuente sobre-expresión de E6 y E7 (McBride y Warburton, 2017).

2.5. Relación células troncales cancerosas-VPH-Nanog

En la unión escamocolumnar se determinó la existencia de una población de origen embrionario con características de troncalidad y pluripotencia (Herfs et al 2012). Dichas células exhiben además una similitud de 90% aproximadamente con respecto a las células de cáncer cervical escamoso (Herfs et al 2013). Esto fue confirmado también a través de la expresión de biomarcadores como citoqueratina 7 (Kr7), proteína 2 gradiente anterior (AGR2) o el regulador de conductancia transmembranal de fibrosis quística (CTFR) en largas cortes de lesiones preneoplásicas cervicales (Paquette et al 2016; Mills et al 2017; Huang et al 2016; Peng et al 2012; Lee et al 2017).

Además, el hecho de que las células de la unión escamo-columnar en su estado normal contienen los transcritos de VPH (E6 y E2) sostiene la posibilidad de que estas células sirvan de reservorio para infecciones latentes y desarrollo de neoplasia intraepitelial cancerosa en pacientes asintomáticos positivos a VPH (Xian et al 2015). En células de la unión escamocolumnar de pacientes con citología aparentemente normal se determinó la existencia de ARNm de E6 y E7 y no así en células del ectocérvix o endocérvix, adyacentes a las células escamocolumnares (Mirkovic et al 2015). Este y el hecho de que en la mayoría de los casos el cancer de cérvix se localiza en dicha unión apunta a que su desarrollo está principalmente asociado a las células troncales.

Por otra parte, Nanog y VPH se relacionan de manera indirecta. Tanto Nanog como los VPH de alto riesgo están implicados en la progresión del cáncer cervical (Ye et al 2008; Gu et al 2012; Liu et al 2018; Chopra et al 2019). También se conoce que el oncogén E7 aumenta la expresión de Nanog tanto in vitro como in vivo (Organista-Nava et al 2016).

2.6. Nanog. Características generales.

Nanog es un factor transcripcional de células pluripotentes troncales. Dicho factor es independiente del factor inhibidor de leucemia (LIF), una citocina que ejerce su función a través de las vías Jak/Stat3 y PI3K/AKT para regular positivamente a Klf4, Tbx3, Sox2 y Nanog (Navarro, 2018). Nanog forma homo y heterodímeros con coactivadores (Nanog, Oct4 y Sox2) y corepresores (NuRD, Polycomb) (Mistri et al 2020). La depleción de Nanog puede colapsar las vías pluripotentes, resultando en la subsecuente diferenciación. Debido su papel crítico, Nanog es capaz de autoregularse positivamente al unirse a su propio promotor y también de prevenir su sobreexpresión de esta misma manera y a través del factor transcripcional dedos de zinc Zfp81 (Boyer et al, 2005; Papatsenko et al 2018). Las variaciones en los niveles de Nanog han sido asociadas a la renovación celular, proceso durante el cual se ha encontrado un alto nivel proteico de Nanog y a la diferenciación, en el cual se ha determinado un bajo nivel de este factor (Sevilla et al 2021).

2.7. Nanog y Cáncer

Nanog está involucrado en la angiogénesis (Kohler et al 2011), la transición epitelio mesénquima (Qin et al 2017), la resistencia a fármacos y radioterapia (Song et al 2017; Dehghan et al 2019), la inmunoresistencia (Saga et al 2019, Kim et al 2020), el mal pronóstico de supervivencia general, de supervivencia en pacientes libres de cáncer y en la metástasis a nódulos linfáticos (Zhao et al 2018), la progresión del cáncer e invasión (Basati et al 2020; Kashyap et al 2020).

Nanog ha sido propuesto como marcador pronóstico en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de células pequeñas de pulmón (Chang et al 2017), carcinoma oral de células escamosas (Kim et al 2017; Rodrigo et al 2017), tumores de ovario (Kenda et al 2017), carcinoma urotelial (Md Akhir, 2017), glioblastoma (Soni et al 2017; Kuciak et al 2019), cáncer gastrointestinal (Liang et al, 2018), cáncer colorectal (Wang et al 2017), cáncer de seno (Emadian et al 2019), cáncer renal (Rasti et al 2018), cáncer de cérvix (Han et al 2020).

2.8. Estructura de Nanog

La proteína Nanog contiene 305 aminoácidos, los primeros 95 pertenecen al dominio de interferencia, del 95 al 155 se encuentra el de transactivación u homeodominio, y de 155 al 305 se encuentra el de activación (Chambers et al 2003; Hayashi et al 2015).

La región N-terminal interfiere con la transcripción. Sobre esta región actúan co-represores que en conjunto con Nanog inhiben promotores involucrados en la diferenciación. Seis aminoácidos del homeodominio constituyen la señal de localización nuclear o NLS ((136)YKQVKT(141)). El dominio de activación o c-terminal contiene una unidad de dimerización (WR) conformada principalmente por triptófano, la cual incluye una señal de exportación nuclear independiente, CRM1 (NES). Sobre este actúan co-activadores que asociados con Nanog promueven la renovación celular y la pluripotencia (Chang et al 2009; Heurtier et al 2019)(Figura 2).

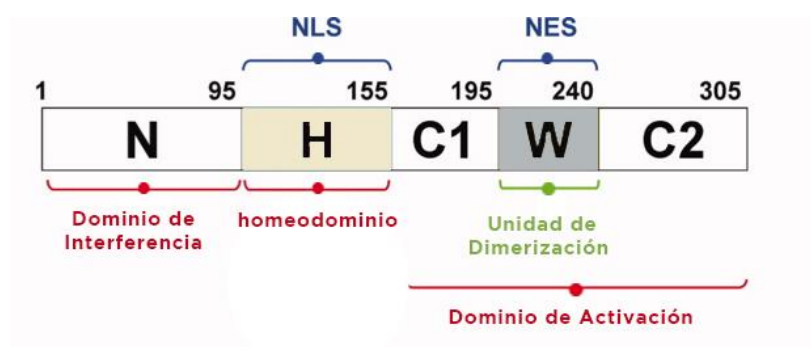


Figura 2. Estructura Nanog. Se muestra el dominio de interferencia, de transactivación u homeodominio y el de activación. NLS: señal de localización nuclear; NES: señal de exportación nuclear.

2.9. Cristalografía y unión de Nanog al ADN

La estructura del dominio H o de transactivación está compuesta por tres α -hélices (H1, H2 y H3) y un dobléz β . La hélice H3 forma una interfase de contacto extensivo en el surco mayor del ADN, lo cual es determinante en la especificidad de la secuencia consenso de unión (Hayashi et al 2015).

La secuencia de unión de Nanog ha sido publicada por tres autores principales: Mitsui et al 2003, C(G/C)ATTAN(G/C) obtenida a partir de la técnica Selex que emplea oligonucleótidos al azar y determina los que se unen al factor Nanog; Lin et al en 2015 determinaron la secuencia GCATTACC en el promotor de cJun; Das et al 2012 encontraron las secuencias GAATTAC y GGATTAA en el propio promotor de Nanog y para una amplia gama de especies incluyendo humano, chimpancé, tití común, vaca, caballo, rata y ratón.

2.10. Modificaciones traduccionales de Nanog

Nanog es fosforilado en su dominio N terminal por parte de ERK2 en Ser52 y de CDK1 en Ser71 para promover su estabilidad. Nueve de los once sitios de fosforilación localizados para Nanog se encuentran en el área rica en treonina y serina, en los residuos 50-79. Estos participan en la ubiquitinación y degradación de Nanog mediante una secuencia PEST (Brumbaugh et al 2014).

Nanog también sufre un sumoilación que suprime la expresión del factor *in vivo* al inhibir la actividad transcripcional de su promotor proximal (Wu et al 2012). Dicho factor también es ubiquitinado y degradado y dicha ubiquitinación revertida por peptidasas (Pei et al 2017).

2.11. Variantes de Nanog

Existen solo tres parálogos de Nanog que codifican para una proteína completa, los llamados *NANOG1*, *NANOG2* y *NANOGP8* y al menos ocho adicionales que no codifican proteínas enteras de Nanog. Las células humanas embriónicas expresan grandes cantidades de *NANOG1* y *NANOG2*. En contraste, la mayoría de las células cancerosas humanas expresan *NANOGP8* y parálogos no codificantes como *NANOGP4* and *NANOGP5*. *NANOGP8* es tan activo como *NANOG1* en la reprogramación de fibroblastos en células troncales pluripotentes, promoviendo plasticidad celular (Jiang et al 2016). Además, está involucrado en la clonogenicidad y tumorigenicidad. *NANOGP8* promueve tumorigenicidad de manera más activa que *NANOG1* (Mikulenkova et al 2020).

NANOG2 se encuentra mayormente en leucemia humana y comparte una estructura intrón-exón y una región promotora similar a la de *NANOG1*. Ambos son funcionalmente equivalentes (Eberle et al 2010). *NANOGP8* carece de intrones y solo difiere de *NANOG1* en dos aminoácidos; ambos localizados en dominios importantes para la regulación transcripcional (Guo, 2020).

2.12. Relación Nanog-AP1-VPH

Se conoce que Nanog es capaz de unirse al promotor del componente de AP1, c-Jun y de activar su expresión (Lin et al 2015). De la misma manera c-Jun aumenta la expresión de Nanog (Ibrahim et al 2012). c-Jun ha sido implicado en el incremento en la expresión de los oncogenes de VPH (Muñoz et al 2018; Morgan et al 2020). Se demostró que hay dos sitios de unión del factor AP1 en la LCR de VPH18 (García-Carrancá et al 1988). Cuando AP1 es activado por una mutante oncogénica de la proteína GTPasa H-Ras, llamada Rasv12, incrementa la expresión de E6 y E7 (Medina-Martínez et al 1997).

2.13. AP1 y Cáncer

El principal factor de AP1 lo constituye c-Jun, el cual está implicado en la proliferación (Ma et al 2012), la migración (Ibrahim et al 2018, Priyadarshini et al 2018), la tumorigénesis, la invasión, la angiogénesis (Vleugel et al 2006), la quimioresistencia (Xia et al 2013), la radioresistencia (Guo et al 2015), la metástasis (Zhang et al 2007), la transición epitelio-mesénquima (Lin et al 2018), el mal pronóstico y la progresión del cáncer (Zhang et al 2018).

c-Jun ha sido propuesto marcador pronóstico en distintos tipos de cáncer. Entre estos se incluye el carcinoma oral de células escamosas (Xu et al 2017), el cáncer colorectal (Liu et al 2017), el cáncer de hígado (Zhang et al 2007), el cáncer de pulmón (Khatlani et al 2007), el glioblastoma (Blau et al 2012), el cáncer gástrico (Peng et al 2016), el cáncer de ovario (Hein et al 2009), el cáncer de seno (Vleugel et al 2006) y el cáncer de cérvix (Lai et al 2020).

2.14. Estructura de AP1

El factor de transcripción AP1 es un complejo dimérico que contiene miembros de las familias de proteínas JUN (c-JUN, JUNB y JUND), FOS (c-FOS, FOSB, FRA-1 and FRA-2), ATF (ATF-2, ATF-3, ATF-4, ATF-5, ATF-6, ATF-6B, ATF-7, BATF, BATF-2, BATF-3 y JDP2) y MAF (c-MAF, MAFA, MAFB, MAFF, MAFG y MAFK) (Seo et al 2021). Todos los componentes de AP1 contienen un zipper básico de leucinas (bZIP). Juntos, el dominio zipper de leucinas y el dominio adyacente básico forman una especie de tijera flexible. Los dominios bZIP son esenciales para la unión al ADN porque reconocen diferentes elementos de respuesta en regiones regulatorias genómicas (Shaulian et al 2001; Shaulian et al 2002).

3. Preguntas de investigación

¿La sobreexpresión de Nanog incrementará la actividad de la LCR y la expresión de los oncogenes de VPH de alto riesgo? ¿Nanog se unirá de manera directa a la LCR o aumentará la expresión de AP1 unida a esta?

4. Hipótesis

Nanog aumenta la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH16 y 18, a través de AP1.

5. Objetivos

Objetivo general:

Determinar si Nanog aumenta la actividad de la LCR de VPH 16 y 18 y en consecuencia la expresión de los oncogenes E6 y E7, en cooperación con AP1 y/o a través de su unión a la LCR.

Objetivos particulares:

1. Evaluar si en la condición de cultivo de enriquecido en células troncales (esferas), donde Nanog se sobreexpresa, los oncogenes también están sobreexpresados.
2. Determinar mediante RT-PCR punto final si al transfectar Nanog los oncogenes también se sobreexpresan.
3. Comprobar la activación de las LCR de VPH 16 y 18 al sobreexpresar Nanog en líneas celulares libres de VPH.

4. Evaluar el efecto de la transfección de Nanog sobre los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares provenientes de cáncer cervical que contengan los genomas de VPH 16 o 18.
5. Realizar mutaciones en los sitios putativos de Nanog y sitios descritos de AP1 en la LCR de VPH 18 para comprobar si la activación de la misma mediada por Nanog se afecta.
6. Determinar si Nanog y c-Jun cooperan para aumentar la actividad de la LCR de VPH 18.
7. Comprobar si Nanog es capaz de unirse a la LCR de VPH18 in vivo y de aumentar a su vez la unión de c-Jun a la LCR.
8. Analizar si los sitios putativos mutados de la LCR de VPH18 que hayan afectado la acción mediada por Nanog también están presentes en la LCR de otros VPH de alto y bajo riesgo.
9. Comprobar si células 444, no tumorigénicas que contienen VPH, y transducidas con lentivirus Nanog tienen mayor capacidad de formar colonias en agar, independientes de anclaje, que las células 444 no transducidas.

6. Materiales y métodos:

6.1 Líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares derivadas de cáncer cervical SiHa (VPH16+) y HeLa (VPH18+), validadas por perfil de ADN SRT en la Universidad de Colorado. La secuenciación y el análisis se realizaron acorde al número de reporte DP0297. También se empleó la línea VPH negativo derivada de carcinoma cervical C-33 A, adquirida de ATCC, Manassas, VA (#HTB-31TM), la línea humana embrionaria inmortalizada con el antígeno T de SV40 (HEK-293T) proporcionada por el Dr. Joaquín Manzo Merino del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) y la línea epitelial de tumor pulmonar de ratón TC-1 donada por el Dr. Lutz Gissmann del Centro de Investigación en Cáncer, DKFZ, acorde a sus siglas en alemán. Finalmente, se empleó la línea no tumorigénica 444 conteniendo el VPH18 íntegro y funcional, la cual constituye un híbrido entre células HeLa y fibroblastos de pulmón humano donada por el Dr Frank Rösl del Instituto Heidelberg, Alemania. Las células fueron cultivadas en medio DMEM conteniendo 10% de suero fetal bovino, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina, Gibco®, Waltham, MA (#12800017, #16000044 y #15140-122, respectivamente) y mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

6.2 Cultivo de cervoesferas

Mil células por mL de medio MammoCult™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) fueron sembradas en placas de ultra baja adherencia (Corning, Inc., Corning, NY, USA). Las células fueron cultivadas durante 7 días. La formación de esferas se monitoreó diario. Las mismas se colectaron y se colocaron en un tubo de 15 mL en donde se mantuvieron durante 10 minutos. Luego se removió el sobrenadante, se lavaron las células con PBS y se disgregaron por pipeteo.

6.3 Formación de colonias en agar

Se preparó agar noble base al 1% en cajas de seis pozos y se dejó solidificar. Seguidamente, las células se tripsinizaron, lavaron, contaron y mezclaron con agar (0.6% concentración final) y se vertieron en los pozos. Se colocaron 1000 células por pozo. Las placas se checaron cada 5 días para proveer medio, suero y verificar el crecimiento de las colonias. A los 21 días las colonias fueron contadas empleando 6 campos por pozo a un aumento de 100X empleando el microscopio de luz Nikon eclipse E600 (Tokio, Japón).

6.4 Clonación y plásmidos

Los plásmidos pGL3-basic, pcDNA 3.1 (vector or V) y pcDNA 3.1-Nanog (Nanog o N) que codifica para Nanog fueron obtenidos de Promega (U47295), Invitrogen (#V79020), y Addgene (#28221), respectivamente. El vector HRasv12G (Rasv12 o R) fue descrito previamente (Miranda et al 1997). El LCR de VPH18 se clonó corriente arriba del gen reportero pGL3 para generar pLCR18luc (LCR18). El LCR de HPV16 (LCR16) fue descrito con anterioridad (Martínez-Ramírez et al 2017). Los plásmidos reporteros mutados en dos sitios AP1 de la LCR de VPH18 se generaron subclonando los LCR preexistentes mutados en pGL3. El plásmido que codifica para B-galactosidasa (Bgal) se obtuvo en promega (E108, Promega, Madison, WI, USA) y el que codifica para c-Jun se describió previamente (Hirai et al 1990).

6.5 Mutagénesis sitio-dirigida

Las mutaciones fueron generadas utilizando pLCR18 luc como plásmido base en conjunto con los siguientes cebadores, sitio N: 5'-TATGTTGTATGTTACTATATTTG TTGGTTATGTGGCGGGCAATAAAATATGTTTTGTGGTTCTGTGTGTTATGTG-3', y para el sitio N/A-E: 5'-CGCATATAGGCCACCTGGTGCGAGTCATTTTCCTGTCCAGG-

3'. Se empleó el kit de mutagénesis de Agilent #210513, el cual incluye una DNA polimerasa de alta fidelidad PfuUltra capaz de amplificar el plásmido en su totalidad. Los productos se trataron con la endonucleasa Dpn I para digerir el DNA parental y transformar los plásmidos en células ultracompetentes XL10-Gold. Las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de las clonas seleccionadas utilizando el analizador genético 3500 xL de Applied Biosystems™.

6.6 Transducción y producción de lentivirus

Las células HEK-293T se sembraron en placas de 6 pozos a una cantidad de 600 000 y fueron transfectadas con 2.5 µg de plásmido de segunda generación obtenidos de Addgene: psPax2 para empaque, pMD2.G para envoltura, pSin-EF2-Nanog-Pur para transferencia o pL-SIN-EF1α-EGFP para control de transferencia (#12260, #12259, #16578 and #21320, respectivamente). Se utilizó lipofectamina 3000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA, # L30000075) empleando el protocolo descrito en Invitrogen.

La transducción se realizó en células HeLa, usando la mitad del sobrenadante obtenido de un pozo proveniente de una placa de seis para los lentivirus de Nanog y GFP. Estas se sembraron de la siguiente manera en placas p100: para 3 días de incubación, 750 000; para 7 días, 350 000. El procedimiento se realizó en ausencia de suero y antibióticos y en presencia del polímero catiónico Polybrene (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, # H9268) a una concentración de 10 µg/ml. Después de incubar los lentivirus por 3 horas a 37°C el medio fue suplementado

con 5% de suero. Al tercer día de incubación se cambió el medio y las células fueron colectadas el mismo día o al día siete.

6.7 Transfecciones

En el caso de los ensayos de luciferasa las células TC-1, 250,000; C-33A, 290,000 y HEK-293T, 300,000 fueron sembradas y transfectadas al día siguiente empleando el agente PolyFect (Qiagen, Düsseldorf, GE, USA, #301105) en placas de 6 pozos. Se utilizó 1 µg de los vectores reporteros LCR 16/18 y 0.5, 1, 1.5, 2 µg del vector de expresión Nanog o 0.5 y 1 µg de H-Rasv12. Las células se colectaron a las 48 horas.

En el caso de la extracción de ARN las células HeLa, 450 000 y SiHa, 900 000 se transfectaron con PolyFect en placas de 60 mm, utilizado 2.5 µg de plásmidos de expresión de Nanog y H-Rasv12. Estas fueron colectadas luego de 48 horas.

Respecto a los western blots, las transfecciones realizadas fueron reversas, en estas 10 µg de Nanog o H-Rasv12 se mezclaron con 250 µl de medio DMEM y 32 µl de PolyFect e incubados 30 min a temperatura ambiente. Las células se sembraron en placas de 60 mm a la vez que los complejos DNA-PolyFect fueron añadidos. Se colocaron las siguientes cantidades TC-1, 1 500 000; C-33A, 2 000 000; HEK-293T, 1 800 000; HeLa, 1 350 000; SiHa, 2 700 000. Estas fueron colectadas 24 horas más tarde.

6.8 Western Blot

Las células se trataron con tripsina, se lavaron con PBS y se lisaron con buffer RIPA. Se corrieron sesenta microgramos de proteína en un gel de 12 % de poliacrilamida. Luego, estas fueron transferidas a una membrana de 0.2 µm de

nitrocelulosa y bloqueadas en 5% de leche baja en grasa. Después, se colocaron los siguientes anticuerpos: Nanog (#sc-134218), diluido 1/1000 en 5% de leche baja en grasa, α -tubulina (#sc32293, Santa Cruz, Dallas, TX), diluido 1/20 000 en 5% de leche baja en grasa, anti Ras (#OP40, Calbiochem, Burlington, MA), diluido 1/1000 en albumina al 0.2% y se incubaron overnight. Finalmente, se incubó el anticuerpo secundario antimouse acoplado a peroxidasa de rábano picante (#HAF007, R&D, Minneapolis) diluido 1/3000 en 5% leche baja en grasa. La quimioluminiscencia se detectó empleando el sustrato Immobilon HRP (Millipore, Burlington, MA, USA, #WBKLSO500) y el C-DiGiT (LI-COR, Biosciences, Lincoln, NB, USA) scanner.

6.9 Extracción de RNA, síntesis de cDNA, RTqPCR/RTPCR

La extracción de RNA se realizó empleando Trizol (Invitrogen, Waltham, MA, USA, #15596018) acorde al manual (MAN0016385) y el DNA fue digerido con DNAase I (Invitrogen, Waltham, MA, USA, #18068015). Se corrió un gel de agarosa al 1% en donde fue evaluada la presencia de las bandas 28S y 18S. El RNA se cuantificó y se realizó un PCR del gen constitutivo GAPDH para asegurar la ausencia de DNA en la muestra. Luego, 1 μ g de RNA por muestra fue empleado para la retro-transcripción utilizando el kit de transcripción reversa RevertAid First Strand Kit, según sus siglas en inglés (#K1691, Thermo ScientificTM, Waltham, MA, USA). Se obtuvo el cDNA y fue realizado un RTPCR de punto final para el oncogén E6 empleando los cebadores: E6 VPH16 5'-GGG GGA TCC ATG TTT CAG GAC CCA CAG GAG CGA-3' y 5'-GGG GAA TTC TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG-3' E6 VPH18 5'-GGG GGA TCC ATG GCG CGC TTT GAA GAT CCA ACA-3' y 5'-GGG GAA TTC TTA TAC TTG TGT TTC TCT GCG TCG TTG-3' y la polimerasa taq M3001 (Promega). Fue observada la banda esperada de 426 pb en gel de agarosa al 2.5%.

Además, fue efectuado un RTqPCR utilizando el kit Thermo Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (#K0251, Thermo ScientificTM, Waltham, MA,

USA). Fueron utilizados los siguientes cebadores: E6-18-F: 5'-GCG ACC CTA CAA GCT ACC TG-3', E6-18-R: 5'-GTT GGA GTC GTT CCT GTC GT-3'; E7-18-F: 5'-AAC ATT TAC CAG CCC GAC GA-3', E7-18-R: 5'-TCG TCT GCT GAG CTT TCT AC-3'; E6-16-F: 5'-ACT GCA ATG TTT CAG GAC CC-3', E6-16-R: 5'-TCA GGA CAC AGT GGC TTT TG-3'; E7-16-F: 5'-CCC AGC TGT AAT CAT GCA TG-3', E7-16-R: 5'-TGC CCA TTA ACA GGT CTT CC-3'; GAPDH-F: 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT-3', GAPDH-R: 5'-CCA TGG GTG GAA TCA TAT TGG AA-3'. El PCR se realizó de la siguiente manera: 95°C/10 min, 35 ciclos: 95°C/35 s; 60°C/35 s; 72°C/35 s. Los datos fueron procesados con el método Delta CT.

6.10 Ensayos de luciferasa

Las células se lavaron, se tripsinizaron y se resuspendieron en 30 µl de buffer de lisis. Fueron lisadas empleando varios ciclos de congelación en hielo seco alternados con calentamiento a 37°C por 45 s. La mezcla fue homogenizada a través de vórtex después de cada paso de calentamiento. Se empleó el kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA, #E1910), según sus siglas en inglés. Las actividades de luciferasa y βgalactosidasa se detectaron en un luminómetro GloMax 20/20 (Promega). Para medir la de βgalactosidasa se empleó un buffer conteniendo 100mM de fosfato de sodio pH 8, 1mM de cloruro de magnesio y Galactón al 1X (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA, #T2120). Adicionalmente, se empleó un compuesto acelerador justo en el momento de la medición (Thermo Scientific Waltham, MA, USA, #T2222) y la señal se detectó durante 5S.

6.11 Ensayos de CHIP

La inmunoprecipitación de cromatina se realizó empleando el kit One Day ChIP (Diagenode, Denville, NJ, USA, #C01010080), según sus siglas en inglés. Por cada condición se utilizaron tres placas de 100 mm en las cuales se sembraron

células HeLa hasta quedar a una confluencia del 85 %. Estas fueron fijadas en 1% de formaldehído y la fijación detenida con 125 mM de glicina. Luego fueron lisadas con un buffer conteniendo 1% SDS, 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM Tris-HCL (pH 8.0) e inhibidores protéicos al 1X (Roche #04693159001).

La cromatina se fragmentó utilizando un procesador ultrasónico (Gene Q, modelo GEX500 SOVC505-00) a un ciclo de 37 % de amplitud por 30 s, alternando 5s ON/ 3 s OFF. El tamaño de los fragmentos obtenidos, observados a través de gel de agarosa al 1%, se encontró entre 200-500pb. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el kit de Pierce BCA Protein Assay, según sus siglas en inglés (ThermoFisher #23225). Para cada inmunoprecipitación se emplearon 700 µg de proteína y se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-Nanog (#5232S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti c-Jun (Abcam, Cambridge, UK, #ab31419) y anti IgG (Diagenode, Denville, NJ, USA, kch-504-250).

Se realizó un PCR cuantitativo en el que se amplificó como control negativo una región del cromosoma 7 para las inmunoprecipitaciones de Nanog y c-Jun con el siguiente par de cebadores F: 5'-TCTAGGCTAGGGTAGTGAAGCAC-3' y R: 5'-GGGACAGCCAGTGATGAAGAAA-3'. Como control positivo para Nanog se amplificó un segmento del promotor de este gen con los cebadores F: 5'-GTCTGGGTTACTCTGCAGCTACT-3' y R: 5'-CTTAGACC CACCCCTCCTGGC-3'. Como control positivo de c-Jun se amplificó una región perteneciente al promotor de la ciclina D, empleando los cebadores: F: 5'-CCAGGGCAAATTCTA AAGGT-3' y R: 5'-CACACCTCTGAATGGAAAGC-3'. Finalmente, para amplificar la LCR de VPH18 se utilizaron los cebadores F: 5'-CTTTTGGGCACTGCTCCTAC-3' y R: 5'-GCAGTTTTTACTTAGGGAGTGGA-3'.

La PCR se realizó como se describió en la sección 6.9, a excepción de las temperaturas de hibridación que variaron acorde a los pares de cebadores empleados: 60 °C para el control negativo de c-Jun y Nanog, para control positivo de Nanog 62°C, para el control positivo de c-Jun 58 °C y para el LCR 59 °C. La

eficiencia de cada primer se calculó en base a los resultados obtenidos de una curva standard hecha de diferentes diluciones de input. La ocupación de c-Jun y Nanog se calculó con respecto al control negativo IgG. Las fórmulas empleadas se extrajeron del protocolo del kit de Diagenode (C01010055).

6.12 Análisis in silico

Los sitios putativos de Nanog empleados para el análisis in silico fueron los reportados por Mitsui et al. 2003 (C(G/C)ATTAN), Lin et al. 2015 (GCATTAC) y Das et al. 2012 (GAATTAC), los cuales fueron explorados en las secuencias de LCR de 12 VPH diferentes (5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, and 56) y 2 VP que infectan macacos (MmPV1 & MmPV2), según sus siglas en inglés. Se empleó el programa Clustal W2 para alinear múltiples secuencias. Las LCR empleadas de los distintos papilomas obtenidas del sitio NCBI se muestran en la tabla I.

6.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa GraphPad Prism Software, Inc. Se emplearon los ensayos ANOVA de una sola vía y de comparación múltiple de Tukey. Los valores por debajo de 0.05 fueron considerados significativos. Se utilizaron tres réplicas por cada experimento.

Tabla I. Secuencias de VPH analizadas.

GÉNERO	ESPECIE	TIPO	LCR	GENBANK	REFERENCIA
Alpha	10	6	7292/ 101	NC_001355.1	Schwarz E, Dürst M, Demankowski C, Lattermann O, Zech R, Wolfsperger E, Suhai S, zur Hausen H. DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. EMBO J. 1983;2(12):2341-8.

				PMCID: PMC555455. PMID: 6321162
		11	7277/ 101	M14119.1 Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, zur Hausen H. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. Virology. 1986 May;151(1):124-30. doi: 10.1016/0042-6822(86)90110-8. PMID: 3008427
	9	16	7157/97	K02718.1 Seedorf K, Krämer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology. 1985 Aug;145(1):181-5. doi: 10.1016/0042-6822(85)90214-4. PMID: 2990099
		31	7067/107	J04353.1 Goldsborough MD, DiSilvestre D, Temple GF, Lorincz AT. Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus. Virology. 1989 Jul;171(1):306-11. doi: 10.1016/0042-6822(89)90545-x. PMID: 2545036
		35	7110/109	M74117.1 Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD, Temple GF. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. Virology. 1987 Jul;159(1):187-90. doi: 10.1016/0042-6822(87)90366-7. PMID: 3037779
		52	7155/101	X74481.1 Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol. 1994; 186:13-31. doi: 10.1007/978-3-642-78487-3_2. PMID: 8205838.
	5	51	7036/96	M62877.1 Lungu O, Crum CP, Silverstein S. Biologic properties and nucleotide sequence analysis of human papillomavirus type 51. J Virol. 1991 Aug;65(8):4216-25. doi: 10.1128/JVI.65.8.4216-4225.1991. PMID: 1649326; PMCID: PMC248858.
	6	56	7098/101	X74483.1 Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human

				papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol. 1994;186:13-31. doi: 10.1007/978-3-642-78487-3_2. PMID: 8205838.	
	7	18	7137/104	NC_001357	Cole ST, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. J Mol Biol. 1987 Feb 20;193(4):599-608. doi: 10.1016/0022-2836(87)90343-3. PMID: 3039146
		45	7150/101	X74479.1	Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol. 1994; 186:13-31. doi: 10.1007/978-3-642-78487-3_2. PMID: 8205838.
	12	MmPV1	7468/199	M60184.1	Ostrow RS, LaBresh KV, Faras AJ. Characterization of the complete RhPV 1 genomic sequence and an integration locus from a metastatic tumor. Virology. 1991 Mar;181(1):424-9. doi: 10.1016/0042-6822(91)90519-h. PMID: 1847267.
		MmPV2	7061/ 7876	MG837557.1	Long T, Wong PY, Ho WCS, Burk RD, Chan PKS, Chen Z. Complete Genome Sequences of Six Novel Macaca mulatta Papillomavirus Types Isolated from Genital Sites of Rhesus Monkeys in Hong Kong SAR, China. Microbiol Resour Announc. 2018 Dec 6;7(22):e01414-18. doi: 10.1128/MRA.01414-18. PMID: 30533857
Beta	1	5	7468/199	NC_001531.1	Zachow KR, Ostrow RS, Faras AJ. Nucleotide sequence and genome organization of human papillomavirus type 5. Virology. 1987 May;158(1):251-4. doi: 10.1016/0042-6822(87)90263-7. PMID: 3033892.
		8	7396/195	M12737.1	Fuchs PG, Iftner T, Weninger J, Pfister H. Epidermodysplasia

		<p>verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. J Virol. 1986 May;58(2):626-34. doi: 10.1128/JVI.58.2.626-634.1986. PMID: 3009874</p>
--	--	--

6. Resultados

7.1 En el modelo de esferas el oncogén E7 de VPH16 se sobreexpresa

Con el objetivo de determinar si en la condición de cultivo de esferas o enriquecidos en células troncales, en la cual Nanog está normalmente sobreexpresado, el oncogén E7 también se sobreexpresa, se realizó un RT-qPCR en tiempo real. Las células SiHa fueron crecidas a la par en ambas condiciones de cultivo, esfera (E) y monocapa (M), y su RNA fue extraído. Se determinó la expresión de los mensajeros Nanog (N), Oct 4 (O), Sox2 (S) y E7 (Figura 3). Al comparar la condición esfera vs monocapa se determinó la existencia de una sobreexpresión de E7 de aproximadamente 17, Nanog de 7 y Oct4 de 4 veces en esfera con respecto a monocapa. La expresión de Sox 2 no cambió. Finalmente, se concluyó que en la condición de cultivo de esferas, el oncogén E7 de VPH16 está sobreexpresado.

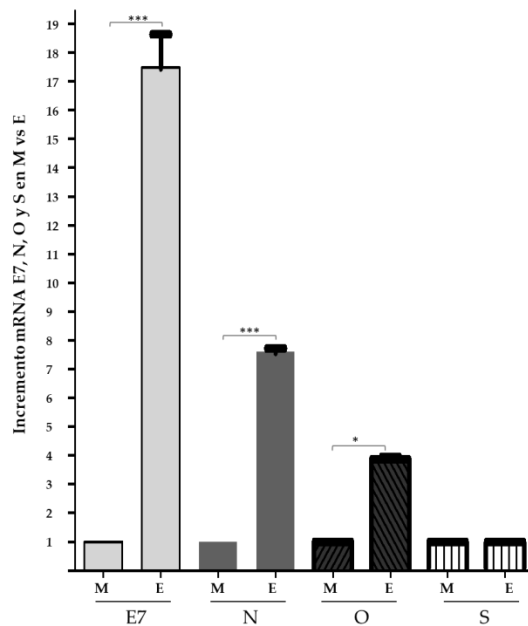


Figura 3. El oncogén E7 se sobreexpresa en la condición de esferas. Se realizó RT-qPCR y se midió la expresión de los genes E7, Nanog (N), Oct4 (O) y Sox2 (S) de la línea SiHa en la condición cultivo de esferas (E) comparada con la de cultivo en monocapa (M). Se muestra la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Se realizó un ANOVA de una sola vía con análisis Tukey para evaluar las diferencias significativas. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

7.2 Nanog incrementa la actividad transcripcional del LCR de los VPH 16 y 18.

Se realizaron curvas de dosis respuesta de sobreexpresión de Nanog con el objetivo de determinar si dicho factor es capaz de aumentar la actividad de la LCR de VPH 16 y 18 (LCR16 y LCR18) de manera dosis dependiente. Las células tumorales C-33A fueron transfectadas con $1\mu\text{g}$ de los vectores reporteros LCR16 o LCR18, el control negativo vector vacío (V) o $0.5\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$, $1.5\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$ de Nanog (N). Las curvas fueron normalizadas con el gen reportero β galactosidasa (Figura 4). Se pudo observar una tendencia al incremento en la actividad de ambas LCR a medida que la concentración de Nanog aumentó. A diferencia de la LCR16, la

actividad de la LCR18 se saturó a partir de 1.5 μg de N. Teniendo en cuenta estos resultados se escogieron los valores 0.5 μg y 1 μg de N para subsiguientes experimentos. Se concluyó que Nanog es capaz de aumentar la actividad de las LCR 16 y 18 de manera dosis dependiente.

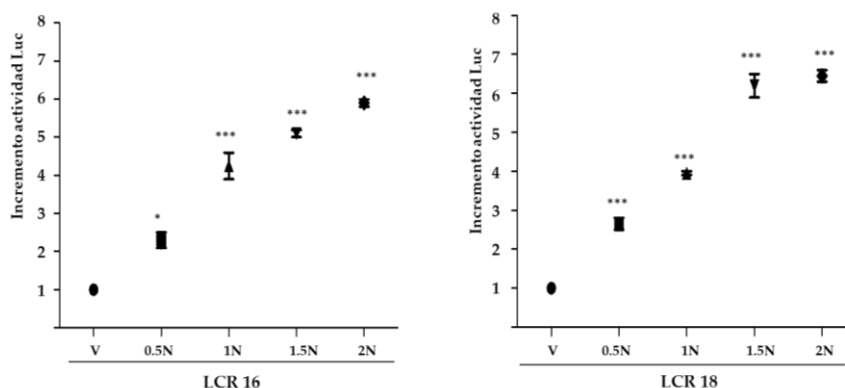


Figura 4. Nanog aumenta la actividad de la LCR de manera dosis dependiente. Se transfectaron las células C-33A con los genes reporteros con vectores reporteros conteniendo la LCR de VPH16 (LCR16) o la LCR de VPH18 (LCR18) dirigiendo la expresión del gen luciferasa y cotransfectados con distintas cantidades de vector de expresión de Nanog (N) (0.5, 1, 1.5 y 2 μg). Se empleó el gen reportero de β galactosidasa (β gal) como control interno de la variación celular de cada condición. El error estándar de la media de tres experimentos independientes se graficó en la figura. Se empleó un Anova de una vía con análisis Tukey para evaluar las diferencias significativas con respecto al vector vacío (V). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Luego, se cotransfectaron vectores conteniendo la LCR de VPH 16 o 18 clonado corriente arriba del gen luciferasa, en conjunto con un vector vacío (control negativo), o 0.5 y 1 μg de plásmido de expresión de Nanog o 0.5 y 1 μg de Rasv12 como control positivo. Dichas gráficas se realizaron en las células tumorigénicas (C-33A y TC-1) (Figura 5). Se observó que Nanog transfectado de manera transitoria incrementa significativamente y de manera dosis dependiente de dos a tres veces más la actividad reportera de VPH 16 y 18, como se muestra en la figura 5. En la condición en que se cotransfectó con el plásmido control positivo Rasv12 también se observó un incremento significativo en todos los casos. Finalmente, la expresión de Ras y Nanog fue verificada por Western Blot en el

cual se observó un incremento en la concentración de ambos factores transfectados.

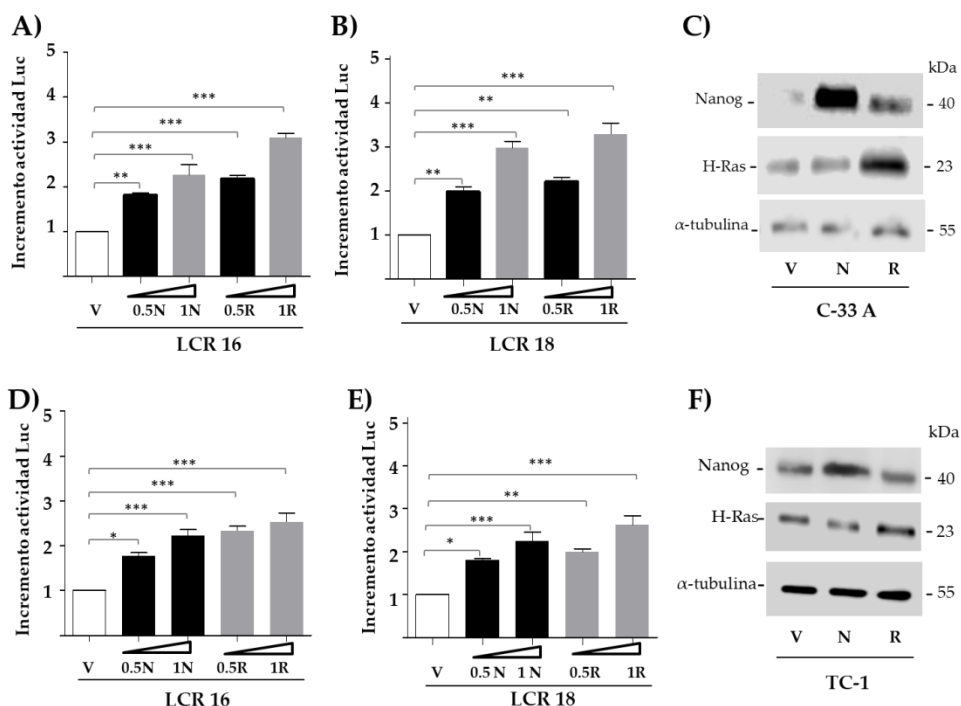


Figura 5. Nanog activa la LCR de VPH 16 y 18 de manera dosis dependiente. Se transfectaron las células C-33A, A), B) y TC-1, D), E) con vectores reporteros conteniendo la LCR de VPH16 (LCR16) o la LCR de VPH18 (LCR18) dirigiendo la expresión del gen luciferasa y cotransfectados con vector vacío (V), Nanog (N), Rasv12 (R). Diferentes concentraciones de N y R fueron empleadas (0.5 µg y 1 µg). Se utilizó el gen reportero de βgalactosidasa (βgal) como control interno de la variación celular de cada condición. El error estándar de la media de tres experimentos independientes se graficó en la figura. Se empleó el Anova de una vía con análisis Tukey para evaluar las diferencias significativas. * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001. Se realizó un Western Blot de las células transfectadas C) C-33A y F) TC-1. Se midió la sobreexpresión de N y R; α-tubulina se empleó como control de carga proteico.

Basado en la gráfica ejecutada en la figura 5 se realizó un ensayo de luciferasa empleando solamente la concentración de 1µg de N y R en las células transformadas HEK-293T. Los resultados obtenidos mostraron también un incremento significativo pero esta vez de tres a cuatro veces más para la actividad de la LCR, como se muestra en la figura 6. Con base a estos resultados se concluyó que Nanog regula positivamente la actividad transcripcional VPH 16 y 18 a través de sus respectivas regiones regulatorias.

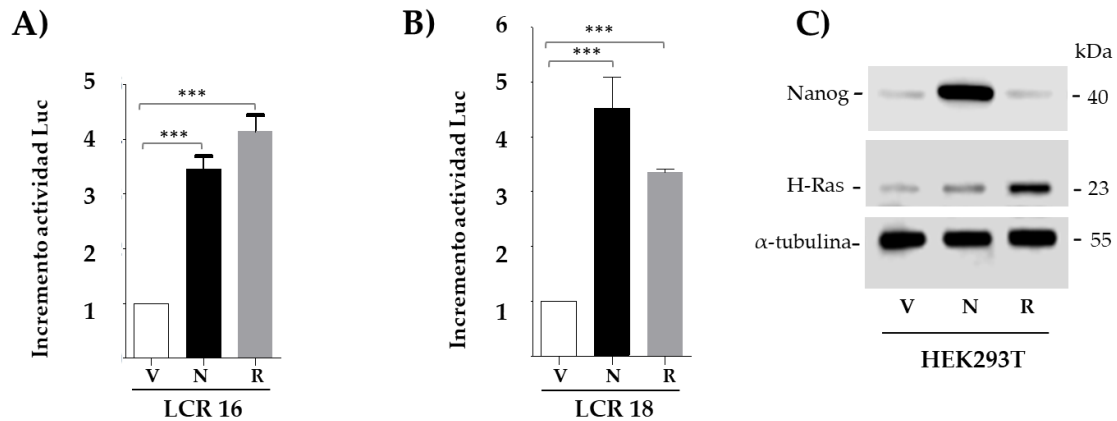


Figura 6. Nanog activa la LCR de VPH 16 y 18. Se transfectaron las células transformadas con vectores reporteros conteniendo la LCR de VPH16 (LCR16), A) o la LCR de VPH18 (LCR18), B) dirigiendo la expresión del gen luciferasa y cotransfectados con vector vacío (V), Nanog (N) y Rasv12. Se utilizó el gen reportero de βgal como control interno de la variación celular de cada condición. El error estándar de la media de tres experimentos independientes se graficó en la figura. Se empleó el test Anova de una vía con análisis Tukey para evaluar las diferencias significativas. *** $p \leq 0.001$. Se realizó un Western Blot de las células transfectadas C). Se midió la sobreexpresión de N y R; α-tubulina constituye el control de carga proteico.

7.3 Nanog exógeno incrementa la expresión de E6 y E7 en células derivadas de cáncer y positivas a VPH 16 y 18

Se realizó un RT-PCR de punto final con el propósito de determinar si las células SiHa y HeLa transfectadas con Nanog o su control positivo Rasv12 eran capaces de mostrar un incremento apreciable del oncogén E6. Ambas líneas celulares fueron transfectadas con Nanog (N), vector vacío (V), Rasv12 (R) y agente transfectante (P). En la figura 7 se muestran los geles correspondientes a la expresión de E6 y de GAPDH. En el caso de células SiHa se pudo apreciar un incremento del oncogén E6 en células transfectadas con Nanog. En el caso de las HeLa fue mayor el aumento observado, y también pudo apreciarse un incremento considerable de E6 en células transfectadas con el control positivo R. Se concluyó que Nanog aumenta de manera visible la expresión del mensajero E6.

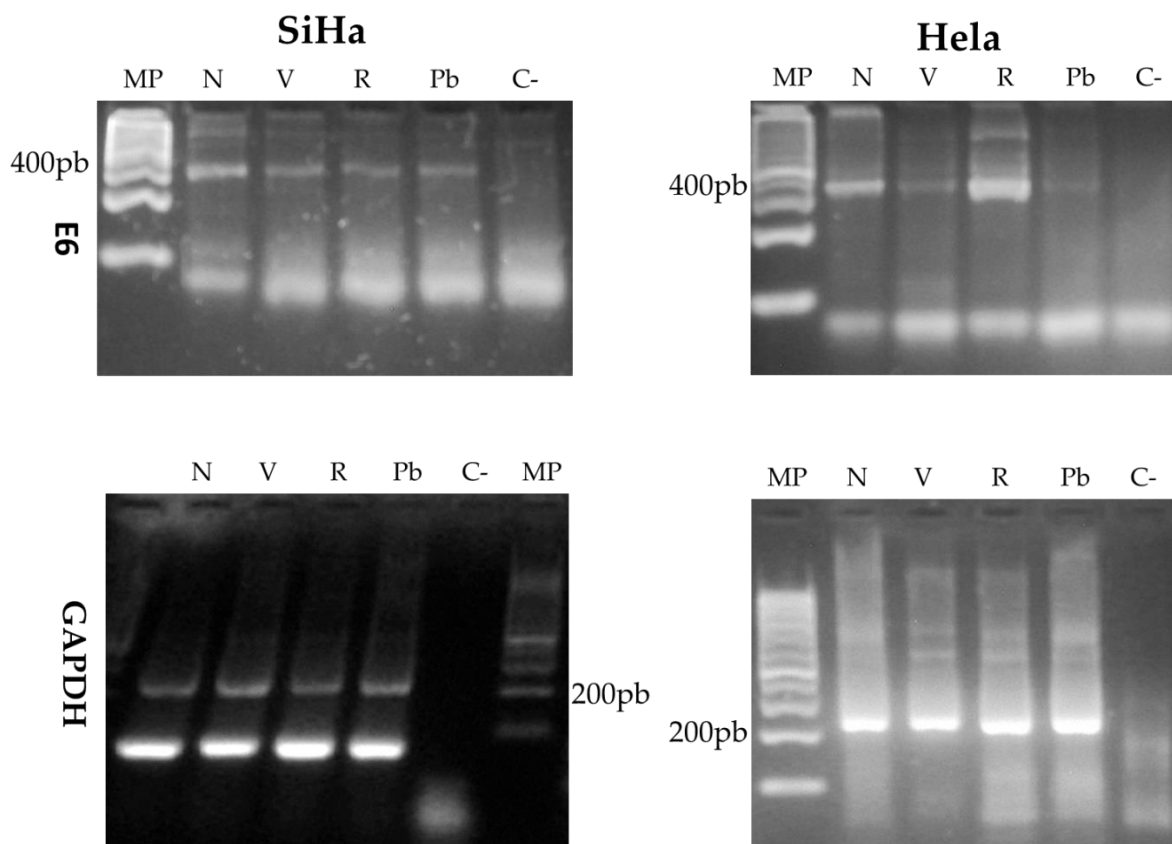


Figura 7. Nanog aumenta la expresión del oncogen E6. Se realizó RT-PCR de punto final de E6 en células SiHa y HeLa transfectadas con Nanog (N) vector vacío (V), Rasv12 (R) o agente transfectante polyfect (P). En el control negativo (C-) se amplificó el agua empleada en la PCR. Se empleó GAPDH como control de carga. MP, Marcador de peso.

Además, se evaluó el efecto de la transfección de Nanog en la expresión endógena de los oncogenes E6 y E7 mediante RTqPCR. Tanto SiHa como HeLa exhibieron un incremento significativo en los niveles de E6 y E7 al transfectar Nanog. La expresión de los oncogenes incrementó de 3 a hasta 6 veces aproximadamente al comparar la condición Nanog vs vector vacío o agente transfectante. Además, se observó un incremento significativo en la condición de sobreexpresión del control positivo, Rasv12. (Figura 8 A y B). Se corroboraron mayores niveles de Nanog y Rasv12 en las células tratadas con dichos vectores de expresión (C y D).

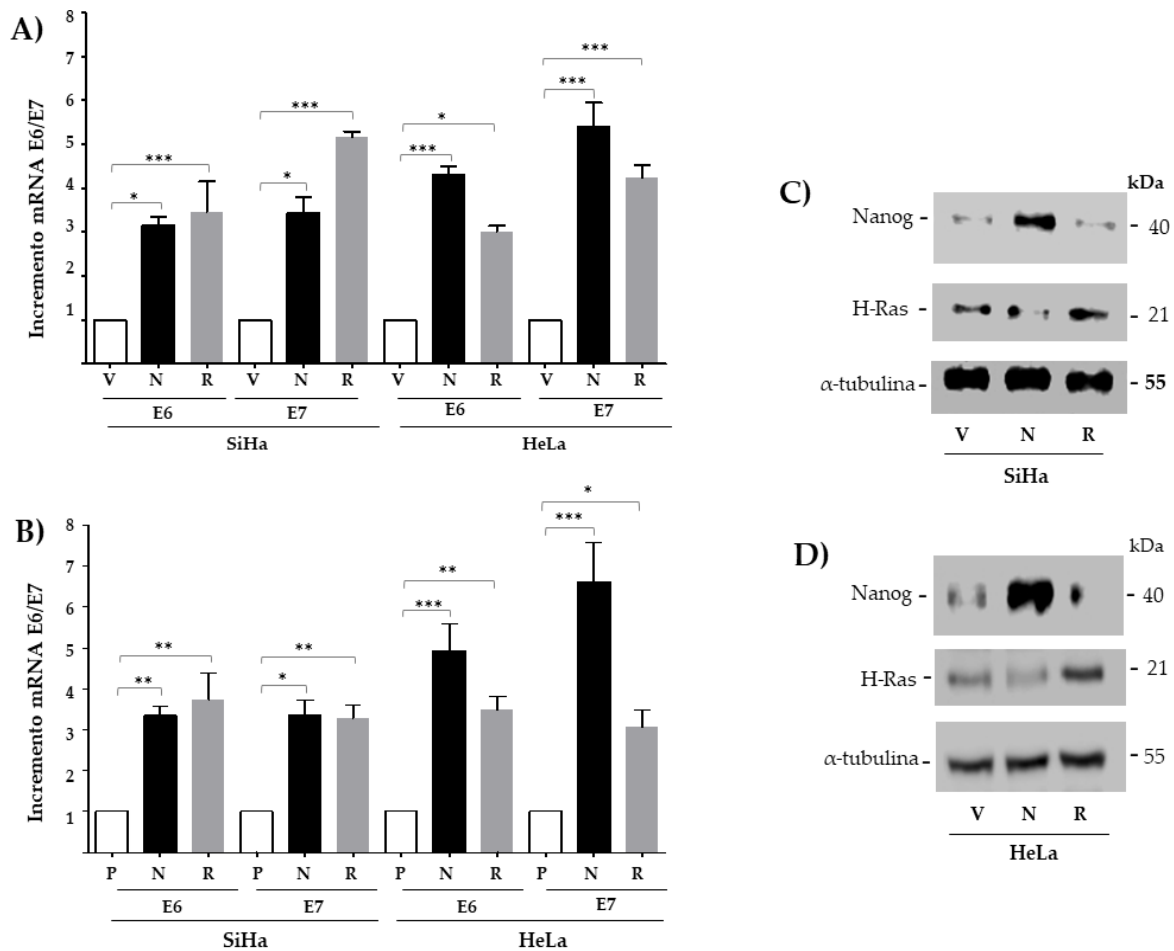


Figura 8. Nanog aumenta la expresión de E6 y E7. Las células SiHa y HeLa fueron transfectadas transitoriamente con vector vacío (V) o solo agente transfectante (P), Nanog (N) y Rasv12 (R), como control positivo. A) y B) RT-qPCR de E6 y E7. La media y la desviación estándar de tres experimentos independientes se visualizan en las gráficas. Se realizó un Anova de una sola vía con un análisis de Tukey para evaluar las diferencias significativas. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. C) y D) Se evaluó la sobreexpresión de N y R en células SiHa y HeLa. Se empleó α -tubulina como control de carga.

7.4 Los sitios Nanog y AP1 son necesarios para la activación de la LCR mediada por Nanog

Para corroborar el reporte de que Nanog aumenta la expresión del componente de AP1, c-Jun (Lin et al 2015), se midió la expresión proteica de c-Jun en células transfectadas con Nanog. En la figura 9 A) se aprecia un aumento de los niveles

proteicos correspondientes a c-Jun con respecto a su control negativo, vector vacío. Dado el caso, se procedió a realizar un ensayo que permitiera determinar si Nanog es capaz de aumentar la transcripción de VPH al unirse a uno de sus sitios putativos o a través de los sitios AP1 previamente reportados en la LCR (Thierry et al 1992).

Se realizó mutagénesis en las bases no variables de los sitios de unión putativos de Nanog. Se emplearon plásmidos reporteros para crear mutaciones independientes de N o N/A-E, como se indica en la figura 9 B). Los nucleótidos mutados se indican en negritas arriba de las bases no variables. N/A-E comprende elementos de AP1, reportado previamente por Thierry et al como distal; también contiene elementos putativos de Nanog, por lo cual se consideró como un sitio combinado Nanog/AP1. Además, en este estudio se emplearon plásmidos conteniendo el sitio proximal AP1 (A-P) o mutaciones dobles, incluyendo los sitios distal y proximal AP1 (A-EP), cuando cualquiera de estos fue mutado no se observó activación de la LCR de VPH18 por parte de Nanog, a diferencia de la activación observada al emplear el vector WT (Figura 9 C). Por tanto, los sitios AP1 y Nanog intactos son necesarios para la activación de la LCR de VPH18 mediada por Nanog.

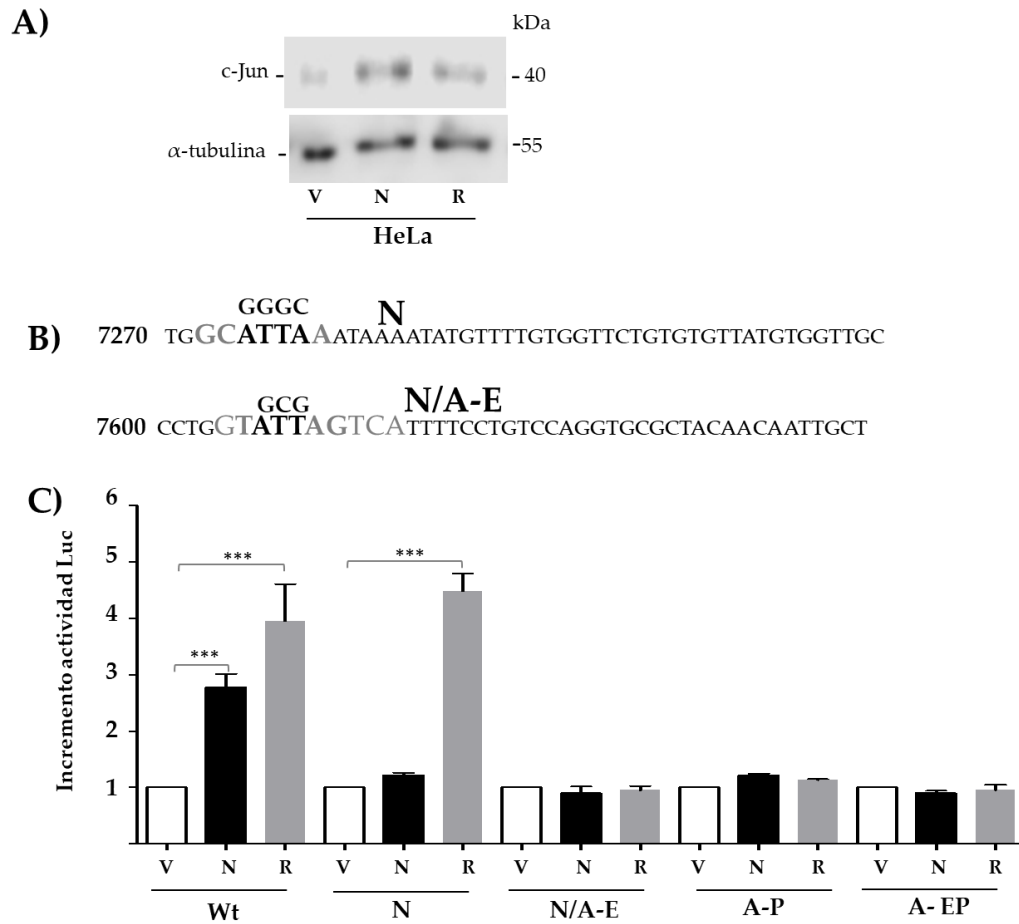


Figura 9. Las mutaciones en los sitios Nanog y AP1 impiden el incremento en la actividad de la LCR de VPH18 mediada por Nanog. A) Western Blot para corroborar el incremento en la expresión proteica de c-Jun al sobreexpresar Nanog. Se empleó α -tubulina como control de carga. B) Se representan los sitios de Nanog en la LCR de VPH18 (N, N/A-E) y las mutaciones introducidas. C) Se evaluó la actividad de la luciferasa en las células HEK293T cotransfectadas transitoriamente con vectores reporteros conteniendo el LCR de VPH18 sin cambios en su secuencia (Wt), mutaciones en los sitios Nanog (N), en el combinado Nanog/AP1 (N/A-E), AP1 proximal (A-P) o AP1 doble mutante (A-EP) en conjunto con vector vacío (V), Nanog (N) o Rasv12 (R), como control positivo. Se empleó el reportero B-gal como control interno de la variación celular de cada condición. En la gráfica se muestra el error estándar de la media de tres experimentos independientes. Se empleó un ANOVA de una sola vía para evaluar las diferencias significativas. *** $p \leq 0.001$.

7.5 Nanog se une in vivo a la LCR de VPH18 y aumenta la unión de c-Jun

Para determinar si Nanog se une in vivo a la LCR de VPH18 y promueve la unión de c-Jun a esta región se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina. En la condición de células HeLa tratadas sólo con el agente utilizado para la transducción polybrene (P_b) como control negativo se mostró un aumento de tres a cuatro veces en el enriquecimiento de c-Jun y Nanog. En contraste, en la de células HeLa transducidas con lentivirus que codifica para Nanog (N_L) se observó un incremento entre seis y ocho veces en el enriquecimiento de ambos factores transcripcionales (Figura 10 A). Para este ensayo se realizó la transducción de células HeLa con N_L durante tres y siete días y se escogió la última condición por mostrar mayor sobreexpresión de la proteína Nanog (Figura 10 B). En conclusión, Nanog es capaz de unirse a la LCR de VPH18 in vivo y cuando este es sobreexpresado incrementa su unión a la LCR junto con la del factor c-Jun.

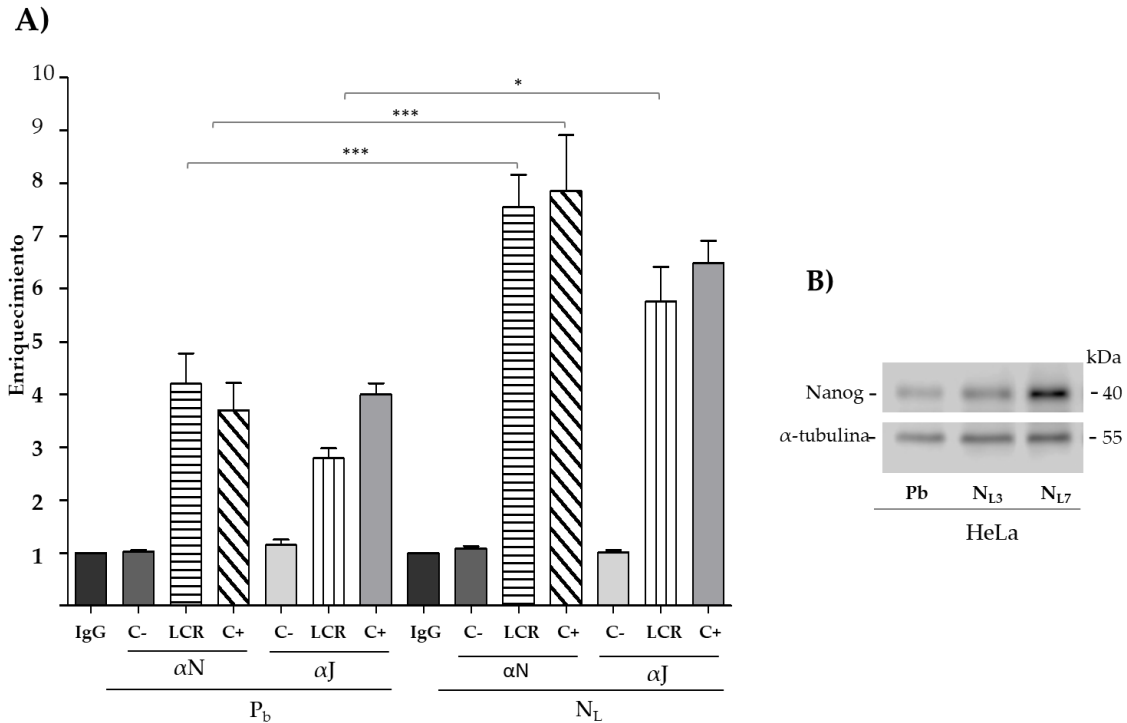


Figura 10. Nanog se une a la LCR de VPH18 in vivo e incrementa la unión de c-Jun cuando se sobreexpresa. A) Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina realizado en células HeLa tratadas con vehículo (Pb), panel izquierdo o transducidas con lentivirus expresando Nanog, colectadas siete días después de la transducción (NL), panel derecho. La cromatina se inmunoprecipitó con los anticuerpos anti Nanog (α N) y anti c-Jun (α J). El anticuerpo anti IgG fue empleado como isotipo control negativo. Luego se realizó una qPCR empleando cebadores para la LCR de VPH18 con el objetivo de medir la unión de Nanog y c-Jun (LCR) y una región del cromosoma 7, como control negativo (C-) para Nanog y c-Jun. Como controles positivos (C+) para Nanog y c-Jun se emplearon el promotor de Nanog y de la ciclina D1, respectivamente. B) Western Blot de sobreexpresión de células HeLa transducidas con lentivirus Nanog durante 3 (NL3) y 7 días (NL7). Se empleó α -tubulina como control de carga.

7.6 Nanog y c-Jun cooperan para incrementar la actividad de la LCR.

Para determinar si Nanog en conjunto con c-Jun, es capaz de incrementar la actividad de la LCR de VPH18 más que c-Jun (J) o Nanog (N) por separado se realizó un ensayo de luciferasa. Las células TC-1 se transfectaron con los reporteros LCR18 Wt, LCR18 mutada en N o LCR18 mutada en A-EP además de vector vacío (V), J, N, Rasv12 (R) o N and J en conjunto (NJ). En la condición LCR18 WT en la cual NJ fue transfectado se observó un incremento de 6 veces, mientras con N solamente el incremento fue de 3.5 veces y con solo J de 3 veces (Figura 11A). Por lo cual se concluyó la existencia de una cooperación entre Nanog y c-Jun para aumentar la actividad de la LCR.

En la condición en la cual un sitio Nanog fue mutado no se observó cooperación pero se determinó que la acción de c-Jun sobre la LCR no es afectada por la mutación del sitio Nanog. Sin embargo, en el caso de la condición en que los sitios AP1 son mutados se afecta tanto la acción de Nanog como la de c-Jun. La sobreexpresión de c-Jun y de su control positivo Rasv12 fue medida por Western Blot (Figura 11 B). Finalmente, se concluyó que el efecto combinado de Nanog y c-Jun es más fuerte que el causado por cualquiera de estos factores por si solos y que los sitios AP1 presentes en la LCR son determinantes para la acción de ambos factores de transcripción sobre esta.

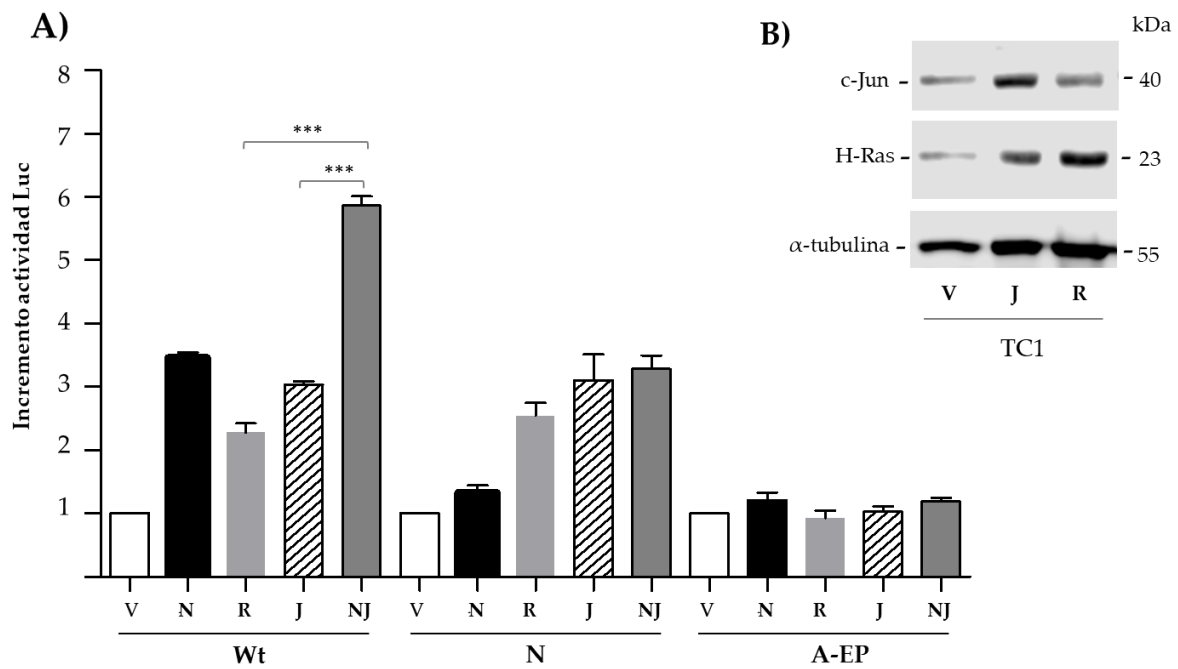


Figura 11. Nanog y c-Jun, en conjunto aumentan la actividad de la LCR de VPH18 más que individualmente. A) Las células TC-1 se transfectaron transitoriamente con vectores de LCR de VPH18 Wt, mutado en el sitio Nanog (N) o en los dos sitios AP-1 (A-EP), dirigiendo la expresión del gen de la luciferasa y se cotransfectaron con vector vacío (V), Nanog (N), Rasv12 (R) y c-Jun (J) solo o en combinación con Nanog (NJ). Se empleó el reportero B-gal como control interno de la variación celular de cada condición. En la gráfica se muestra el error estándar de la media de tres experimentos independientes. Se realizó un Anova de una sola vía con un análisis Tukey para determinar si las diferencias observadas resultan significativas. *** $p \leq 0.001$. B) Western Blot en el cual muestra la sobreexpresión de c-Jun y su control positivo Rasv12. Se empleó α -tubulina como control de carga.

7.7 Identificación de sitios de unión de Nanog en los distintos LCR de Alfa y Betapapilomavirus asociados con el desarrollo de cáncer

Con el objetivo de evaluar si los sitios de Nanog N y N/A-E, responsables de activar la transcripción de los oncogenes se encuentran en las regiones regulatorias de varios VPH, se realizó un estudio comparativo de sitios putativos de unión de Nanog en diferentes VPH, mayormente asociados con el desarrollo de cáncer. Se efectuó un análisis *in silico* en VPH pertenecientes al género *Alphapapillomavirus* asociados con lesiones de alto grado (16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, y 56) y bajo grado (6 y 11) o *Betapapillomavirus* asociados con cáncer de piel (5 y 8).

Sorpresivamente, el estudio mostró que mientras la LCR de los VPH asociados con cáncer contiene al menos un sitio putativo de unión de Nanog, ninguno fue encontrado en los VPH 6 y 11 que sólo desarrollan lesiones benignas. Las secuencias de los sitios descubiertos resultaron ser muy parecidas a los comprobados localizados en este estudio en la LCR de VPH18 (Tabla II).

Tabla II. Sitios putativos de Nanog encontrados en la LCR de *Alfa-* y *Betapapillomavirus*

GÉNERO	ESPECIE	TIPO	POSICIÓN	SITIOS-PUTATIVOS-DE UNIÓN NANOG	BASES A +1	
<i>Alfa</i>	9	16	7171 - 7177	5' - tatggtGAATTAGtggtg - 3'	823	
		31	7813 - 7819	5' - tgcataGCATTATaaataa - 3'	199	
			7861 - 7867	5' - atatagGTATTACaccgtt - 3'	152	
		35	7565 - 7771	5' - cttgcaGTATTAGtcattt - 3'	386	
			7761 - 7767	5' - ctactGTATTACacattg - 3'	193	
		52	7334 - 7340	5' - gtgtatGTATTAAtaaagta - 3'	705	
		5	51	7241 - 7247	5' - atgtggGTATTACattatc - 3'	703
		6	56	7617 - 7623	5' - caccctGTATTACtcacag - 3'	322
7	18	7272 - 7278	5' - tatgtgGCATTAAataaaa - 3'	683		

			7605 – 7611	5' - cacctgGTATTAGtcattt - 3'	350
		45	7603 – 7609	5' - cacctgGTATTAGtcattt - 3'	350
	12	MmPV2	7206 – 7212	5' - gttaaaGTATTAAtaaagg - 3'	664
<i>Beta</i>	1	5	7669 – 7675	5' - atgctcGGATTAGggacct - 3'	268
		8	7576 - 7582	5' - atgctcGGATTAGgtcgcc - 3'	267

7.8 Las células 444 no tumorigénicas (VPH18+) forman colonias al ser transducidas con Nanog

Con el objetivo de determinar la capacidad de Nanog de formar colonias y de conferir independencia de anclaje a células 444, derivadas de HeLa, las cuales son no tumorigénicas y positivas a VPH18, se realizaron experimentos de formación de colonias en agar. Se emplearon 444 transducidas con lentivirus Nanog (4N), las cuales fueron comparadas con 444 (4) sin transducir como control negativo y HeLa (H) como control positivo. Se pudo observar que las células 444 no fueron capaces de formar colonias, mientras que las 4N formaron 12 por campo o 12 veces más que las 444. Las células HeLa empleadas como control positivo formaron 17 veces más colonias que las 444 (Figura 7 A). La sobreexpresión de Nanog en 444 fue comprobada a través de Western Blot (Figura 12B). El tamaño y forma de las colonias se muestra en la figura 12C. Las formadas en el caso de las 444 transducidas con Nanog presentaron una forma redondeada, a diferencia de las 444 no transducidas, e incluso de HeLa.

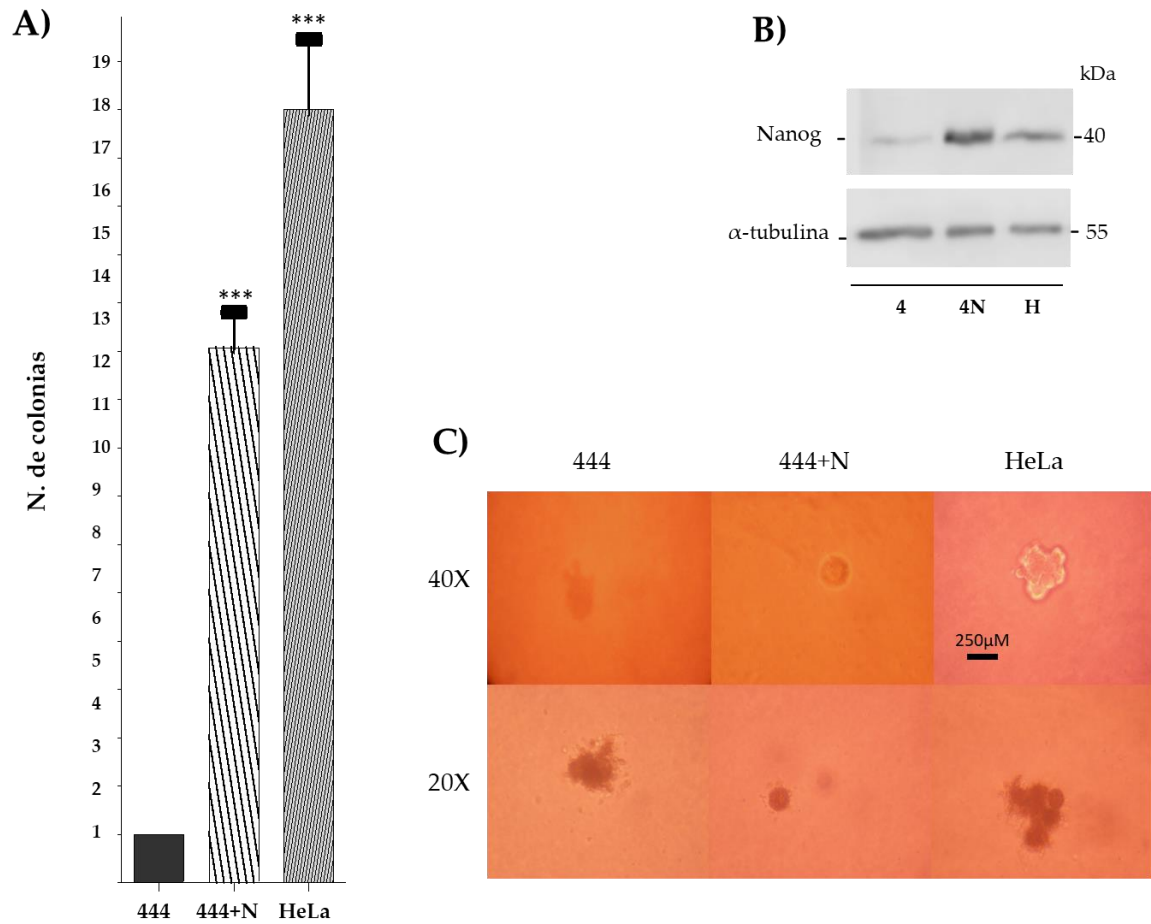


Figura 12. Las células no tumorigénicas 444 (HPV18+) transducidas con Nanog forman colonias. A) Ensayo de formación de colonias en agar de células 444 (4), 444 transducidas con lentivirus que codifica para Nanog (4N) y HeLa (H). En la gráfica se muestra el error estándar de la media de tres experimentos independientes. Se realizó un Anova de una sola vía con un análisis Tukey para determinar si las diferencias observadas resultan significativas.*** $P \leq 0.001$. B) Western Blot mostrando la sobreexpresión de Nanog en células 444. C) Tamaño y forma de las colonias generadas por las células 4, 4N y H.

6. Discusión

La expresión de E6 y E7 es regulada por varios factores de transcripción asociados con cáncer, pluripotencia y regulación de células troncales (Hoppe-Seyler et al 1992; Tyagi et al 2016). De la misma manera los oncogenes aumentan la expresión de varios factores de transcripción de células troncales como Nanog, Sox2, Oct4, Stat3, cMyc, KLF4, Hes1 y Piwil (Brehm et al 1999; McMurray et al 2003; Wang et al 2007; Feng et al 2016; Gunasekharan et al 2016; Tyagi et al 2016; Organista-Nava et al 2016; Morgan et al 2018; Panayiotou et al 2020). También, E6 y E7 son capaces aumentar la proporción de células troncales, incluyendo las migratorias (Hufbauer et al 2018).

El factor Nanog está asociado a tumores malignos del cérvix y a células troncales derivadas de cáncer cervical (Ortiz-Sánchez et al 2016; Hu et al 2016; Ruiz et al 2019). Su función principal es regular la renovación de las células troncales (Yamanaka, 2008). Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha propuesto que además de infectar células basales, el VPH de alto riesgo infecta a las troncales presentes en el cérvix. La invasión de células basales conlleva al desarrollo de una infección productiva durante semanas y la infección de troncales deriva en cáncer en un periodo de años (López et al., 2012). Nanog y VPH de alto riesgo probablemente cooperan para transformar las células troncales cervicales en troncales cancerosas.

En este trabajo se estudió el efecto de Nanog en la regulación de la transcripción de los VPH 16 y 18. Primeramente, se determinó si en la condición enriquecida en células troncales, en la cual la expresión de Nanog se encuentra elevado, la expresión del oncogén E7 está incrementada. Se realizó qRT-PCR de E7 en células SiHa cultivadas en esferas con respecto a monocapa y se observó un aumento considerable (Figura 3). Esta observación se ha realizado para el oncogén E6; Das et al 2016 determinaron que E6 se sobreexpresa en la condición enriquecida en células troncales. También, se ha demostrado que la expresión de

E7 en esferas es importante en la troncalidad (Yang et al 2019). Por otra parte, se determinó que las esferas contienen mayor concentración del marcador de células troncales CD49f, una alfa integrina que además constituye un co-receptor del VPH; además, de otro marcador de células troncales cervicales y Anexina II el cual también constituye un correceptor del virus. Estas evidencias apuntan a que la vía de entrada más probable de VPH son las células cervicales troncales (Ortiz Sanchez et al 2016; Bigoni-Ordóñez et al 2018).

Para saber si Nanog afecta la actividad de la LCR se realizaron ensayos de luciferasa empleando los LCR 16 y 18 en tres líneas celulares distintas (Figura 4, 5 y 6). Se observó que Nanog incrementa significativamente la actividad de ambos LCR y su actividad depende de la concentración transfectada. En las concentraciones más altas se alcanza una saturación en el caso del VPH18, no así en el caso del VPH16. Esta probablemente se produce debido a que la LCR llegó a su máximo de activación o a que los sitios a través de los cuales actúa Nanog en la LCR llegaron a su máxima capacidad de ocupación. Se conoce que un factor de células troncales llamado KLF4 incrementa la transcripción viral de VPH31 y de los promotores temprano y tardío al unirse a la LCR (Gunasekharan et al 2016).

Luego, se demostró que la sobreexpresión de Nanog aumenta significativamente la transcripción de E6 y E7 de VPH 16 y 18 en dos líneas celulares de VPH que contienen copias integradas del genoma viral (Figura 7 y 8). Esto se pudo apreciar a partir de RTqPCR. Sorprendentemente, también se pudo observar un incremento sustancial del oncogén E6 en células transfectadas con Nanog a través de RTPCR de punto final. Se conoce que un factor de células troncales, Hes1, también es capaz de regular positivamente la expresión del oncogén E6 (Tyagi et al 2016).

Al comparar tanto el incremento en la actividad de luciferasa de la LCR y de los oncogenes de VPH16 con respecto al del VPH18 se observó una tendencia a un

mayor aumento en el caso de VPH18 (Fig 4, 6, 7 y 8). Una explicación es que el VPH18 forma tumores más agresivos que el VPH16. VPH18 forma adenocarcinomas y VPH16 carcinomas escamosos de cérvix (Lee et al 2011).

Por otra parte, se ha mostrado que Nanog regula positivamente al factor c-Jun, miembro del complejo AP1 (Lin et al 2015). En este estudio se determinaron sitios de unión de Nanog a la LCR de VPH18 (Figura 9 C). Se observó a través de mutaciones que los sitios N (sitio Nanog) y N/A-E (sitio combinado Nanog-AP1 distal) y A-P (sitio AP1 proximal) son importantes para la acción de Nanog sobre la LCR. AP1 es un factor capaz de aumentar la actividad de la LCR de VPH y la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (Kyo et al 1997; Liu et al 2002). Ambos sitios Nanog (N y N/A-E) se encuentran en la porción 5' de la LCR, no obstante, se conoce que el homodímero Nanog normalmente se une al DNA en un complejo con otros factores transcripcionales en el cual el DNA se dobla, aproximando al coactivador CBP/P300 y a la RNA polimerasa II. De esta forma activa la transcripción de sus genes blanco (Fang et al 2014).

Además, para determinar si Nanog se une a la LCR de VPH18, en este trabajo se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina. Se demostró que Nanog se une in vivo a la LCR y que la sobreexpresión de Nanog incrementa los niveles de c-Jun unido a esta (Figura 10). Nanog normalmente se une a sus genes blancos mediante la formación de un complejo con varios factores. De hecho, se ha reportado que las proteínas Nanog y c-Jun son capaces de unirse a través de sus dominios in vivo (Lin et al 2015). También, la unión de otros factores de transcripción de células troncales como, FOXA1, que activa la actividad viral, Sox2 y MYC a la LCR de HPV16/18 ha sido demostrada (Sichero et al 2012; Martínez-Ramírez et al 2017).

Asimismo, se demostró que Nanog y c-Jun aumentan cooperativamente la actividad transcripcional de la LCR de VPH18, más que cualquiera de los dos factores por separado y que los sitios AP1 presentes en la LCR de VPH son

importantes para la acción de Nanog y como es de esperar también para c-Jun, mientras que la mutación del sitio puramente Nanog no afecta el efecto de c-Jun sobre la LCR (Figura 11). Se ha demostrado que Nanog también es regulado positivamente por c-Jun (Ibrahim et al 2012).

En la Figura 13 se muestra el modelo propuesto en la regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7 por Nanog en el cual, en el cáncer cervical Nanog se encuentra normalmente unido a la LCR, activando la expresión de los oncogenes. Cuando este factor transcripcional es sobreexpresado, dígase en una condición avanzada de cáncer de cérvix, Nanog aumenta su unión a la LCR, así como la de c-Jun, cooperando con AP1 para incrementar la actividad transcripcional de la LCR y la expresión de los oncogenes E6 y E7.

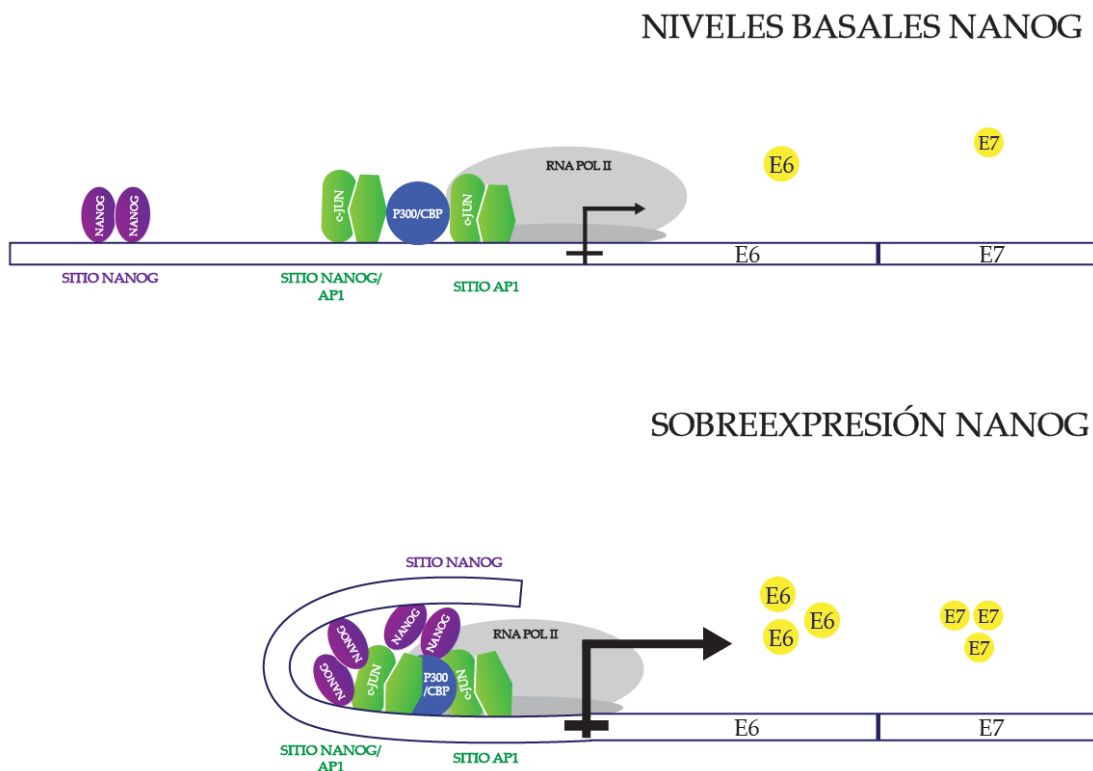


Figura 13. La sobreexpresión de Nanog incrementa la actividad de la LCR de VPH16/18 y la expresión de los oncogenes E6 y E7 a través de los sitios de unión de Nanog y de AP1.

El papel de Nanog en la actividad transcripcional de VPH se soporta por el hecho de que al menos una secuencia de unión similar a las mutadas en este trabajo se encuentra en 11 LCR de VPH asociados con cáncer. El sitio G(G/C)ATTAN encontrado en las LCR de VPH 18, 31, 5 y 8 es similar al de Mitsui et al 2003 y Lin et al 2015; y el sitio G(T/A)ATTAN es parecido al de Das et al 2012 en los papilomavirus 16, 18, 31, 35, 45, 51, 52, 56 y MmPV2 (Tabla II). En contraste, no se encontraron secuencias similares en los VPH 6 y 11, lo que sugiere un posible rol para Nanog en el proceso de transformación. Es importante notar, que al igual que el hallazgo encontrado en el LCR de VPH 18, en el caso de 35 y 45 los sitios Nanog y AP1 también se encuentran solapados (GTATTAGTCA) y en posiciones conservadas, esto determinado a través de alineamiento múltiple en los tres LCR.

En el caso de MmPV1 de alto riesgo, donde no pudo documentarse ningún sitio putativo Nanog, se evidenció la presencia de dos sitios putativos AP1, TGAGTAA y TGACTCA, anteriormente descritos por Lee et al 1987 y Breslin et al 1996, a través de los cuales podría ejercer su acción Nanog; acorde a lo demostrado en este trabajo para los dos sitios AP1 presentes en la LCR de VPH 18 (Figura 9).

En este estudio decidimos tener en cuenta otros VPH de alto riesgo ya que se ha visto que en la población mexicana los más prevalentes involucran además a los VPH 16 y 18 a los 31, 51, 45, 52 y 56 (Campos-Romero et al 2019), razón por la cual se sugiere la vacuna nanovalente, Gardasil9, como la más adecuada para ser aplicada en esta población.

Finalmente, se demostró que Nanog es capaz de inducir la formación de colonias de células 444 no tumorigénicas y VPH18 positivas más de doce veces (Figura 12). En células NIH3T3, nulas a VPH, Nanog también es capaz de aumentar la formación de colonias hasta un valor de unas ocho veces con respecto al control, aproximadamente (Piestun et al 2006). Lo cual nos hace pensar que quizás exista

una cooperación de Nanog y VPH18 en células 444. Las células 444 tienen el genoma de VPH18 intacto y se ha comprobado que la LCR puede regular E6 y E7 de manera eficiente (Soto et al 1999; Grinstein et al 2002).

Estos resultados contribuyen a entender la relación que el factor de células troncales Nanog tiene en la activación transcripcional de E6 y E7 de VPH de alto riesgo durante el proceso de transformación. Es posible que cuando VPH de alto riesgo infecte una célula troncal encuentre un ambiente potencialmente transformante donde factores de células troncales como Nanog, KLF4 y FOXA1 estén altamente expresados. Se deben realizar futuras consideraciones concernientes a la cooperación de factores de células troncales, incluyendo a Nanog y VPH de alto riesgo en la tumorigenicidad.

6. Conclusiones

- En el modelo de esferas se sobreexpresan Nanog y E7.
- El factor Nanog promueve el aumento de la actividad transcripcional de las LCR de VPH 16 y 18.
- La sobreexpresión de Nanog aumenta los niveles de E6 y E7 en células positivas a VPH 16 y 18.
- La activación de la LCR de VPH18 mediada por Nanog requiere la integridad de los sitios de unión de Nanog y de AP1.
- Nanog y c-Jun cooperan para incrementar la actividad de la LCR de VPH18. La acción de c-Jun sobre la LCR de VPH18 mutada en el sitio de Nanog no se afecta.
- Nanog se une a la LCR de VPH18 in vivo y su sobreexpresión aumenta la cantidad del factor c-Jun unido a esta.
- La regulación de la LCR por Nanog puede ser específica de los VPH de alto riesgo oncogénico, dado que las LCR de estos VPH presentan al menos un sitio putativo de unión de Nanog, mientras que no se encontró ninguno en los VPH 6 y 11 de bajo riesgo.

-Las células 444, VPH18 positivas, al ser transducidas con Nanog forman 12 veces más colonias que las 444 no transducidas.

10. Perspectivas

- Analizar si Nanog se une a los sitios Wt y mutados determinados en este estudio mediante ensayos de EMSA.
- Confirmar la importancia de los sitios Nanog mediante la mutación de estos en otros VPH de alto riesgo aparte de VPH18.
- Comprobar el efecto de la sobreexpresión de Nanog sobre la fosforilación de c-Jun.
- Determinar si Nanog y VPH cooperan para conferir independencia de anclaje mediante ensayos de formación de colonias transducidas con lentivirus Nanog y VPH en células HaCaT.
- Investigar si Nanog y VPH transducidos en células HaCaT cooperan en la tumorigenicidad, utilizando modelos murinos.
- Determinar si Nanog aumenta la cantidad de p300/CBP en el LCR de VPH18 mediante ChIP.

11. Agradecimientos

Dr. Alejandro García Carrancá, Dra. Marcela Lizano Soberón, Msc. Miriam Guido Jiménez, Dr. Patricio Gariglio Vidal, Msc. Helga Lopez Carbajal, Dr. Alfredo Amador Molina, Dra. Rocío Méndez Martínez, Dr. Greco Hernández Ramírez, Msc. Érika García Hernández, Msc. Vincent González Osnaya, Dra. Lissania Guerra Calderas, Dr. Enrique Pérez Cárdenas, Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, Lic. Karen de la Cruz López, Dr. Ernesto Soto Reyes, Dr. Pedro Rosendo Chalma, Dr. Heriberto Valencia Gonzales, Dr. Graciela Ruiz Ramírez, Lic. Luz Valerio Jácome Dra. Imelda Martínez Ramírez, Dr. Omar Muñoz Bello, Dra. Leslie Olmedo Nieva Dr. Rodrigo Gonzáles Barrios, Dra. Silvia Maldonado Frías, Dra. Mariel E. Toledo Guzmán, MsC Marco Meraz Muñoz, Lic. Verónica Báez Martínez.

12. Referencias

Basati, G.; Mohammadpour, H.; Emami Razavi, A. Association of High Expression Levels of SOX2, NANOG, and OCT4 in Gastric Cancer Tumor Tissues with Progression and Poor Prognosis. *J. Gastrointest. Cancer* **2020**, *51*, 41–47.

Bernard, H.U. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther.* **2002**, *7*, 219–237.

Bernard, H.U. Regulatory elements in the viral genome. *Virology* **2013**, *445*, 197–204.

Bigoni-Ordóñez, G.D., Ortiz-Sánchez, E., Rosendo-Chalma, P. et al. Molecular iodine inhibits the expression of stemness markers on cancer stem-like cells of established cell lines derived from cervical cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 928.

Blau, L.; Knirsh, R.; Ben-Dror, I.; Oren, S.; Kuphal, S.; Hau, P.; Proescholdt, M.; Bosserhoff, A. K.; Vardimon, L. Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*.

Bosch, F.X.; Burchell, A.N.; Schiffman, M.; Giuliano, A.R.; de Sanjose, S.; Bruni, L.; Tortolero-Luna, G.; Kjaer, S.K.; Munoz, N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* **2008**, *26*, K1–K16.

Boyer, L.A.; Lee, T.I.; Cole, M.F.; Johnstone, S.E.; Levine, S.S.; Zucker, J.P.; Guenther, M.G.; Kumar, R.M.; Murray, H.L.; Jenner, R.G.; Gifford, D. K.; Melton, D. A.; Jaenisch, R.; Young, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005** *122*, 947–956.

Brehm, A; Ohbo, K; Zwerschke, W; Botquin, V; Jansen-Dürr, P; Schöler, H.R. Synergism with germ line transcription factor Oct-4: viral oncoproteins share the ability to mimic a stem cell-specific activity. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 2635-2643.

Breslin, M.B., Vedeckis, W.V. The glucocorticoid receptor and c-jun promoters contain AP-1 sites that bind different AP-1 transcription factors. *Endocr* **1996**, *5*, 15–22.

Brimer, N.; Wade, R.; Vande Pol, S. Interactions between E6, FAK, and GIT1 at paxillin LD4 are necessary for transformation by bovine papillomavirus 1 E6. *J. Virol.* **2014**. *88*, 9927–9933.

Brumbaugh, J.; Russell, J. D.; Yu, P.; Westphall, M. S.; Coon, J. J.; Thomson, J. A. NANOG is multiply phosphorylated and directly modified by ERK2 and CDK1 in vitro. *Stem cell rep.* **2014**, *2*, 18–25.

Burley, M.; Roberts, S.; Parish, J.L. Epigenetic Regulation of Human Papillomavirus Transcription in the Productive Virus Life Cycle. *Semin. Immunopathol.* **2020**, *42*, 159–171.

Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* **2003**, *113*, 643-655.

Chang, B.; Park, M.J.; Choi, S.I.; In, K.H.; Kim, C.H.; Lee, S.H. NANOG as an adverse predictive marker in advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Onco.Targets Ther.* **2017**, *10*, 4625–4633.

Chang, D.F., Tsai, S.C., Wang, X.C., Xia, P., Senadheera, D., Lutzko, C. Molecular characterization of the human NANOG protein. *Stem Cells.* **2009**, *27*, 812-821.

Chopra, S.; Deodhar, K.; Pai, V.; Pant, S.; Rathod, N.; Goda, J.S.; Sudhalkar, N.; Pandey, P.; Waghmare, S.; Engineer, R.; et al. CD44, and Outcomes Following Chemoradiation in Locally Advanced Cervical Cancer: Results From a Prospective Study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2019**, *103*, 161–168.

Cid, A.; Auewarakul, P.; Garcia-Carranca, A.; Ovseiovich, R.; Gaissert, H.; Gissmann, L. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6742–6752.

Cripe, T.P.; Alderborn, A.; Anderson, R.D.; Parkkinen, S.; Bergman, P.; Haugen T.H.; Pettersson U.; Turek L.P. Transcriptional activation of the human papillomavirus-16 P97 promoter by an 88-nucleotide enhancer containing distinct cell-dependent and AP-1-responsive modules. *New Biol.* **1990**, *2*, 450–463.

Das, S.; Jena, S.; Kim, E.M.; Zavazava, N.; Levasseur, D.N. Transcriptional Regulation of Human NANOG by Alternate Promoters in Embryonic Stem Cells. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2012**, *10*, 1–24.

Das, B.; Tyagi, A.; Vishnoi, K.; Mahata, S.; Verma, G.; Srivastava, Y.; Masaldan, S.; Roy, B.; Bharti, A. Cervical Cancer Stem Cells Selectively Overexpress HPV Oncoprotein E6 that Controls Stemness and Self-Renewal through Upregulation of HES1. *Clin. Cancer Res.*, **2016**, *22*.

Dehghan Harati, M.; Rodemann, H.P.; Toulany, M. Nanog Signaling Mediates Radioresistance in ALDH-Positive Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1151.

Duensing, S.; Münger, K. Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Can Induce Abnormal Centrosome Duplication through a Mechanism Independent of Inactivation of Retinoblastoma Protein Family Members. *J. Virol.* **2003**, *77*, 12331-12335.

Eberle, I.; Pless, B.; Braun, M.; Dingermann, T.; Marschalek, R. Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5384–5395.

Emadian Saravi, O.; Naghshvar, F.; Torabizadeh, Z.; Sheidaei, S. Immunohistochemical Expression of Nanog and Its Relation with Clinicopathologic Characteristics in Breast Ductal Carcinoma. *Iran. Biomed. J.* **2019**, *23*, 184–189.

Fang, F.; Xu, Y.; Chew, K-K; Chen, X.; Ng, H-H; Matsudaira, P. Coactivators p300 and CBP maintain the identity of mouse embryonic stem cells by mediating long-range chromatin structure. *Stem Cells Dayt Ohio.* **2014**, *32*, 1805–1816.

Feldman, S.; McKeon, F.D.; Xian, W.; et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells Feng, D.; Yan, K.; Zhou, Y.; Liang, H.; Liang, J.; Zhao, W.; Dong, Z.; Ling, B. Piwil2 is reactivated by HPV oncoproteins and initiates cell reprogramming via epigenetic regulation during cervical cancer tumorigenesis. *Oncotarget.* **2016**, *7*, 64575-64588.

Fischer, M.; Uxa, S.; Stanko, C.; Magin, T. M.; Engeland, K. Human Papilloma Virus E7 Oncoprotein Abrogates the P53-P21 -DREAM Pathway. *Sci Rep.* **2017**, *7*, 2603.

García-Carrancá, A.; Thierry, F.; Yaniv, M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* **1988**, *62*, 4321–4330.

Graham, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond).* **2017**, *131*, 2201–2221.

Grinstein, E.; Wernet, P.; Snijders, P.J.; Rösl, F.; Weinert, I.; Jia, W.; Kraft, R.; Schewe, C.; Schwabe, M.; Hauptmann, S.; Dietel, M.; Meijer, C.J.; Royer, H.D. Nucleolin as activator of human

papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer. *J Exp Med.* 2002, 196, 1067-1078.

Gu, T.-T.; Liu, S.-Y.; Zheng, P.-S. Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *Am. J. Pathol.* **2012**, 181, 652–661.

Gunasekharan, V. K.; Li, Y.; Andrade, J.; Laimins, L. A. Post-Transcriptional Regulation of KLF4 by High-Risk Human Papillomaviruses Is Necessary for the Differentiation-Dependent Viral Life Cycle. *PLoS Pathog.* **2016**, 12, 1-27.

Guo, S.; Zhu, X.; Ge, L.; Qu, S.; Li, L.; Su, F.; Guo, Y. RNAi-mediated knockdown of the c-jun gene sensitizes radioresistant human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2R to radiation. *Oncol. Rep.* **2015**, 33, 1155-1160.

Guo, Y. Abstract 176: The Evolution of NANOGP8 and Its Possible Roles in Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2020**, 80, 176.

Han, G.H.; Cho, H. 203 High expression of Nanog and CRY1 is involved with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2020**, 30, A7.

Harden, M.E.; Munger, K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2017**, 772, 3–12.

Hayashi, Y.; Caboni, L.; Das, D.; Yumoto, F.; Clayton, T.; Deller, M.C.; Nguyen, P.; Farr, C.L.; Chiu, H.J.; Miller, M.D.; Elsliger, M. A.; Deacon, A. M.; Godzik, A.; Lesley, S. A.; Tomoda, K.; Conklin, B. R.; Wilson, I. A.; Yamanaka, S.; Fletterick, R.J. Structure-based discovery of NANOG variant with enhanced properties to promote self-renewal and reprogramming of pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **2015**, 112, 4666-4671.

Hein, S.; Mahner, S.; Kanowski, C.; Löning, T.; Jänicke, F.; Milde-Langosch, K. Expression of Jun and Fos proteins in ovarian tumors of different malignant potential and in ovarian cancer cell lines. *Oncol Rep.* **2009**, 22,177-183.

Herfs, M.; Yamamoto, Y.; Laury, A.; Wang, X.; Nucci, M.R.; McLaughlin-Drubin, M.E.; Münger, K.; Feldman, S.; McKeon, F.D.; Xian, W.; Crum, C.P. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012** 109:10516-10521.

Herfs, M.; Parra-Herran, C.; Howitt, B.E.; Laury, A.R.; Nucci, M.R.; Feldman, S.; Jimenez, C.A.; McKeon, F.D.; Xian,W.; Crum, C.P. Cervical squamocolumnar junction-specific markers define distinct, clinically relevant subsets of low-grade squamous intraepithelial lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **2013**, 37, 1311–1318.

Herfs, M.; Yamamoto, Y.; Laury, A.; Wang, X.; Nucci, M.R.; McLaughlin-Drubin, M.E.; Munger, K.; Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I.; Mueller, F.; Proux, C.; Mornico, D.; Clerc, P.; Dubois, A.; Navarro, P. The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* **2019**, 10, 1109.

Hirai, S.I.; Bourachot, B.; Yaniv, M. Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* **1990**, 5, 39–46.

Hoppe-Seyler F, Butz K. Activation of human papillomavirus type 18 E6-E7 oncogene expression by transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 6701-6706.

Hu, J.; Liu, J.; Chen, A.; Lyu, J.; Ai, G.; Zeng, Q.; Sun, Y.; Chen, C.; Wang, J.; Qiu, J.; Wu, Y.; Cheng, J.; Shi, X.; Song, L. Ino80 promotes cervical cancer tumorigenesis by activating Nanog expression. *Oncotarget*. **2016**, 7, 10.18632.

Huang, E.C.; Tomic, M.M.; Hanamornroongruang, S.; Meserve, E.E.; Herfs, M.; Crum, C.P. p16ink4 and cytokeratin 7 immunostaining in predicting HSIL outcome for low-grade squamous intraepithelial lesions: A case series, literature review and commentary. *Mod. Pathol.* **2016**, 29, 1501–1510.

Hufbauer, M.; Biddle, A.; Borgogna, C.; Gariglio, M.; Doorbar, J.; Storey, A.; Pfister, H.; Mackenzie, I.; Akgül, B. Expression of betapapillomavirus oncogenes increases the number of keratinocytes with stem cell-like properties. *Viol. J.* **2013**, 87, 12158–12165.

Hufbauer, M.; Maltseva, M.; Meinrath, J.; Lechner, A.; Beutner, D.; Huebbers, C.U.; Akgül, B. HPV16 increases the number of migratory cancer stem cells and modulates their miRNA expression profile in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. **2018**, 15, 143,1426-1439.

Ibrahim, E.E.; Babaei-Jadidi, R.; Saadeddin, A.; Spencer-Dene, B.; Hossaini, S.; Abuzinadah, M.; Li, N.; Fadhil, W.; Ilyas, M.; Bonnet, D.; et al. Embryonic NANOG Activity Defines Colorectal Cancer Stem Cells and Modulates through AP1- and TCF-Dependent Mechanisms. *Stem Cells* **2012**, 30, 2076–2087.

Ibrahim, S.; Abudu, A.; Johnson, E.; Aftab, N., Conrad, S., & Fluck, M. The role of AP-1 in self-sufficient proliferation and migration of cancer cells and its potential impact on an autocrine/paracrine loop. *Oncotarget*, **2018**, 9, 34259–34278.

Jiang, Z.; Liu, Y.; Wang, C. Oncogenic NanogP8 expression regulates cell proliferation and migration through the Akt/mTOR signaling pathway in human gastric cancer – SGC-7901cell line. *Onco Targets Ther.* **2016**, 9, 4859-4866.

Kashyap, T.; Nath, N.; Mishra, P.; Jha, A.; Nagini, S.; Mishra, R. Pluripotency Transcription Factor Nanog and Its Association with Overall Oral Squamous Cell Carcinoma Progression, Cisplatin-Resistance, Invasion and Stemness Acquisition. *Head Neck* **2020**, 42, 3282–3294.

Kenda Šuster, N.; Frkovi'c Grazio, S.; Virant-Klun, I.; Verdenik, I.; Smrkolj, Š. Cancer Stem Cell-Related Marker NANOG Expression in Ovarian Serous Tumors: A Clinicopathological Study of 159 Cases. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2017**, 27, 2006–2013.

Kerge, S.; Vuorinen, J.; Hurme, S.; Soukka, T.; Gheit, T.; Tommasino, M.; Syrjänen, S.; Rautava, J. Benign Proliferative Epithelial Lesions of Oral Mucosa Are Infrequently Associated with α -, β -, or γ Human Papillomaviruses. *LIO*, **2018**, 4, 43-48.

Khatlani, T.S.; Wislez, M.; Sun, M.; Srinivas, H.; Iwanaga, K.; Ma, L.; Hanna, A.E.; Liu, D.; Girard, L.; Kim, Y.H.; Pollack, J.R.; Minna, J.D.; Wistuba, I.I.; Kurie, J.M. c-Jun N-terminal kinase is activated in non-small-cell lung cancer and promotes neoplastic transformation in human bronchial epithelial cells. *Oncogene*. **2007**, 26, 2658-2666.

Kim, H.M.; Kang, Y.H.; Byun, J.H.; Jang, S.J.; Rho, G.J.; Lee, J.S.; Park, B.W. Midkine and NANOG Have Similar Immunohistochemical Expression Patterns and Contribute Equally to an Adverse Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2339.

Kim, S.; Cho, H.; Hong, S.O.; Oh, S.J.; Lee, H.J.; Cho, E.; Woo, S.R.; Song, J.S.; Chung, J.Y.; Son, S.W.; et al. LC3B upregulation by NANOG promotes immune resistance and stem-like property through hyperactivation of EGFR signaling in immune-refractory tumor cells. *Autophagy* **2020**, 14.

Kohler, E.E.; Cowan, C.E.; Chatterjee, I.; Malik, A.B.; Wary, K.K. NANOG induction of fetal liver kinase-1 (FLK1) transcription regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Blood* **2011**, *117*, 1761–1769.

Kuciak, M.; Mas, C.; Borges, I.; Sánchez-Gómez, P.; Ruiz, A. Chimeric NANOG repressors inhibit glioblastoma growth in vivo in a context-dependent manner. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3891.

Kyo, S.; Klumpp, D.J.; Inoue, M.; Kanaya, T.; Laimins, L.A. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78*, 401–411.

Lai, Y.; Zhou, B.; Tan, Q.; Xu, J.; Wan, T.; Zhang, L. LINC00116 enhances cervical cancer tumorigenesis through miR-106a/c-Jun pathway. *J Cell Biochem.* **2020** *121*, 2247-2257.

Lee, H.; Lee, H.; Cho, Y.K. Cytokeratin7 and cytokeratin19 expression in high grade cervical intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma and their possible association in cervical carcinogenesis. *Diagn. Pathol.* **2017**, *12*, 18.

Lee, W.; Mitchell, P.; Tjian, R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **1987**, *49*, 741-752.

Lee, Y. Y.; Choi, C. H.; Kim, T.-J.; Lee, J.-W; Kim, B.-G.; Lee, J.-H.; Bae, D.-S. A comparison of pure adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix after radical hysterectomy in stage IB–IIA. *Gynecol. Oncol.*, **2011**, *120*, 439 – 443.

Liang, C.; Zhao, T.; Ge, H.; Xu, Y.; Ren, S.; Yue, C.; Li, G.; Wu, J. The clinicopathological and prognostic value of Nanog in human gastrointestinal luminal cancer: A meta-analysis. *Int. J. Surg.* **2018**, *53*, 193–200.

Lin, G., Yu, B., Liang, Z., Li, L., Qu, S., Chen, K., Zhou, L., Lu, Q., Sun, Y., & Zhu, X. Silencing of *c-jun* decreases cell migration, invasion, and EMT in radioresistant human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2R. *OncoTargets Ther.*, **2018**, *11*, 3805–3815.

Lin, Y.; Xiong, F.; Zhou, Y.; Wu, X.; Liu, F.; Xue, S.; Chen, H. NANOG upregulates c-Jun oncogene expression through binding the c-Jun promoter. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 1407–1416.

Liu, C.; Qiu, H.; Yu, M.; Wang, Z.; Yuan, Y.; Jiang, Z.; Shao, X.; Hua, D.; Liu, M.; Wu, S. c-Jun-mediated β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8 expression: A novel mechanism regulating the invasion and metastasis of colorectal carcinoma cells. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 3722-3728.

Liu, S.; Minaguchi, T.; Lachkar, B.; Zhang, S.; Xu, C.; Tenjimbayashi, Y.; Shikama, A.; Tasaka, N.; Akiyama, A.; Sakurai, M.; et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193061.

Liu, S.; Minaguchi, T.; Lachkar, B.; Zhang, S.; Xu, C.; Tenjimbayashi, Y.; Shikama, A.; Tasaka, N.; Akiyama, A.; Sakurai, M.; et al. Separate analysis of human papillomavirus E6 and E7 messenger RNAs to predict cervical neoplasia progression. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0193061.

Liu, Y.; Li, J.Z.; Yuan, X.H.; Adler-Storthz, K.; Che, Z. An AP-1 Binding Site Mutation in HPV-16 LCR Enhances E6/E7 Promoter Activity in Human Oral Epithelial Cells. *Virus Genes* **2002**, *24*, 29–37.

Ma, J.; Zhang, L.; Han, W.; Shen, T.; Ma, C.; Liu, Y.; Nie, X.; Liu, M.; Ran, Y.; Zhu, D. Activation of JNK/c-Jun is required for the proliferation, survival, and angiogenesis induced by EET in pulmonary artery endothelial cells, *J. Lipid Res.*, **2012**, *53*, 6,1093-1105.

Martínez-Ramírez, I.; Del-Castillo-Falconi, V.; Mitre-Aguilar, I.B.; Amador-Molina, A.; Carrillo-García, A.; Langley, E.; Zentella-Dehesa, A.; Soto-Reyes, E.; García-Carrancá, A.; Herrera, L.A.; et al. SOX2 as a New Regulator of HPV16 Transcription. *Viruses* **2017**, *9*, 175.

McBride, A. A.; Warburton, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006211.

McMurray, H.R.; McCance, D.J. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol.* **2003**, *77*, 9852-98 61.

Md Akhir, M.K.A.; Hussin, H.; Veerakumarasivam, A.; Choy, C.S.; Abdullah, M.A.; Abd Ghani, F. Immunohistochemical expression of NANOG in urothelial carcinoma of the bladder. *Malays. J. Pathol.* **2017**, *39*, 227–234.

Medina-Martínez, O.; Vallejo, V.; Guido, M.C.; García-Carrancá, A. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol. Carcinog.* **1997**, *19*, 83–90.

Mikulenková, E.; Neradil, J.; Vymazal, O.; Skoda, J.; Veselska, R. NANOG/NANOGP8 Localizes at the Centrosome and is Spatiotemporally Associated with Centriole Maturation. *Cells.* **2020**, *9*, 692.

Mills, A.M.; Paquette, C.; Terzic, T.; Castle, P.E.; Stoler, M.H. CK7 Immunohistochemistry as a Predictor of CIN1 Progression: A Retrospective Study of Patients From the Quadrivalent HPV Vaccine Trials. *Am. J. Surg. Pathol.* **2017**, *41*, 143–152.

Miranda, E.I.; Santana, C.; Rojas, E.; Hernández, S.; Ostrosky-Wegman, P.; García-Carrancá, A. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, *349*, 173–182.

Mirkovic, J.; Howitt, B.E.; Roncarati, P.; Demoulin, S.; Suarez-Carmona, M.; Hubert, P.; McKeon, F.D.; Xian, W.; Li, A.; Delvenne, P.; et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamocolumnar junction. *J. Pathol.* **2015**, *236*, 265–271.

Mikulenková, E.; Neradil, J.; Vymazal, O.; Skoda, J.; Veselska, R. NANOG/NANOGP8 Localizes at the Centrosome and is Spatiotemporally Associated with Centriole Maturation. *Cells* **2020**, *9*, 692.

Mistri, T. K.; Kelly, D.; Mak, J.; Colby, D.; Mullin, N.; Chambers, I. Characterisation of interactions between the pluripotency transcription factors Nanog, Oct4 and Sox2, *bioRxiv* **2020**, 169185.

Mitsui, K.; Tokuzawa, Y.; Itoh, H.; Segawa, K.; Murakami, M.; Takahashi, K.; Maruyama, M.; Maeda, M.; Yamanaka, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **2003**, *113*, 631–642.

Morgan, E.L.; Scarth, J.A.; Patterson, M.R.; Christopher, W.; Georgia, W.C.; Barba-Moreno, H.D.; Macdonald, A. E6-mediated activation of JNK drives EGFR signalling to promote proliferation and viral oncoprotein expression in cervical cancer. *Cell Death Differ.* **2020**, *28*, 1669–1687.

Morgan, E.L.; Wasson, C.W.; Hanson, L.; Kealy, D.; Pentland, I.; McGuire, V.; Scarpini C.; Coleman, N.; Arthur, J.S.C.; Parish, J.L.; Roberts, S.; Macdonald, A. STAT3 activation by E6 is essential for the differentiation-dependent HPV18 life cycle. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, 1-33.

Muñoz, J.P.; Carrillo-Beltrán, D.; Aedo-Aguilera, V.; Calaf, G.M.; León, O.; Maldonado, E.; Tapia, J.C.; Boccardo, E.; Ozbun, M.A.; Aguayo, F. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front Microbiol.* **2018**, *9*, 1–12.

Navarro, P. 2i, or Not 2i: The Soliloquy of Nanog-Negative Mouse Embryonic Stem Cells, *Stem Cell Rep.*,11, **2018**, 1-3.

O'Connor, M.; Bernard, H.U. Oct-1 Activates the Epithelial-Specific Enhancer of Human Papillomavirus Type 16 via a Synergistic Interaction with NFI at a Conserved Composite Regulatory Element. *Virology* **1995**, 207, 77–88.

Oft, M.; Böhm, S.; Wilczynski, S.P.; Iftner, T. Expression of the different viral mRNAs of human papilloma virus 6 in a squamous-cell carcinoma of the bladder and the cervix. *Int J Cancer*. **1993**, 53, 924–931.

Organista-Nava, J.; Gómez-Gómez, Y.; Ocádiz-Delgado, R.; García-Villa, E.; Bonilla-Delgado, J.; Lagunas-Martínez, A.; Tapia, J.S.; Lambert, P.F.; García-Carrancá, A.; Gariglio, P. The HPV16 E7 oncoprotein increases the expression of Oct3/4 and stemness-related genes and augments cell self-renewal. *Virology* **2016**, 499, 230–242.

Ortiz-Sánchez, E.; Santiago-López, L.; Cruz-Domínguez, V.B.; Toledo-Guzmán, M.E. Hernández-Cueto, D.; Muñiz-Hernández, S.; Garrido, E.; Cantú De León, D.; García-Carrancá. A. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: Phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *OncoTarget* **2016**, 7, 31943–31954.

Panayiotou, T.; Michael, S; Zaravinos, A.; Demirag, E.; Achilleos, C.; Strati, K. Human Papillomavirus E7 Binds Oct4 and Regulates Its Activity in HPV-Associated Cervical Cancers. *PLoS Pathog.* **2020**, 16, 1-30.

Papatsenko, D.; Waghray, A.; Lemischka, I. R. Feedback control of pluripotency in embryonic stem cells: Signaling, transcription and epigenetics, *Stem Cell Res*, **2018**, 29,180-188.

Paquette, C.; Mills, A.M.; Stoler, M.H. Predictive Value of Cytokeratin 7 Immunohistochemistry in Cervical Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion as a Marker for Risk of Progression to a High-grade Lesion. *Am. J. Surg. Pathol.* **2016**, 40, 236–243.

Peng, X.; Wu, Z.; Yu, L.; Li, J.; Xu, W.; Chan, H.C.; Zhang, Y.; Hu, L. Overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is associated with human cervical cancer malignancy, progression and prognosis. *Gynecol. Oncol.* **2012**, 125, 470–476.

Peng, Y.; Zhang, P.; Huang, X.; Yan, Q.; Wu, M.; Xie, R.; Wu, Y.; Zhang, M.; Nan, Q.; Zhao, J.; Li, A.; Xiong, J.; Ren, Y.; Bai, Y.; Chen, Y.; Liu, S.; Wang, J. Direct regulation of FOXK1 by C-jun promotes proliferation, invasion and metastasis in gastric cancer cells. *Cell Death Dis.* **2016**, 7, e2480.

Pei, D. Deubiquitylating Nanog: novel role of USP21 in embryonic stem cell maintenance. *Sig Transduct. Target Ther.* , **2017**, 2, 17014.

Piestun, D.; Kochupurakkal, B. S.; Jacob-Hirsch, J.; Zeligson, S.; Koudritsky, M.; Domany, E.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Givol, D. Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes, 2006, 343,279-285.

Prati, B.; Marangoni, B.; Boccardo, E. Human Papillomavirus and Genome Instability: From Productive Infection to Cancer. *Clinics* **2018**, 73, e539s.

Priyadarshini, R.; Hussain, M.; Attri, P.; Kaur, E.; Tripathi, V.; Priya, S.; Dhapola, P.; Saha, D.; Madhavan, V.; Chowdhury, S.; Sengupta. BLM Potentiates c-Jun Degradation and Alters Its Function as an Oncogenic Transcription Factor. *Cell Rep.* **2018**, 24, 947–961.

Qin, S.; Li, Y.; Cao, X.; Du, J.; Huang, X. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in ovaria cancer. *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, BSR20160247.

Ramezani, M.; Baharzadeh, F.; Almasi, A.; Sadeghi, M. A Systematic Review and Meta-Analysis: Evaluation of the b-Human Papillomavirus in Immunosuppressed Individuals with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Biomedicine* **2020**, *10*, 1-10.

Rasti, A.; Mehrazma, M.; Madjd, Z.; Abolhasani, M.; Zanjani, L. S.; Asgari, M. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11739.

Ribeiro, A.L.; Caodaglio, A.S.; Sicheo, L. Regulation of HPV transcription. *Clinics.* **2018**, *73*, e486s. Rodrigo, J.P.; Villaronga, M.A.; Menéndez, S.T.; Hermida-Prado, F.; Quer, M.; Vilaseca, I.; Allonca, E.; Mallo, D.P.; Astudillo, A.; García-Pedrero, J.M. A Novel Role for Nanog As An Early Cancer Risk Marker in Patients with Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11110.

Ruiz, G.; Valencia-González, H.A.; Pérez-Montiel, D.; Muñoz, F.; Ocadiz-Delgado, R.; Fernández-Retana, J.; Pérez-Plasencia, C.; Reséndis-Antonio, O.; Gariglio, P.; García-Carrancá, A. Genes Involved in the Transcriptional Regulation of Pluripotency Are Expressed in Malignant Tumors of the Uterine Cervix and Can Induce Tumorigenic Capacity in a Nontumorigenic Cell Line. *Stem Cells Int.* **2019**, 7683817.

Saga, K.; Park, J.; Nimura, K.; Kawamura, N.; Ishibashi, A.; Nonomura, N.; Kaneda, Y. NANOG helps cancer cells escape NK cell attack by downregulating ICAM1 during tumorigenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 416.

Seo, J.; Koçak, D. D.; Bartelt, L.C.; Williams, C. A.; Barrera, A.; Gersbach, C. A.; Reddy, T. E. AP-1 subunits converge promiscuously at enhancers to potentiate transcription. *Genome Res.* **2021**, *31*, 538 – 550.

Sevilla, A.; Papatsenko D.; Mazloom, A. R.; Xu, H.; Vasileva, A.; Unwin, R. D.; LeRoy, G.; Chen, E. Y.; Garrett-Bakelman, F. E.; Lee, D.-F.; Trinite, B.; Webb, R. L.; Wang, Z.; Su, J.; Gingold, J.; Melnick, A.; Garcia B. A.; Whetton, A. D.; MacArthur, B. D.; Ma'ayan, A.; Lemischka, I. R. An Esrrb and Nanog Cell Fate Regulatory Module Controlled by Feed Forward Loop Interactions, *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 502.

Shaulian, E., Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **2001**, *20*, 2390–2400
Sicheo, L.; Sobrinho, J.S.; Villa, L.L. Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16. *J Infect Dis.* **2012**; *206*, 867–874.

Shaulian E., Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*:E131–E136.

Sicheo, L.; Sobrinho, J.S.; Villa, L.L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 867–874.

Song, K.H.; Choi, C.H.; Lee, H.J.; Oh, S.J.; Woo, S.R.; Hong, S.O.; Noh, K.H.; Cho, H.; Chung, E.J.; Kim, J.H.; et al. Upregulation by NANOG Promotes Multidrug Resistance and a Stem-like Phenotype in Immune Edited Tumor Cells. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 5039–5053.

Soni, P.; Qayoom, S.; Husain, N.; Kumar, P.; Chandra, A.; Ojha, B.K.; Gupta, R.K. CD24 and Nanog expression in Stem Cells in Glioblastoma: Correlation with Response to Chemoradiation and Overall Survival. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2017**, *18*, 2215–2219.

Soto, U.; Das, B.C.; Lengert, M.; Finzer, P.; zur Hausen, H.; Rösl, F. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene*. **1999**, 18, 3187-3198.

Thierry, F.; Spyrou, G.; Yaniv, M.; Howley, P. Two AP1 Sites Binding JunB Are Essential for Human Papillomavirus Type 18 Transcription in Keratinocytes. *J. Virol.* **1992**, 66, 3740–3748.

Tyagi, A; Vishnoi, K; Mahata, S; Verma, G; Srivastava, Y; Masaldan, S; Roy B. G.; Bharti A. C.; Bhudev C.D. Cervical Cancer Stem Cells Selectively Overexpress HPV Oncoprotein E6 that Controls Stemness and Self-Renewal through Upregulation of HES1. *Clin Cancer Res.* 2016, 22, 4170–4184. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2574.

Tyagi, A; Vishnoi, K; Mahata, S; Verma, G; Srivastava, Y; Masaldan, S; Roy B. G.; Bharti A. C.; Bhudev C.D. Cervical Cancer Stem Cells Selectively Overexpress HPV Oncoprotein E6 that Controls Stemness and Self-Renewal through Upregulation of HES1. *Clin Cancer Res.* **2016**, 22, 4170–4184.

Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Bos, R., van der Wall, E., van Diest, P.J. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* **2006**, 37, 668-674.

Vogt, M.; Butz, K.; Dymalla, S.; Semzow, J.; Hoppe-Seyler, F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* **2006**, 25, 4009-4015.

Walboomers, J.M.; Jacobs, M.V.; Manos, M.M.; Bosch, F.X.; Kummer, J.A.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.; Peto, J.; Meijer, C.J.; Munoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **1999**, 189, 12–19.

Wang, H.; Liu, B.; Wang, J.; Li, J.; Gong, Y.; Li, S.; Wang, C.; Cui, B.; Xue, X.; Yang, M.; et al. Reduction of NANOG Mediates the Inhibitory Effect of Aspirin on Tumor Growth and Stemness in Colorectal Cancer. *Cell Physiol. Biochem.* **2017**, 441051–441063.

Wang, Y. W.; Chang, H. S.; Lin, C. H.; Yu, W.C. HPV-18 E7 Conjugates to c-Myc and Mediates Its Transcriptional Activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 402–412.

White, E.; Kramer, R.; Hwang, J.; Arun, F.; Nana, N.; Hahn, W.; Roberts, T.; Schaffhausen, B.; Livingston, D.; Howley, P. Papillomavirus E7 Oncoproteins Share Functions with Polyomavirus Small T Antigens. *J. Virol.* **2014**, 89.

Wu, Y.; Guo, Z.; Wu, H.; Wang, X.; Yang, L.; Shi, X.; Du, J.; Tang, B.; Li, W.; Yang, L.; Zhang, Y. SUMOylation represses Nanog expression via modulating transcription factors Oct4 and Sox2. *PLoS one.* **2012**, 7, e39606.

Xia, Y., Yang, W., Bu, W., Ji, H., Zhao, X., Zheng, Y., Lin, X., Li, Y., & Lu, Z. Differential regulation of c-Jun protein plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 19321–19329.

Xu, H.; Jin, X.; Yuan, Y.; Deng, P.; Jiang, L.; Zeng, X.; Li, X.-S.; Wang, Z.-Y.; Chen, Q.-M. Prognostic value from integrative analysis of transcription factors c-Jun and Fra-1 in oral squamous cell carcinoma: a multicenter cohort study. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 7522.

Yang, S.; Chen, T.; Huang, L.; Xu, S.; Cao, Z.; Zhang, S.; Xu, J.; Li, Y.; Yue, Y.; Lu, W.; Cheng, X.; Xie, X. High-Risk Human Papillomavirus E7 Maintains Stemness Via APH1B In Cervical Cancer Stem-Cell Like, *Cancer Manag Res.* **2019**, 11, 9541–9552.

Ye, F.; Zhou, C.; Cheng, Q.; Shen, J.; Chen, H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC Cancer* **2008**, 8,108.

Zhang, Y. J.; Zhang, M. F.; Zhou, H. F.; Yang, J. Activation of c-Jun/JNK signaling predicts poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.*, **2018**,11, 2699–2706.

Zhang, Y.; Pu, X.; Shi, M.; Chen, L.; Song, Y.; Qian, L.; Yuan, G.; Zhang, H.; Yu, M.; Hu, M.; Shen, B.; Guo, N. Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC cancer*, **2007**, 7, 145.

Zhang, Y.; Pu, X.; Shi, M.; Chen, L.; Song, Y.; Qian, Lu.; Yuan, G; Zhang, H.; Yu, M.; Hu, M.; Shen B.; Guo, N. Critical role of c-Jun overexpression in liver metastasis of human breast cancer xenograft model. *BMC Cancer* **2007**, 7, 145, 1-8.

Zhao, L.; Liu, J.; Chen, S.; Fang, C.; Zhang, X.; Luo, Z. Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: A meta-analysis. *OncoTargets Ther.* **2018**, 11, 5515–5526.

zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 342–350.

