



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Modulación del estado redox por las proteínas de expresión temprana de los Virus del Papiloma humano tipo 18 (VPH-18) y 16 (VPH-16)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Alfredo Cruz Gregorio

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Lizano Soberón, Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia María García Cuellar, Instituto Nacional de Cancerología

Dr. José Pedraza Chaverri, Facultad de Química

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ya que dentro de ella me he formado como profesional de la salud con experiencia en investigación biomédica básica y con habilidades de investigador. Hago extenso este agradecimiento por su apoyo financiero.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan), por permitirme el uso de sus instalaciones, el espacio y el material provisto.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM por el apoyo mediante el proyecto de investigación PAPIIT-UNAM IN206214.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo a través del proyecto 261499.

Al CONACyT por el apoyo económico mediante la beca de doctorado 240039 otorgada durante mis estudios.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por los apoyos otorgados para asistir a congresos internacionales.

Agradezco especialmente a mi tutor principal Dra. Marcela Lizano Soberón por su confianza, apoyo, indiscutible guía y asesoría durante mis estudios de doctorado.

Al comité tutorial que me guio durante toda la investigación:
Dra. Claudia María García Cuellar
Dr. José Pedraza Chaverri

Al jurado que analizó, discutió y me sugirió correcciones acertadas para mejorar el documento de tesis:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Dr. Joaquín Manzo Merino
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
Dr. Emilio Rojas del Castillo

Al Dr. Joaquín Manzo Merino por su asesoría y enseñanza durante el desarrollo de la investigación.

A la Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre por el apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre del instituto de biomédicas de la UNAM, por su ayuda en la secuenciación de los plásmidos de expresión usados en esta investigación.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Abreviaturas	3
Cáncer cervicouterino	4
VPH	4
Región Larga de Control	5
Proteínas del VPH	6
E1.....	6
E2.....	6
E4.....	7
E5.....	7
E6.....	8
E7.....	8
L1 y L2	9
Estrés oxidante y daño oxidante asociado a CaCU	10
Antioxidantes y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS)	11
Estrés oxidante y daño oxidante asociados a la integración del genoma del VPH.....	12
Antecedentes	13
Planteamiento del problema	15
Justificación.....	15
Hipótesis	16
Objetivos.....	16
General	16
Particulares.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Construcción de plásmidos:	17
Cultivo celular y transfecciones:	17
Viabilidad celular.....	18
Determinación de la producción de ROS	19
Cuantificación de GSH y GSSG	19

Actividad de enzimas antioxidantes	20
Western blot	21
Daño a DNA	21
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	22
E6 de los VPH 16 y 18 aumentan los niveles de ROS y disminuyen GSH/GSSG.....	22
E6 de los VPH 16 y 18 disminuye los niveles y la actividad de catalasa.....	24
E6 de los VPH 16 y 18 inducen daño al DNA.....	26
Las oncoproteínas E7 de los VPH16 y 18 reducen los niveles de ROS y aumentan la relación GSH/GSSG	26
E7 afecta los niveles y la actividad de enzimas antioxidantes	27
E7 no induce daño a DNA.....	29
La expresión combinada de E6 y E7 no afecta a ROS ni induce daño a DNA aun cuando disminuye la actividad de SOD.....	29
E2 y E1/E2 de VPH 18 aumentan los niveles de ROS	31
E1, E2 y E1/E2 del VPH18 aumentan la actividad de catalasa y disminuyen los niveles y la actividad de SOD.....	32
La expresión combinada de proteínas E1 y E2 induce daño al DNA.....	35
Discusión	36
Conclusiones.....	43
Referencias	45
Anexos	50

Resumen

La infección persistente por Virus del Papiloma humano (VPH) es un requisito necesario, aunque no suficiente para el desarrollo de cáncer cervicouterino; existen factores de riesgo asociados a la infección por el virus que permiten el establecimiento de la enfermedad.

El estrés oxidante (OS, por sus siglas en inglés) se ha propuesto como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de cervicouterino. Son pocos los estudios en que se ha evaluado el estado redox y el OS asociado a la infección por el VPH. El objetivo de este trabajo fue determinar la modulación del estado redox ejercido por las proteínas de expresión temprana E1, E2, E6 y E7 de los VPH16 y 18. Se evaluó la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), la relación de glutatión y disulfuro de glutatión (GSH/GSSG), niveles y actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD) y daño del ácido desoxirribonucleico (DNA), en células epiteliales con expresión ectópica de las proteínas virales. Este trabajo muestra que la oncoproteína E6 disminuye la relación GSH/GSSG y los niveles de catalasa y su actividad enzimática. Esto se asoció con un aumento en la producción de ROS y daño al DNA. En contraste, la oncoproteína E7 aumentó GSH/GSSG, así como los niveles de catalasa y su actividad, que se relacionaron con una disminución de ROS sin afectar la integridad del DNA. La co-expresión de las oncoproteínas E6 y E7 neutralizó los efectos que se observaron independientemente para cada una de las proteínas vírales. Respecto a las proteínas E1 y E2, se demostró que la expresión combinada de las proteínas E1 y E2 aumentó la actividad de catalasa, así como los niveles de ROS con el consiguiente incremento en el marcador de daño al DNA, fosfo-histona 2AX (γ H2AX); también se presentó una disminución de GSH/GSSG y en los niveles de la enzima SOD2. Este estudio demuestra que las proteínas de expresión temprana del VPH modulan diferencialmente el estado redox celular y el daño al DNA.

Abstract

Oxidative stress has been proposed as a risk factor for cervical cancer development. However, few studies have evaluated the redox state associated with human papillomavirus (HPV) infection. The aim of this work was to determine the role of the early expressed viral proteins E1, E2, E6 and E7 from HPV types 16 and 18 in the modulation of the redox state in an integral form. Therefore, generation of reactive oxygen species (ROS), concentration of reduced glutathione (GSH), levels and activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) and deoxyribonucleic acid (DNA) damage, were analyzed in epithelial cells ectopically expressing the viral proteins. Our research shows that E6 oncoproteins decreased GSH and catalase protein levels, as well as its enzymatic activity, which was associated with an increase in ROS production and DNA damage. In contrast, E7 oncoproteins increased GSH, as well as catalase protein levels and its activity, which correlated with a decrease in ROS without affecting DNA integrity. The co-expression of both E6 and E7 oncoproteins, neutralized the effects that were independently observed for each of the viral proteins. Additionally, the combined expression of E1 and E2 proteins increased ROS levels with the subsequent increase in the marker for DNA damage, the phospho-histone 2AX (γ H2AX). A decrease in GSH, as well as SOD2 levels and activity were also detected in the presence of E1 and E2, even though catalase activity increased significantly. This study demonstrates that HPV early expressed proteins differentially modulate cellular redox state and DNA damage.

Abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
VPH	Virus del Papiloma humano, VPH (Human papillomavirus, HPV)
VPH-AR	Virus del Papiloma humano de alto riesgo
LCR	Región larga de control (del inglés Long Control Region)
DBD	Dominio de unión a DNA
TAD	Dominio de transactivación
RONS	Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (del inglés Reactive oxygen and nitrogen species)
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
NOXs	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases
ER	retículo endoplasmático (del inglés endoplasmatic reticulum)
GA	Aparato de Golgi (del inglés Golgi apparatus)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal (del inglés epidermal growth factor receptor)
COX2	ciclooxigenasa 2 (del inglés cicloxiganase)
hTERT	transcriptasa reversa de la telomerasa (del inglés human telomerase reverse transcriptase)
OS	estrés oxidante (del inglés oxidative stress)

Introducción

Cáncer cervicouterino

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer cérvicouterino (CaCU) es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y la segunda debido a este mal en México¹.

Se ha reconocido a la infección persistente por el Virus del Papiloma humano (VPH) como causa necesaria para el desarrollo de CaCU, puesto que se ha demostrado, tanto por estudios epidemiológicos, moleculares y citológicos la presencia del genoma viral en muestras de cáncer cervicouterino en un 99.8% de los casos². La infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual y ha sido asociada a verrugas genitales y a otros tipos de cáncer como: cáncer de cavidad oral y de orofaringe³, cáncer de pene⁴, vagina⁵, vulva⁶ y ano⁷.

Los VPHs están clasificados como de alto y bajo riesgo de acuerdo a su potencial oncogénico. Los VPHs de alto riesgo (VPH-AR) son los que se asocian al desarrollo de cáncer, representados principalmente con los tipos VPH 16 y 18 en un 70%⁸.

VPH

El VPH es un virus desnudo con un genoma circular de DNA de doble hebra, la cápside está compuesta de 72 capsómeros y alberga al genoma viral. Este genoma se divide en tres regiones: la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación viral, la regulación de la transcripción y la inmortalización y transformación celular; la región que codifica a las proteínas tardías (L1 y L2) que inducen la liberación del virion y la estructura de la cápside y la región larga de control LCR (por sus siglas en inglés, *Long Control Region*), que contiene al origen de replicación y al promotor temprano que permiten la replicación y la expresión del genoma viral, respectivamente⁹ (Figura 1).

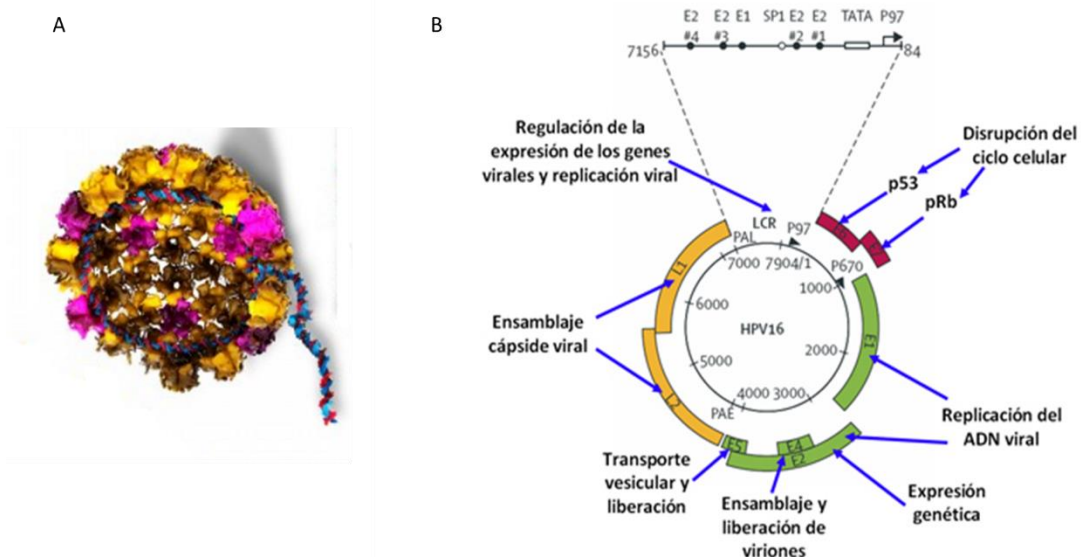


Figura 1. A) Representación esquemática del VPH, los capsómeros formados por 5 proteínas L1 están marcados en amarillo y las proteínas L2, en medio del capsómero, en rosa, una hebra de cadena doble de DNA que sale de la partícula viral se observa en azul y rojo. B) El genoma viral está formado por una región larga de control o LCR, una región de expresión temprana que codifica para las proteínas E6, E7, E1, E2, y E5 representada en verde, donde se encuentran los oncogenes E6 y E7 marcados en rojo y una región de expresión tardía que codifica para las proteínas E4, L1 y L2 representadas en amarillo.

Región Larga de Control

El ciclo viral del VPH inicia una vez que el VPH infecta y se introduce en su célula blanco. Después de este proceso, el DNA viral es transportado al núcleo para iniciar la transcripción y replicación del virus¹⁰. La LCR contiene varios sitios de regulación tanto para la replicación como la transcripción viral¹¹. Estos procesos celulares son inducidos por la interacción directa entre diferentes componentes celulares y virales con la LCR. Por ejemplo, la LCR tiene secuencias específicas para la asociación de E1 y E2 promoviendo la replicación del virus, así como su transcripción; además, contiene secuencias de unión a componentes de la maquinaria de transcripción como SP1 y TBP, así como de receptores de glucocorticoides que inducen la transcripción del genoma viral¹¹.

Proteínas del VPH

E1

La proteína E1 es una helicasa que participa en la replicación del DNA viral, está compuesta por alrededor de 681 aminoácidos (aa) y se divide en tres regiones: la región carboxilo terminal relacionada con la actividad de helicasa, la región donde se encuentra el dominio de unión a DNA o DBD (por sus siglas en inglés *DNA Binding Domain*) y una región amino terminal que es blanco de fosforilaciones, sumoilaciones o acetilaciones que influyen sobre la actividad de E1 y por ende en la transcripción y replicación viral, además de contener señales que permiten la entrada y salida del núcleo celular¹². E1 se asocia al origen de replicación sobre la LCR, induciendo la formación del complejo de iniciación y el desenrollamiento del DNA para promover la replicación del genoma viral. Se sabe también que E1 interacciona directamente con la DNA polimerasa, la cual a su vez se asocia con el complejo de replicación RPA (por sus siglas en inglés, *Replication protein A*) y así dar paso al proceso de replicación¹².

E2

Es una proteína reguladora de la replicación y transcripción viral, esta proteína de 300-500 aa consta en dos dominios conservados: la región amino terminal donde se encuentra el dominio de transactivación TAD (por sus siglas en inglés, *transactivation domain*), que es responsable de la regulación transcripcional y replicación virales, interaccionando con diferentes proteínas celulares. El otro dominio de E2 es conocido como DBD, este dominio reconoce y se une a secuencias específicas ACCGN4CGGT que están en la LCR del genoma viral¹³. Entre los dominios TAD y DBD se encuentra una región bisagra. Esta región no participa en las funciones básicas de replicación y transcripción; sin embargo, da estabilidad a E2, participa en la localización citoplasma-núcleo y funciona como espaciador entre los dos dominios evitando el impedimento estérico¹⁴. Cuando E2 se asocia al DNA viral recluta diferentes proteínas celulares involucradas en la

transcripción y replicación viral. E2 participa tanto en la segregación del genoma viral, anclándolo a los cromosomas celulares durante la mitosis celular, como en el empaquetamiento para la formación de los viriones¹⁴. Entre otros blancos celulares de E2 se encuentra p53, dicha interacción induce arresto celular y apoptosis¹⁵. Un factor importante en el desarrollo de cáncer recae en la función anti-proliferativa ejercida por E2, puesto que puede reprimir el crecimiento celular e inducir apoptosis en células positivas a VPH. En parte a la represión de la transcripción de E6 y E7, con el consecuente aumento de p53 y pRb¹⁶.

E4

Es una proteína de aproximadamente 17 kDa. Aunque el marco abierto de lectura, ORF (por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) de E4 está contenido dentro del ORF para E2, ésta se expresa de manera tardía, justo antes de L1 y L2. La expresión tardía de E4 es debida a que se encuentra regulada por un promotor específico de diferenciación (p670 para VPH16) y por lo tanto sólo se acumula en las células diferenciadas de las capas superficiales del epitelio¹⁷. La función principal de E4 se ha asociado al colapso de los filamentos de queratina localizados en el citoplasma celular, colapso necesario para la liberación de los viriones. Otra de las funciones que se ha asociado a E4 es inhibir la actividad de Cdk1 induciendo arresto del ciclo celular en la fase G2¹⁸.

E5

E5 es la proteína más pequeña codificada por el VPH, con sólo 83 aa y un peso molecular de 9 KDa. Está localizada principalmente en el retículo endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi (GA)¹⁹. Se ha identificado a E5 como una oncoproteína puesto que induce proliferación celular asociada a la sobreexposición del receptor EGFR (por sus siglas en inglés *epidermal growth factor receptor*)²⁰. Así mismo se ha demostrado que E5 se une a la subunidad 16K de la V-ATPasa vacuolar de los endosomas disminuyendo su actividad e inhibiendo su acidificación interviniendo en el tráfico vesicular²¹. Por otra parte, se ha demostrado que en los queratinocitos primarios que albergan E5, los niveles de ciclooxigenasa 2 (COX 2) disminuyen,

impactando en la reducción de las respuestas de estrés del ER²². Así mismo, la presencia de E5 estimula la degradación de Bax mediada por el proteasoma, una proteína pro-apoptótica que regula la apoptosis inducida por H₂O₂²³.

E6

La oncoproteína E6 es una proteína de 150 aa con un peso molecular de 16-18 KDa. E6 de los VPH de alto riesgo tienen la capacidad de inducir inmortalización, inhibir la apoptosis celular o evitar las interacciones célula-célula²⁴. Por ejemplo, se ha encontrado que E6 puede asociarse con hTERT (por sus siglas en inglés, *human telomerase reverse transcriptase*), polimerasa que alarga los extremos teloméricos de los cromosomas celulares, induciendo su activación y permitiendo la inmortalización celular²⁵. Otra característica importante de las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo es su asociación con la ubiquitina ligasa E6AP (del inglés *E6 associated protein*), por medio de la cual puede asociarse con p53 promoviendo su degradación vía proteosoma y así bloquear la apoptosis celular²⁶. E6 de los VPH-AR también puede marcar a proteínas con dominios PDZ como *human disc large* (hDLG), *multi-PDZ domain protein 1* (MUPP) y hSCRIBb para su degradación utilizando el mismo mecanismo que con p53. Estas proteínas están relacionadas con la transformación celular debido a la capacidad de regular las interacciones célula-célula, y la polaridad celular²⁴. Por otra parte, los transcritos E6 expresados a partir de los VPH de alto riesgo sufren de procesamiento alternativo (*splicing*) y las isoformas resultantes de este procesamiento son denominadas E6*, que son formas truncadas de E6 y que carecen del extremo carboxilo terminal²⁷. Se ha mostrado que estas isoformas de E6 regulan o antagonizan los efectos de E6 completa, un ejemplo de lo anterior es la inhibición en la degradación de p53 por E6 completa cuando E6* esta presente²⁸.

E7

La oncoproteína E7 es una proteína compuesta de 100 aa, con un peso molecular de aproximadamente 10 KDa. Esta proteína tiene una enorme capacidad de transformación debido a su capacidad para inducir la degradación de la proteína

supresora de tumores pRb, vía proteosoma²⁹. pRb es una proteína clave en el control de la proliferación celular. La degradación de pRb induce la liberación de E2F, induciendo a las células a entrar a la fase S (fase de síntesis) del ciclo celular³⁰. E7 también está implicada en otros procesos celulares como: transcripción genica, reprogramación epigenética, degradación proteica, integridad genómica o muerte y metabolismo celular³¹.

L1 y L2

Las proteínas L1 y L2 son proteínas expresadas en la fase tardía del ciclo viral. Estas proteínas se ensamblan para construir la cápside del VPH. L1 es una proteína de 57 KDa que compone el 80% de la cápside la cual contiene 360 copias de L1³². Mientras que L2 es una proteína de 53 KDa y constituye el 20% restante de la cápside con 72³³. Se sabe que cinco unidades L1 se asocian entre sí formando un pentámero L1, en el hueco de cada pentámero L1 se asocia una proteína L2, a este complejo se le llama capsómero, por lo que la cápside del VPH está compuesta por 72 capsómeros en una red icosaédrica³⁴. Una vez ensamblado el virion, estos son liberados y se puede iniciar nuevamente el ciclo viral a través de L1, el cual se ancla al receptor heparán sulfato (HS) contenido tanto en la matriz extracelular como en las células blanco del VPH. Al asociarse L1 con HS se produce un cambio conformacional de las proteínas de la cápside induciendo la exposición del amino terminal de L2 el cual es cortado por una proteasa, furina. Este evento promueve la asociación de L2 con receptores de membrana como α/β integrina para inducir mayor anclaje de la partícula viral a la célula hospedera y el inicio de endocitosis de la partícula viral³⁵.

En raras ocasiones el ciclo viral del VPH puede interrumpirse debido a la integración del genoma del virus al genoma celular, evento negativo para la producción de viriones y por ende no se encuentra dentro de la naturaleza del virus. Sin embargo, se ha considerado que la integración es un evento necesario para la progresión hacia cáncer cervicouterino, puesto que se ha reportado que el genoma de VPH está presente en forma episomal en lesiones de bajo grado, mientras que la

integración del genoma viral se observa en etapas avanzadas del carcinoma invasivo³⁶. La integración genómica resulta en un aumento en la expresión y estabilidad de los transcritos que codifican a las oncoproteínas virales E6 y E7, principalmente porque hay rompimiento o delección del marco abierto de lectura u ORF de E2. Debido a que E2 es una proteína que regula negativamente tanto a E6 como E7, la pérdida del ORF de E2 resulta en un aumento de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7³⁷. Es importante señalar que hay un porcentaje bajo de CaCU donde se mantiene el genoma del VPH en forma episomal³⁸. Aun así, el desarrollo al cáncer asociado a estos casos también se ha asociado al aumento de las oncoproteínas E6 y E7 a consecuencia de un aumento de la forma episomal del virus. Este aumento de las copias del virus logra, aunque de manera menos eficiente, el mismo efecto que la integración del VPH³⁹.

Estrés oxidante y daño oxidante asociado a CaCU

El desarrollo del cáncer es un evento poco frecuente en la historia natural del VPH, ya que debe ocurrir una infección persistente, seguido de eventos que promuevan la integración del genoma del VPH al genoma celular. Agentes que inducen daño al DNA como mecanismos ineficientes de reparación del DNA pueden desempeñar un papel importante en la integración del VPH. Por ejemplo, se ha observado que en células W12 (células que mantienen establemente episomas del VPH16), donde se depleta Ku70, se producen daño al DNA e integración del VPH⁴⁰. Ku70 es un elemento crucial de los mecanismos de reparación no homóloga del rompimiento de doble cadena del DNA. Por su parte Someya y cols.⁴¹ demostraron que la actividad de la proteína cinasa dependiente de DNA, era significativamente menor en pacientes con CaCU que en voluntarios normales. Recientemente se ha descrito que el estrés oxidante (OS por sus siglas en inglés) inducido por butionina sulfoximina (BSO) promueve la integración del VPH16 al genoma celular en una línea celular que contiene el genoma viral de forma episomal⁴². Así la integración del DNA viral al DNA del hospedero puede verse potenciada por el daño tanto al DNA episomal como al DNA de la célula, ya que esto crearía un sitio para la

integración. Aunque poco explorado el OS ha sido propuesto como un evento candidato para la inducción de la integración y el desarrollo de cáncer⁴³.

Antioxidantes y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS)

El equilibrio fisiológico entre las moléculas oxidantes y antioxidantes se ha definido como estado redox. La producción fisiológica de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno RONS (RONS por sus siglas en inglés) está relacionada con señalización, proliferación y diferenciación celular⁴⁴. Se sabe que la concentración neta de RONS (O_2^- , H_2O_2 , $^{\cdot}OH$, $ONOO^-$ entre otras) en una célula está determinada por el balance en su producción y la capacidad de los agentes antioxidantes de removerlas⁴⁵. Así el estrés oxidante aparece cuando la generación de RONS excede la capacidad neutralizante de la célula. Esta capacidad antioxidante está regida por enzimas como: las superóxido dismutasas (SODs), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST)⁴⁵ entre muchas otras más. Debido a este desbalance puede existir daño a proteínas, lípidos o DNA, mediado por el OS⁴⁴.

Estos mecanismos antioxidantes propios de la célula, responden a diferentes factores de transcripción (los cuales a su vez son activados por RONS) tales como: el factor nuclear κB ($NF\kappa B$), la proteína activadora 1 (AP1) y el factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocido como Nrf2 (del inglés: *Nuclear Factor Erythroid 2-related factor*)⁴⁴. Nrf2 responde directamente al aumento de RONS, activándose y migrando hacia el núcleo induciendo un aumento en la expresión de genes antioxidantes. La protección contra el estrés oxidante, se da por la sobreexpresión de los genes de fase II como glutamato cistein ligasa (GCLM), glutatión S-transferasa (GST), hemooxigenasa (HO-1), catalasa y SOD, entre otros⁴⁶. Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de modo que su actividad debe mantenerse estrictamente regulada. En otras palabras, la célula debe conservar un determinado estado redox para permanecer en homeostasis, un cambio en dicho estado puede modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción. Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidante⁴⁷. Aun cuando es posible detectar niveles constitutivos del ARNm para Nrf2, ha resultado

difícil detectar a la proteína madura, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 es muy corta y se ha estimado en un tiempo menor de 30 minutos en macrófagos y en varias líneas celulares⁴⁸. El uso de inhibidores del proteosoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma⁴⁸. Todo parece indicar que la célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de *novo*. Nrf2 tiene dominios conservados para su regulación negativa a los cuales se une Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), una proteína quien suprime hasta un 80% la translocación nuclear de Nrf2 y por lo tanto su actividad transcripcional⁴⁹. Hay que tener en cuenta que Keap1 cuenta con cisteínas cuyos tioles se oxidan o modifican permitiendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1. Además de la oxidación directa o la modificación covalente de los grupos tioles en Keap1, la actividad de la proteína Nrf2 puede ser modulada por modificaciones post-traduccionales, como pueden ser fosforilaciones en serinas y treoninas por diversas cinasas como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC), la cinasa del N-terminal de c-Jun (JNK) y la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)⁵⁰. La fosforilación por estas enzimas al parecer facilita la disociación de Nrf2 de Keap1 y su posterior translocación. También se ha encontrado que la proteína cinasa p38 de la familia de las proteínas activadas por mitógenos (MAP) puede tanto activar como inhibir la translocación nuclear de Nrf2 dependiendo el tipo celular del que se trate⁵¹. Así la activación de Nrf2 provoca la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes y por ende la disminución y balance de las RONS.

Estrés oxidante y daño oxidante asociados a la integración del genoma del VPH

A través de diferentes procesos las RONS pueden superar los sistemas antioxidantes induciendo OS. Se ha postulado que el estrés oxidante podría facilitar la integración viral del VPH al genoma celular debido al aumento del rompimiento genómico tanto del hospedero como del virus, principalmente porque se ha

demostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están asociadas al rompimiento del DNA, así como a la formación de aductos y uniones cruzadas entre DNA y proteínas⁵². Por su parte las especies reactivas de nitrógeno (RNS) producen daños oxidativos al DNA y transversiones G-T en genes supresores de tumor como ras y p53⁵³. Aunado a lo anterior, el daño a DNA podría ser acumulativo al no ser reparado por la maquinaria de reparación del DNA. Así, el daño al DNA mediado por el OS provee un mecanismo por el cual podría ocurrir la integración del DNA de VPH al genoma celular. La integración del genoma viral induce la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 promoviendo el proceso de transformación hacia cáncer³⁷.

Antecedentes

De Marco y cols⁵⁴ encontraron que en tejidos displásicos de cérvix, positivos a VPH-16, existe un aumento en la oxidación de proteínas involucradas en la morfogénesis y diferenciación celular; esta oxidación provee las condiciones necesarias para la progresión neoplásica. En contraste, los autores observaron que en cáncer de cérvix se tiene un control sobre el daño oxidante y hay un decremento para este proceso oxidante. En relación a esto último Shim y cols.⁵⁵ han demostrado que en células HaCaT transfectadas con E7, existe una protección contra el estrés oxidante inducido con H₂O₂, explicado por un incremento en la expresión de varias isoformas de catalasa. En este mismo trabajo, se observó que existía una disminución en los niveles de agentes que inducen a apoptosis como IL-18 (citocina que es regulada por estrés oxidativo) y NFκB que es un factor transcripcional con efectos antiapoptótico. Por otra parte, se ha propuesto que un ambiente oxidante facilita la formación de unión disulfuro entre monómeros de L1 que estabilizan los capsómeros favoreciendo el ensamblaje de viriones, por lo que el ensamble y maduración de la partícula de VPH es dependiente del estado redox⁵⁶. Recientemente se ha encontrado que la expresión de enzimas antioxidantes como SOD2 y Gpx 1/2 se encuentra disminuidas al expresar E6* del VPH16 en cultivos primarios de queratinocitos, induciendo aumento de ROS y daño al DNA⁵⁷.

Otra de las proteínas de expresión temprana del VPH asociada a estrés oxidante ha sido E2. Se ha observado que E2 se asocia a las crestas mitocondriales

promoviendo daño a la estructura mitocondrial y por ende el incremento de los niveles de ROS. Es importante decir que esta inducción positiva de estrés oxidante sólo se mostró con E2 de los VPH16 y VPH18 y no así con E2 del VPH 11, que es un VPH de bajo riesgo⁵⁸.

Planteamiento del problema

El CaCU es un problema de salud pública con altas tasas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, afectando principalmente a países en desarrollo como México. Diversos estudios han demostrado los mecanismos carcinogénicos inducidos por VPH; sin embargo, aún no han sido descritos en su totalidad. El estudio de nuevos enfoques moleculares que permitan determinar los mecanismos involucrados en la participación en la carcinogénesis promovida por el VPH, representa un reto, pero a la vez una oportunidad de estudio con un gran potencial benéfico. Por lo cual, es necesario ahondar en el entendimiento de los procesos moleculares y bioquímicos de la carcinogénesis originada por el VPH.

Un mecanismo clave en el desarrollo del proceso de carcinogénesis es el OS, aspecto poco explorado durante la infección por VPH y el desarrollo de CaCU el cual depende íntimamente de la acción de sus oncoproteínas. Debido a que el OS es un desbalance del estado redox de la célula surge una pregunta importante en el desarrollo de la carcinogénesis inducida por VPH: ¿Existe algún efecto sobre el estado redox celular inducido por las proteínas de expresión temprana del VPH?

El desbalance del estado redox promovido por el VPH, que en consecuencia provoque OS podría ser un factor importante en el daño a DNA, requisito indispensable en el proceso de transformación maligna promovida por el VPH, de esta manera resulta importante determinar de que manera el OS derivado de la expresión de las proteínas tempranas induce daño a DNA.

Justificación

Conocer de manera integral si las proteínas E1, E2, E6 y E7 del VPH de AR cambian el estado redox celular e inducen daño al DNA, ayudará a comprender su asociación con la infección y desarrollo a cáncer.

Hipótesis

Las proteínas de expresión temprana E1, E2, E6 y E7 de los VPH de alto riesgo disminuyen la expresión y actividad de las enzimas SOD y catalasa, promoviendo aumento en los niveles de ROS y el daño al DNA.

Objetivos

General

Determinar los efectos de las proteínas E1, E2, E6 y E7 de los VPH de alto riesgo sobre el sistema oxidante (ROS)/antioxidante (catalasa, SOD y GSH) y daño al DNA.

Particulares

1. Evaluar los niveles de ROS y el índice GSH/GSSG en células C33A que expresen E1, E2, E6 y E7 del VPH 16 y 18.
2. Determinar los niveles de expresión proteica y actividad catalítica de las enzimas: catalasa y SOD en células C33A que expresen las proteínas E1, E2, E6 y E7 del VPH 16 y 18.
3. Evaluar el daño a DNA en presencia de las proteínas E1, E2, E6 y E7 en el modelo celular C33A.

Materiales y Métodos

Construcción de plásmidos:

Las secuencias codificantes de E1, E2, E6 y E7 fueron amplificadas a partir de muestras de cáncer cervicouterino positivas a VPH18 y VPH16. En seguida mediante técnicas de PCR convencionales los marcos abiertos de lectura de E6 del VPH16 y 18 fueron clonadas en el vector p3XFLAG-CMV10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). El vector p3XFLAG-CMV10 alberga un cassette de resistencia a ampicilina y un promotor de CMV. Las secuencias E7 y E1 de VPH18 se clonaron en el vector pcDNA3 (Invitrogen) añadiendo en el extremo N una etiqueta de 5X-histidina y una etiqueta de HA, respectivamente. El plásmido que expresa VPH18 E2 se generó clonando la región codificante de E2 en el vector pcDNA3. De igual manera, el vector pcDNA3 alberga un cassette de resistencia a ampicilina y un promotor de CMV. La identidad de cada plásmido se verificó mediante secuenciación. El plásmido que expresa VPH16 E7 con etiqueta HA fue un amable obsequio del Dr. Lawrence Banks (ICGEB, Italia).

Cultivo celular y transfecciones:

La línea celular C33A negativas a VPH fue mantenida en medio DMEM F12 suplementado con suero bovino fetal al 10%, en atmosfera húmeda al 5% de CO₂. Las células fueron transfectadas de forma transitoria usando el reactivo PolyFect® (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva para determinar el tiempo óptimo de expresión de los genes recombinantes. Para la transfección, se sembraron 280 000 células en una placa de 60 mm. Para la transfección de un solo plásmido se usaron 2.5 µg del plásmido, mientras que para las transfecciones combinadas se emplearon 1.25 µg de cada plásmido. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron cosechadas y procesadas para realizar los ensayos de inmunoblot, medición de ROS, cuantificación de GSH o análisis de actividad enzimática respectivos. La eficacia de transfección se evaluó mediante ensayos de inmunofluorescencia

contando 100 células, seleccionadas al azar, en tres experimentos independientes para cada condición. A continuación se menciona brevemente el procedimiento, las células se sembraron en portaobjetos en una placa de 60mm, luego se transfectaron y después de 48 h, se fijaron y tiñeron con anticuerpos primarios diluidos en PBS: Anti-FLAG (1:50) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); anti-HA (1:50) (Roche, Basilea, Suiza); anti-VP18 E7 (1:50) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EE. UU.); anti-VP18 E2 (1:50) (Santa Cruz Biotechnologies). Después de varios lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a los fluoróforos Alexa 488 en PBS (1: 700) o Alexa 555(1: 700) (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Después de varios lavados, las células se contratiñeron usando DAPI y se montaron para el análisis de fluorescencia usando el microscopio EVOS FL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El porcentaje de células positivas fue graficado y se realizó un análisis estadístico.

Viabilidad celular

La viabilidad de las células C33A transfectadas con los diferentes plásmidos fue evaluado mediante la determinación del metabolismo lisosómico usando la prueba doble de fluorocromo: diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.)/Bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). Después de 48 horas de la transfección, las células C33A fueron cosechadas e incubadas con una solución de fluorocromos que contenía 0,015 µg/ml de CFDA y 0,02 µg/ml de bromuro de etidio. Posteriormente, las células fueron analizadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX-60) que posee un filtro combinado y detecta la fluorescencia de ambos compuestos. Las células verdes se identificaron como metabólicamente activas o vivas, mientras que las células rojas se identificaron como células muertas. Cien células seleccionadas al azar por condición, en tres experimentos independientes, fueron evaluadas y los resultados se expresaron en porcentajes.

Determinación de la producción de ROS

La producción de ROS se midió usando la sonda fluorescente dihidroetidium, DHE, de acuerdo al protocolo descrito por Pedraza-Chaverrí y cols.⁵⁹. El DHE se oxida a 2-hidroxietidinio (2-OH-E⁺) y etidio (E⁺) en el citosol por oxidantes intracelulares, como el anión superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxilo ([•]OH), peroxinitrito (ONOO⁻) y peróxidos^{60, 61}. Debido a su capacidad de unión al DNA, ambos compuestos son retenidos en el núcleo, y la identificación de RONS se identifica como una señal fluorescente roja en el microscopio la cual se cuantifica mediante fluorimetría. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se preparó una solución de 20 µM DHE en DMEM F12 sin rojo fenol la cual fue añadida a las células incubando durante 30 minutos a 37°C. Los datos cuantitativos de ROS y las imágenes celulares se obtuvieron a través del lector multimodo Cytation™ 5 Cell Imaging de Biotek (Winoosky, VT, EE. UU.), que combina microscopía digital con una microplaca convencional multimodo, proporcionando identificación y alta sensibilidad en la cuantificación de ROS. Por lo tanto, la producción de ROS celular se visualizó y midió por fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 510-560 nm y una de emisión de 590 nm. Las ROS se visualizaron y cuantificaron en dieciséis campos diferentes por pozo y por condición, en tres experimentos independientes, utilizando el software Gen5™ ver. 3.0 (<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/> / Biotek) para adquisición y análisis de datos.

Cuantificación de GSH y GSSG

El glutatión total (glutatión reducido [GSH] + glutatión oxidado [GSSG]) se evaluó mediante el método de reciclado enzimático descrito por Rahman y cols.⁶² en el que el GSH se oxida con ácido 5,5'-Ditiobis-2- Nitrobenzoico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB, detectable a $\lambda=412$ nm) y aductos de TNB-glutatión (GS-TNB). Tanto GS-TNB como GSSG son reducidos por glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH, a GSH, que a su vez es oxidado por DTNB a TNB. TNB a su vez se mide a $\lambda=412$ nm. De esta manera, la cantidad de glutatión calculada mediante este método representa la suma de GSH y GSSG; es decir glutatión total.

Para obtener el contenido de GSH este se calculó restando GSSG del glutatión total (GSH + GSSG).

GSSG se determinó mediante el método de reciclado enzimático mencionado anteriormente, con un tratamiento previo con 2-vinilpiridina (2-VP). La 2-VP, puede asociarse covalentemente con GSH y se usa para eliminar todo el glutatión reducido, dejando la forma oxidada de glutatión como el único sustrato medible del ensayo.

Brevemente, el extracto celular de cada transfección se diluyó con 120 μ l de tampón KPE (fosfato de potasio 0,1 M, EDTA disódico 5 μ M, pH 7,5). Posteriormente, la muestra se dividió en dos muestras separadas de 20 μ l cada una para medir GSH total o GSSG (las muestras para GSSG se trataron previamente con 2-VP), se mezclaron con DTNB (2.5 μ M) y GR (250 U / ml). Finalmente, se añadió β -NADPH y se midió la absorbancia a $\lambda=412$ nm a intervalos de 60 segundos, durante 2 minutos. Las tasas de cambio en la absorbancia se compararon con los estándares GSH o GSSG. Se realizó la relación GSH/GSSG como marcado de estrés oxidante.

Actividad de enzimas antioxidantes

El H_2O_2 puede ser metabolizado por las actividades catalasa. La catalasa es una de las enzimas antioxidantes más eficientes, tanto que no puede ser saturada por el H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 , para proteger a las células del H_2O_2 generado. El fundamento de esta medición se basa en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 , debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra. La determinación de la actividad de CAT se llevó a cabo usando la metodología previamente informada⁶³. Los lisados de las muestras de cultivo celular se leyeron a 250 nm. Las unidades de actividad enzimática de la catalasa se expresan como k/mg de proteína, tal como describió previamente por Aebi⁶³. La actividad de SOD se evaluó espectrofotométricamente a 560 nm mediante un método previamente descrito, basado en la reducción de NBT a formazan⁶⁴. La cantidad de proteína que inhibe la reducción de NBT a formazan al 50% del máximo se define como una unidad de actividad SOD, que comprende la actividad de SOD 1 y SOD 2.

Western blot

El extracto de proteína celular se obtuvo añadiendo buffer Laemli, que contiene: Tris, SDS y β -mercaptoetanol, directamente a las células, se raspó y el extracto se lisó por pipeteo e hirviendo. Cantidades iguales de proteína fueron separadas mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo primario apropiado. Los anticuerpos primarios se prepararon en TBS-T como se indica a continuación: anti-gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:1000) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, EE.UU.), anti-SOD2 (1:1000), anti-SOD1 (1:1000), anti-catalasa (1:500) (cell signalling), anti- γ H2AX (1:1000) (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-H2AX (1:1000) (Upstate), anti-HA (1:1000) (Roche, Basilea, Suiza), anti-FLAG M2 (1:2000) (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), anti - VPH18 E2 (1:1000) (Abcam). La membrana se lavó tres veces con TBS-T y se incubó con anticuerpos secundarios de ratón o conejo acoplados a la peroxidasa de rábano (HRP). Las membranas se revelaron finalmente utilizando el reactivo Chemo Luminescent (Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Daño a DNA

El daño a DNA se evaluó por medio de inmunoblot identificando la relación de forma fosforilada de H2AX, conocida como γ H2AX con respecto a la forma no fosforilada de esta.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente. los datos se analizaron como la media \pm DE. Se utilizó la prueba ANOVA y Tukey para determinar la significancia estadística de las condiciones probadas comparando con el control.

Resultados

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pCDNA3 (E1, E2 VPH 18 y E7 VPH 16), vector p3X (E6 del VPH 16 y 18) y vector pcDNA3.4 TOPO TA (E7 del VPH 18).

Una vez obtenidos los plásmidos que expresaran las proteínas tempranas de los VPH se prosiguió a su transformación en bacterias *E. coli* DH5 α , esto se realizó mediante el método de choque térmico y posteriormente se continuó con la amplificación de los insertos mediante PCR.

Se realizó la secuenciación de los plásmidos mediante el método de Sanger y se continuó a verificar que las secuencias obtenidas correspondieran con las reportadas en bancos de datos conocidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); el porcentaje de identidad fue del 100 % para los plásmidos sujetos a alineamiento.

Una vez comprobados y analizados los plásmidos, se procedió a transfectarlos en la línea celular C33A. Se realizaron diferentes protocolos de transfección encontrándose que el sistema de Polyfect (Quiagen) presentaba el mayor porcentaje de transfección sin afectar la viabilidad celular.

E6 de los VPH 16 y 18 aumentan los niveles de ROS y disminuyen GSH/GSSG

Para determinar la influencia de la oncoproteína E6 de los VPH16 y 18 en el estado redox, se midió su efecto sobre la producción de ROS. Las células C33A que fueron transfectadas con plásmidos que expresaron E6 de VPH 16 y 18 mostraron un aumento significativo en ROS. E6 de VPH16 indujo un incremento de 1.6 veces y E6 de VPH18 de 1.4 veces, comparando con las células transfectadas con el vector control p3X. Así mismo se analizó la relación GSH/GSSG como marcador de OS y se encontró que E6 disminuye significativamente la relación GSH/GSSG en un 67% y 76% para VPH16 y 18, respectivamente (Fig. 2C). Dado que el aumento de los niveles de ROS podría deberse a la muerte celular inducida por las transfecciones, se evaluó la viabilidad celular para todas las transfecciones sin que se encontraran

cambios a este respecto entre las células con expresión de E6 y células con el control (Figura 2D)

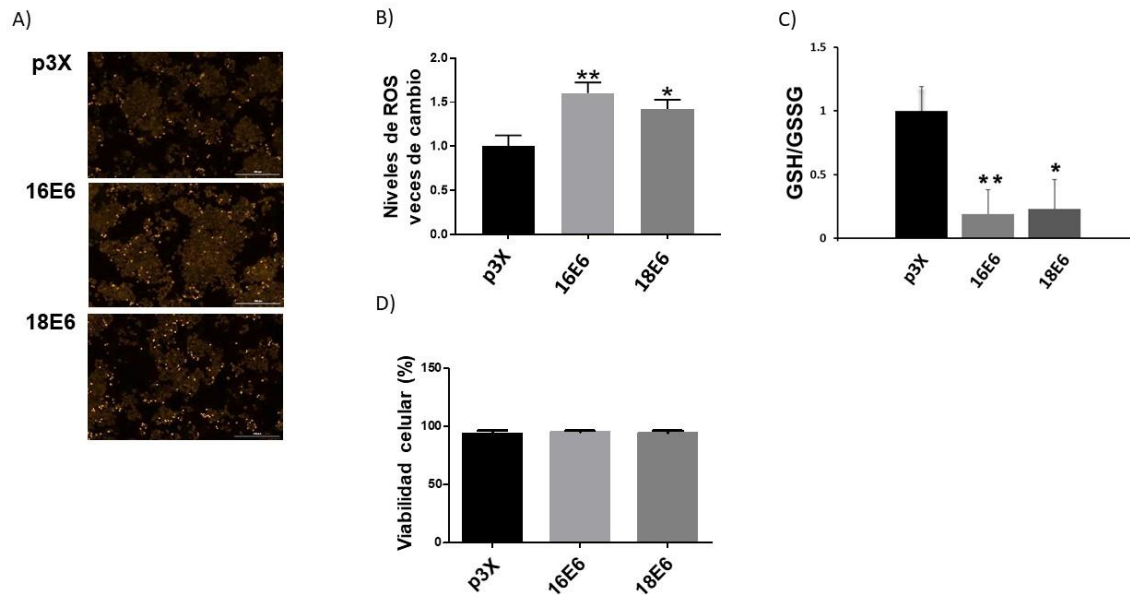


Figura 2. La expresión de la oncoproteína E6 del VPH induce estrés oxidante. A) Imágenes representativas y B) datos cuantitativos de ROS inducidos por VPH16 E6, VPH18 E6 y células transfectadas con el plásmido control. La intensidad promedio de la fluorescencia de etidio se midió utilizando un analizador de imagen en 16 campos diferentes por pozo, por cada condición, en tres experimentos independientes. Medición de la relación GSH/GSSG (C) y viabilidad celular (D). Los datos son representados por el promedio \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs control (p3X).

E6 de los VPH 16 y 18 disminuye los niveles y la actividad de catalasa

Como parte del efecto de E6 en el estado redox, examinamos si E6 afecta los niveles y la actividad de las enzimas antioxidantes. Primero evaluamos el efecto de las oncoproteínas E6 sobre los niveles y actividad de la catalasa. Las Figuras 3A y B muestran una disminución significativa en los niveles de catalasa en presencia de E6 de VPH16 (hasta 89%) y VPH18 (hasta 92%). Además se detectó una disminución de la actividad de catalasa, sin diferencias entre los tipos virales. Posteriormente, se evaluó el efecto de E6 sobre los niveles de SOD1 y 2, así como su actividad, dado que son enzimas antioxidantes clave implicadas en la regulación de ROS. No se encontraron diferencias en los niveles protéicos de SOD1 o 2 en presencia de E6 en comparación con las células control, como lo indica el análisis densitométrico (Figura 3D, E). E6 tampoco afectó la actividad de las SOD (Fig. 3F).

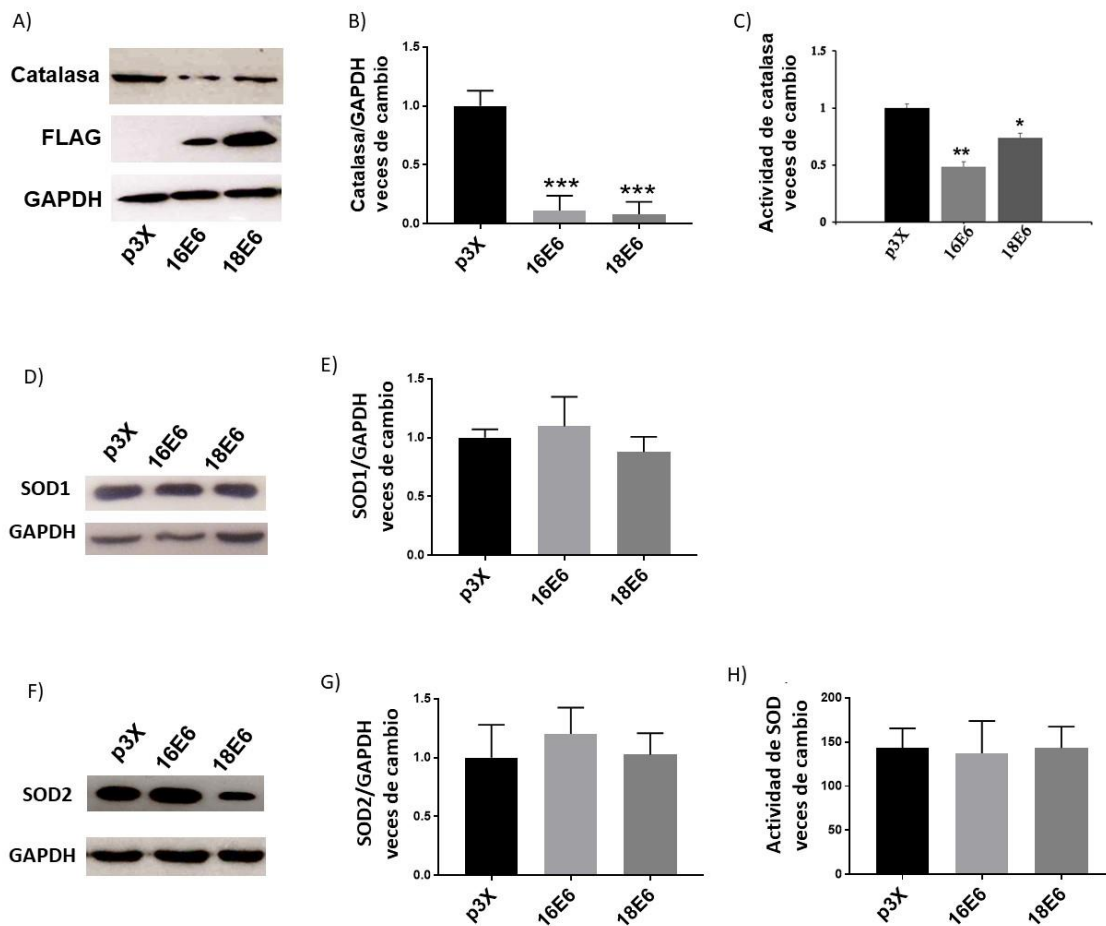


Figura 3. Las oncoproteínas E6 disminuyen los niveles y la actividad de la proteína catalasa.

A) Inmunoblot representativo que muestra niveles de catalasa en células C33A que expresan E6 del VPH16 o de VPH18 marcados con Flag y p3X como control; Se usó gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. B) Densitometría cuantitativa de expresión de catalasa en relación con GAPDH. C) Actividad enzimática de catalasa en células C33A transfectadas. D) Inmunoblot representativo de los niveles de superóxido dismutasa (SOD) 1 en células C33A transfectadas con E6 de VPH16 y 18 marcados con Flag, se utilizó a p3X como control; GAPDH se empleó como control de carga. E) Densitometría cuantitativa de la expresión de SOD2 en relación con GAPDH. F) Actividad de la enzima SOD en células C33A transfectadas. E6 no cambia los niveles de proteína SOD1/2, ni la actividad SOD. Los datos son el promedio \pm DE, $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ *** $p < 0.0005$ vs control (p3X). n=3.

E6 de los VPH 16 y 18 inducen daño al DNA

Los altos niveles de ROS podrían inducir daño al DNA, ya que favorece el rompimiento de la doble cadena de DNA⁶⁵. Para determinar si el incremento en ROS inducido por E6 induce daño al DNA, se midió la forma fosforilada de la variante de histona H2AX (γ H2AX), biomarcador de rompimiento de doble cadena del DNA⁶⁶. Se encontró que la relación γ H2AX/H2AX aumentó en 2.2 y 2.3 veces en las células que expresan E6 de los VPH16 y 18, respectivamente, en comparación con las células transfectadas con el plásmido control p3X (Figura 4).

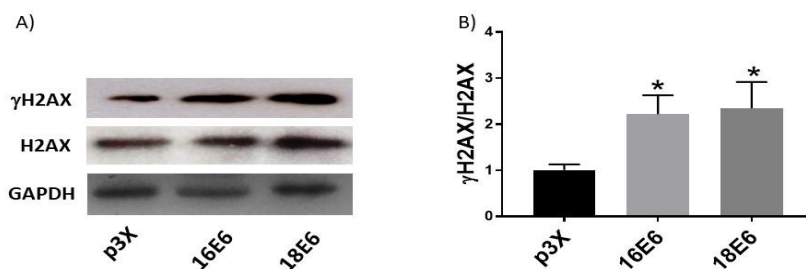


Figura 4. E6 de VPH16 y 18 aumentan la relación γ H2AX/H2AX en células C33A. A) Inmunoblot representativo que muestra los niveles de H2AX y γ H2AX en células C33A transfectadas con E6 de VPH16 y 18 marcado con Flag; p3X se uso como control. Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se empleó como control de carga. B) Densitometría cuantitativa de la expresión de H2AX y γ H2AX en relación con GAPDH. Los datos son el promedio \pm DE, * $p < 0,05$ frente al control p3X. $n = 3$.

Las oncoproteínas E7 de los VPH16 y 18 reducen los niveles de ROS y aumentan la relación GSH/GSSG

Se ha demostrado previamente que E7 de VPH16 induce la expresión de catalasa aunado a la disminución de los niveles de ROS⁶⁷. Nos interesamos en analizar no sólo el efecto de VPH16 E7, sino también de VPH18 en la producción de ROS en la línea celular C33A. Nuestros resultados demuestran que E7 de VPH16 y 18 reducen significativamente las cantidades de ROS en 60% y 42%, respectivamente, en comparación con las células de control (Fig. 5A, B). La relación de GSH/GSSG mostró aumento significativo cuando E7 estaba presente para los dos tipos virales

en 3 y 2.4 veces para VPH16 y 18, respectivamente, sin afectar la viabilidad celular (Figura 5C, D).

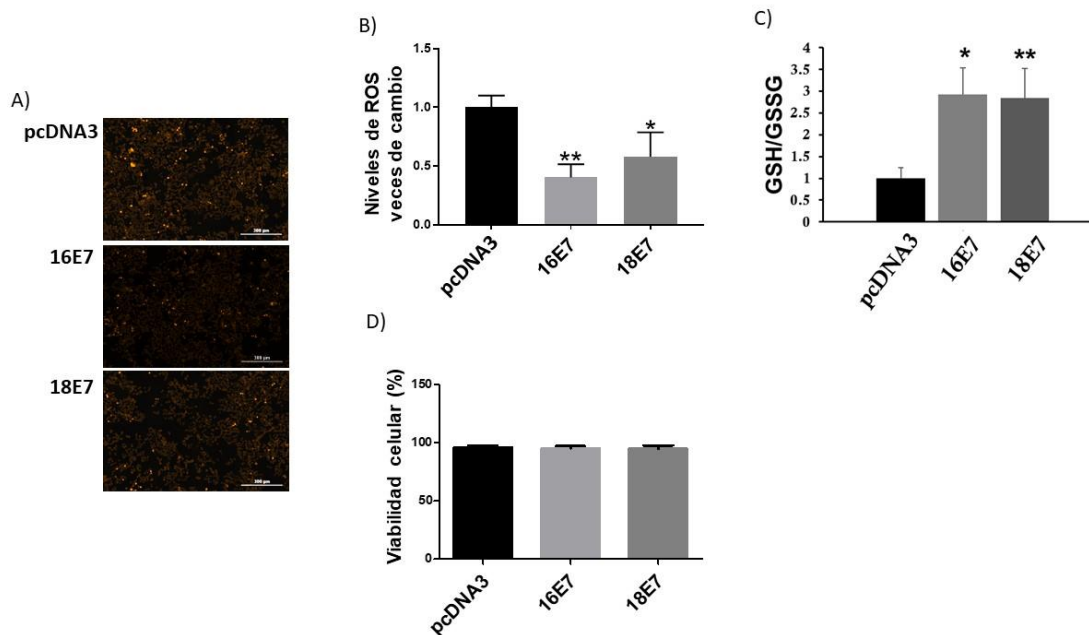


Figura 5. E7 de los VPH16 y 18 disminuyen la producción de ROS en células C33A y aumentan GSH. A) Imágenes representativas y B) datos cuantitativos de los niveles de ROS en células que expresan E7 de VPH16 y 18, se utilizó como vector control a pcDNA3. La intensidad promedio de fluorescencia de etidio se midió utilizando un analizador de imagen en 16 campos diferentes por pozo, por condición, en tres experimentos independientes. Relación GSH/GSSG (C) y viabilidad celular (D). Los datos son la media \pm DE. ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$ vs control (pcDNA3).

E7 afecta los niveles y la actividad de enzimas antioxidantes

En contraste al efecto de las oncoproteínas E6, las proteínas E7 disminuyeron la producción de ROS, como se representa en la Figura 5. Por lo tanto, nos preguntamos si E7 también podría afectar la función de catalasa así como los niveles y la actividad de SOD. Las células C33A, transfectadas con plásmidos que expresan E7 de VPH16 y 18, mostraron un aumento de 3.4 y 3.2 veces en los niveles de catalasa, respectivamente (Fig 6A, B), así como en su actividad enzimática, con un aumento del 46% y 40%, correspondientemente (6C). Con respecto a SOD se encontró que E7 induce una disminución de 37% y 52% para VPH16 y 18, respectivamente (Figura 6D). Por su parte, los niveles de SOD 2 no cambiaron, como lo demuestra el análisis de densitometría del inmunoblot (Fig. 6E).

Mientras tanto, la actividad enzimática de SOD1/2 disminuyó en el 50% y el 27% en la presencia de E7 de los tipos 16 y 18 del VPH, respectivamente (Figura 6F).

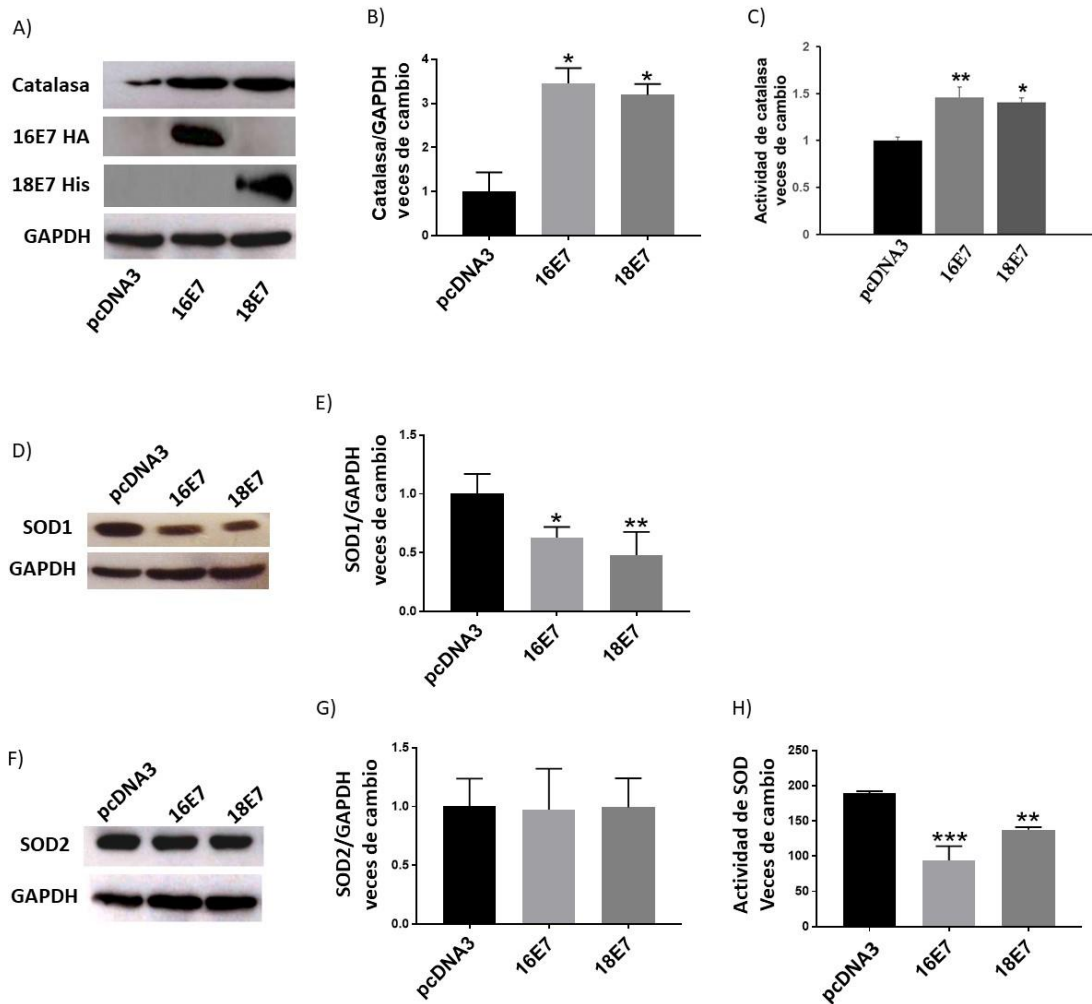


Figura 6. La expresión de E7 de VPH16 y 18 aumenta los niveles de la proteína catalasa y su actividad. A) inmunoblot representativo y B) análisis densitométrico de los niveles de catalasa en células C33 transfectadas con plásmidos E7 del VPH16 (con una etiqueta o *tag* HA) y del VPH18 (con etiqueta His), se utilizó al plásmido pcDNA3 de control de transfección. La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se analizó como control de carga. C) Actividad de la enzima catalasa en células que expresan E7 de VPH 16 y 18. D) Inmunoblot representativo y análisis densitométrico de los niveles de SOD1 y (E) SOD2 en células C33 A transfectadas con plásmidos E7 del VPH16 y 18, de igual manera se utilizó a pcDNA3 como control. GAPDH se utilizó como control de carga. F) Actividad de la enzima SOD en células transfectadas. La actividad de SOD disminuye en presencia de proteínas E7. Los datos son la media \pm DE, * $p < 0,05$, ** $p < 0.005$, en relación al control (pcDNA3). $n = 3$.

E7 no induce daño a DNA

Debido a que E7 disminuyó los niveles de ROS, se esperaba que los niveles de γ H2AX permanecieran sin cambios. La Figura 7 demuestra que los niveles de la relación γ H2AX/H2AX no se alteran en presencia de E7, ya sea del tipo 16 ó 18.

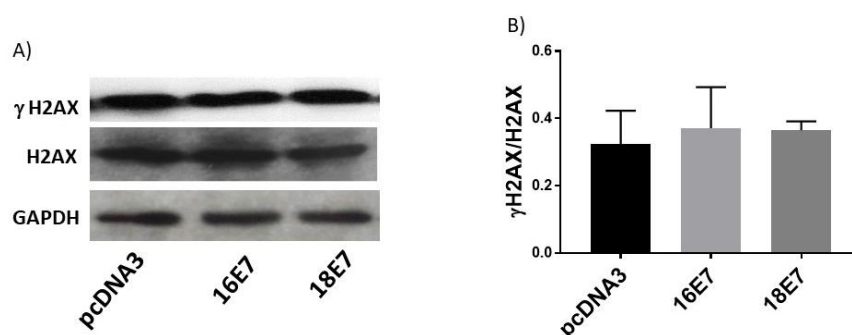


Figura 7. Las oncoproteínas E7 no cambian la relación γ H2AX/H2AX. A) inmunoblot representativo de H2AX y γ H2AX y B) análisis densitométrico de la relación de ambas proteínas en células transfectadas con E7 de los VPH16 y 18. Los datos son la media \pm DE, * $p < 0,05$ frente al control (pcDNA3). n=3.

La expresión combinada de E6 y E7 no afecta a ROS ni induce daño a DNA aun cuando disminuye la actividad de SOD

Los resultados anteriores muestran que el estado redox de C33A es modulado por E6 y E7 con efectos antagonistas. Vale la pena mencionar que durante una infección por VPH las oncoproteínas E6 y E7 se expresan simultáneamente, ya que se traducen a partir de un solo transcrito bicistrónico E6-E7⁶⁸. Por lo tanto, decidimos probar el efecto de la expresión combinada de E6 y E7 en la regulación redox. Se co-transfectaron los plásmidos que expresan E6 junto con las versiones marcadas de E7, tanto de VPH16 como de 18. Nuestros resultados no muestran diferencias en la producción de ROS cuando las células expresaron simultáneamente los oncogenes E6 y E7 de ambos tipos virales en comparación con el control (Fig. 8A, B); tampoco cambió la relación GSH/GSSG o la viabilidad celular, ni los niveles de catalasa o su actividad (Fig. 8C,E,F,G). Por su parte los niveles de SOD1 disminuyeron en 63% y 67% en presencia de ambas oncoproteínas E6/E7 de VPH16 y 18, respectivamente, en contraste con SOD2, que permaneció sin cambios

(Fig 8H,I,J,K). Con respecto a la actividad de SOD, se encontró una disminución significativa cuando E6 y E7 se expresan conjuntamente (Fig 8L). La relación de γ H2AX/H2AX no se vio afectada, ni la viabilidad celular (Fig 8M,N,D).

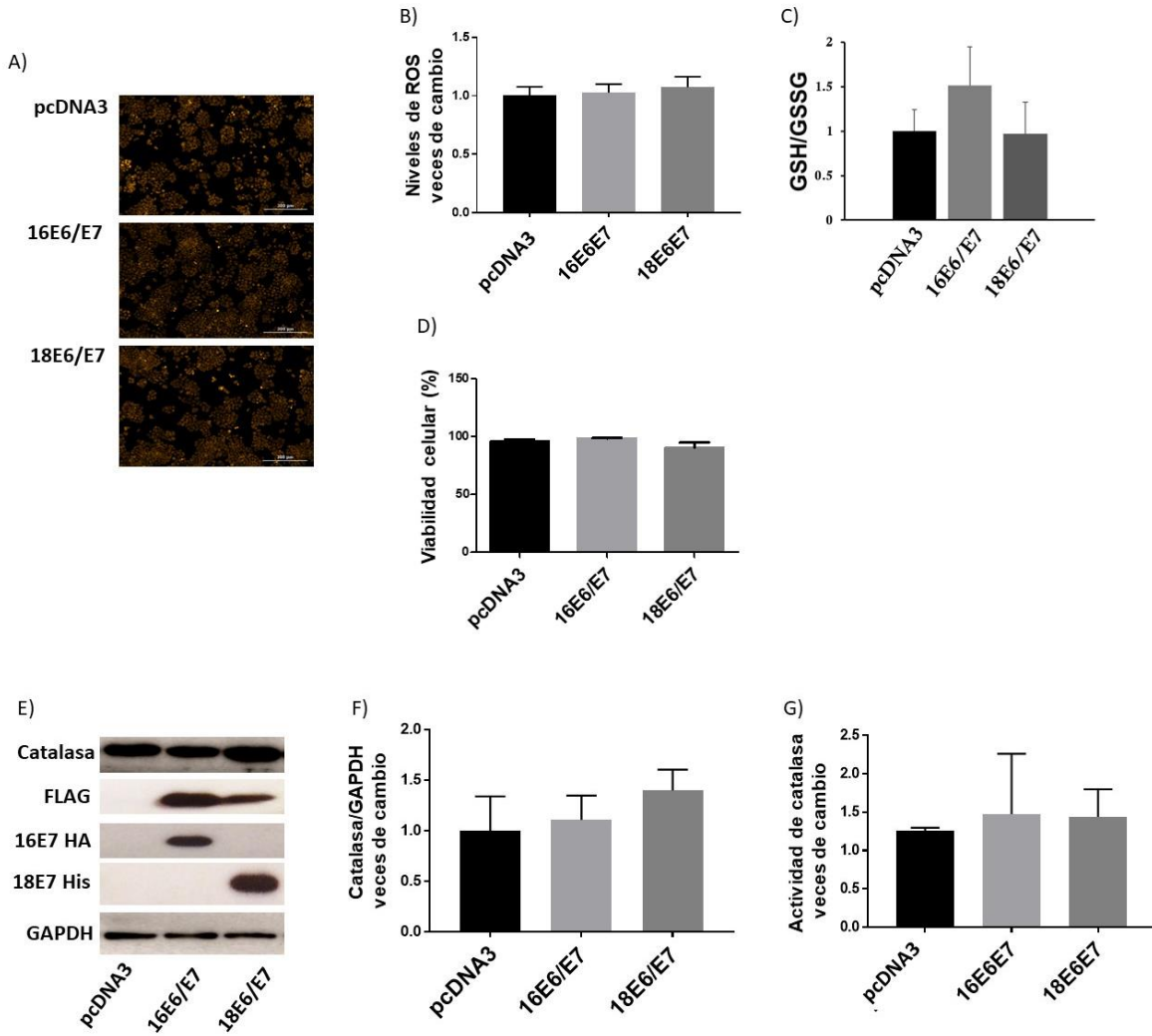


Figura 8 continúa en la siguiente página

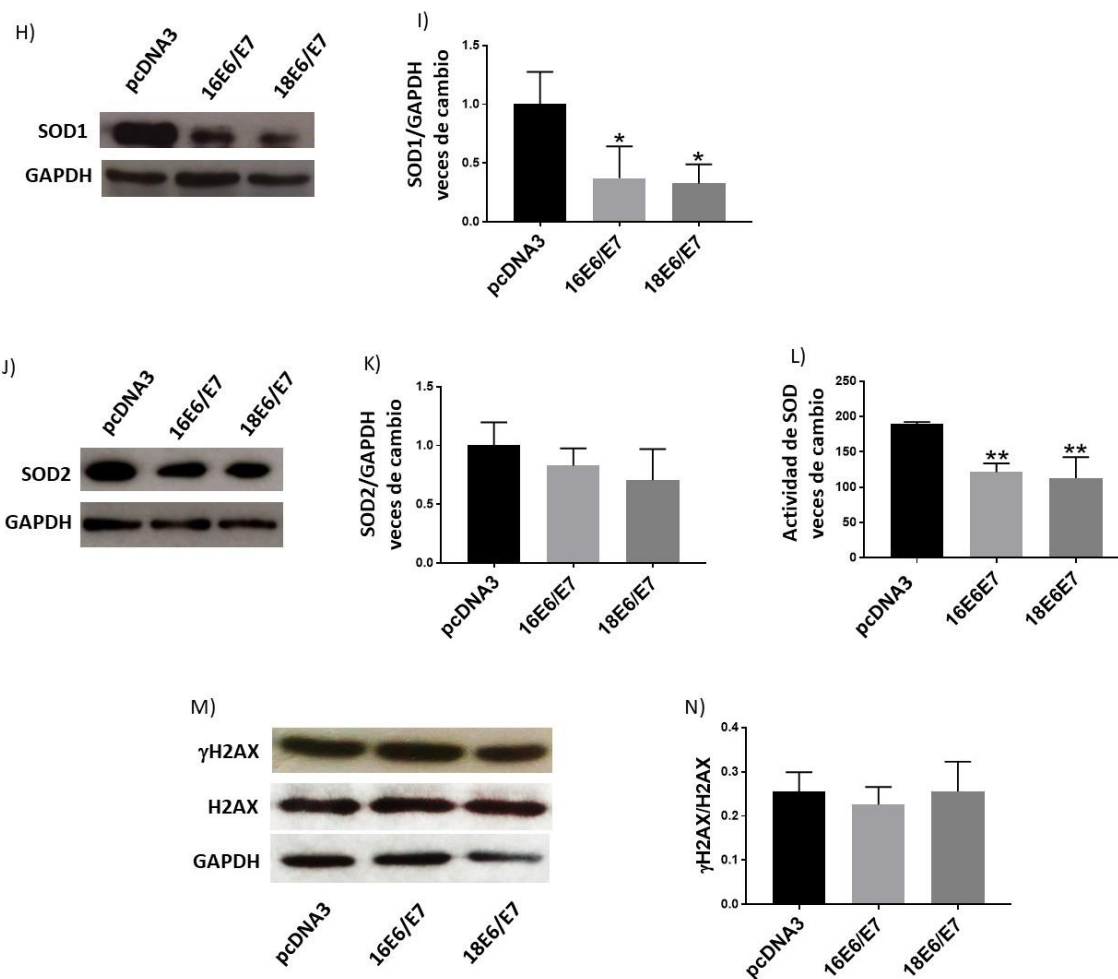


Figura 8. Las niveles de SOD 1 y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) disminuye en presencia de oncoproteínas E6/E7. A) Imágenes representativas y B) datos cuantitativos de los niveles de especies reactivas de oxígeno, C) Niveles de GSH y D) viabilidad celular en células que co-expresan E6/E7 de VPH16 y 18, se empleó a pcDNA3 como vector control. C) inmunoblot representativo y D) análisis densitométrico de los niveles de catalasa en células C33A transfectadas con E6 y E7. E) Actividad de la enzima catalasa en células transfectadas. F) Inmunoblot y G) análisis densitométrico de SOD 1 y H) inmunoblot e I) análisis densitométrico de SOD 2. J) Actividad enzimática de SOD en células transfectadas. K) Inmunoblot y L) análisis densitométrico de la relación γ H2AX/H2AX. En todos los inmunoblots se empleó glyceraldehyde 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga. Los datos son representados como el promedio \pm DE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs pcDNA control. $n = 3$.

E2 y E1/E2 de VPH 18 aumentan los niveles de ROS

Las proteínas E1 y E2 del VPH se expresan durante las primeras etapas de una infección, por lo que nos interesó determinar su efecto sobre el estado redox. La secuencia de dichas proteínas es muy conservada entre los tipos de VPH de alto riesgo y por lo tanto decidimos analizar E1 y E2 del VPH tipo 18, además de que la

información actual sobre la regulación redox asociado a una de estas proteínas se basa en el VPH tipo 18⁵⁸

Se evaluaron las cantidades de ROS en células transfectadas con E1 y con E2 solos o en combinación. La Figura 9 muestra que mientras E1 no afecta los niveles de ROS, E2 los aumenta en un 1.36 veces de manera estadísticamente significativa. Por su parte la expresión combinada de las proteínas de E1 y E2 mostró un incremento de 1.46 veces en ROS, en comparación con las células control (Figura 9A, B). La relación GSH/GSSG disminuyó con la expresión de E1 (50%), E2 (68%) y la conjunción de E1/E2 (57%) (Fig. 9C). Es importante mencionar que la viabilidad celular no fue afectada por la presencia de estas proteínas (Fig. 9D).

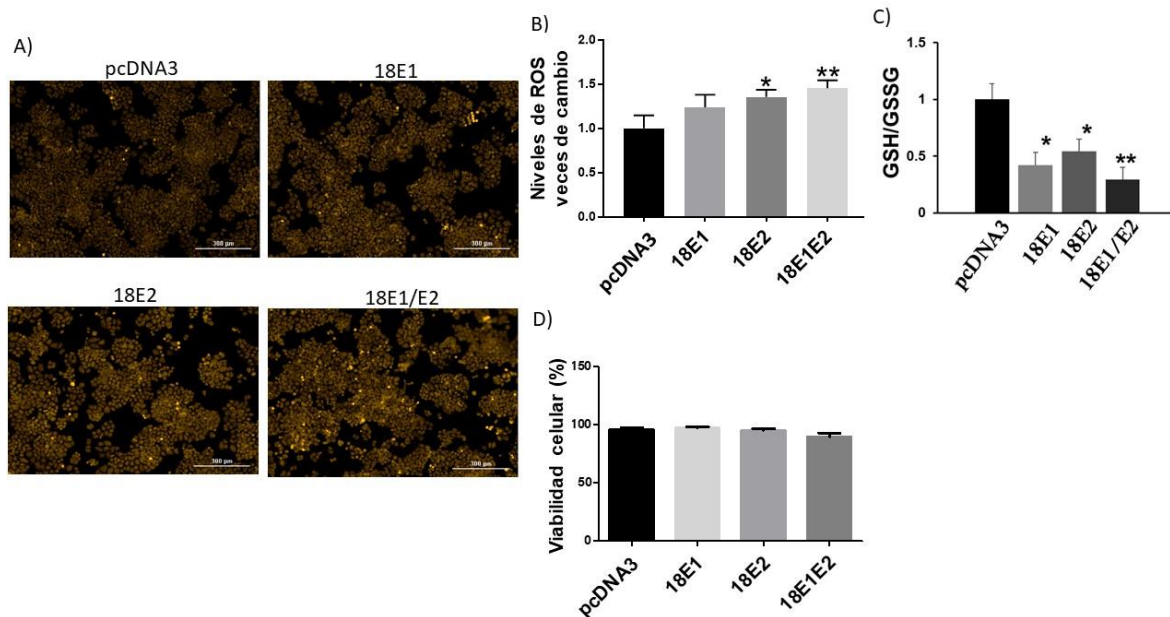


Figura 9. La expresión de las proteína E1/E2 del VPH18 induce estrés oxidante. A) Imágenes representativas y B) datos cuantitativos de niveles de ROS en células que expresan E1, E2 y E1/E2 del VPH18, se empleó a pcDNA3 como vector control. La intensidad media de fluorescencia de etidio se midió utilizando un analizador de imagen en 16 campos diferentes por pozo, por condición. Relación GSH/GSSG (C) y viabilidad celular (D). Los datos están representados por el promedio \pm DE. * $p < 0,05$, ** $p < 0.005$ vs control (pcDNA3). $n=3$.

E1, E2 y E1/E2 del VPH18 aumentan la actividad de catalasa y disminuyen los niveles y la actividad de SOD

Después de evaluar si las proteínas E1 y E2 podrían afectar los niveles de ROS, evaluamos si también modificaban los niveles y la actividad de las enzimas

antioxidantes catalasa y SOD1/2. Las Figuras 10A y B muestran que los niveles de catalasa no se vieron afectados por la presencia de E1 y E2, expresados de manera única o en combinación. Sin embargo, al medir la actividad de catalasa, encontramos un aumento significativo de alrededor de 1.9 veces para todas las condiciones probadas (Figura 10C). También se evaluó si E1 y E2 afecta los niveles protéicos de SOD1 y SOD2 así como su actividad. Como se muestra en la figura 10D, los niveles de SOD1 disminuyeron en presencia de E2 en 71% o en la conjunción E1/E2 en 88%, mientras que los niveles de SOD2 disminuyeron en todas las condiciones probadas: 67% para E1, 73% para E2 y 72% para E1/E2, (Figura 10E). La actividad de la SOD disminuyó con E1 en 67%, E2 en 73% y E1/E2 en 72% (Fig. 10F), lo que sugiere que E1 y E2 pueden tener un mecanismo común en la desregulación de la actividad SOD.

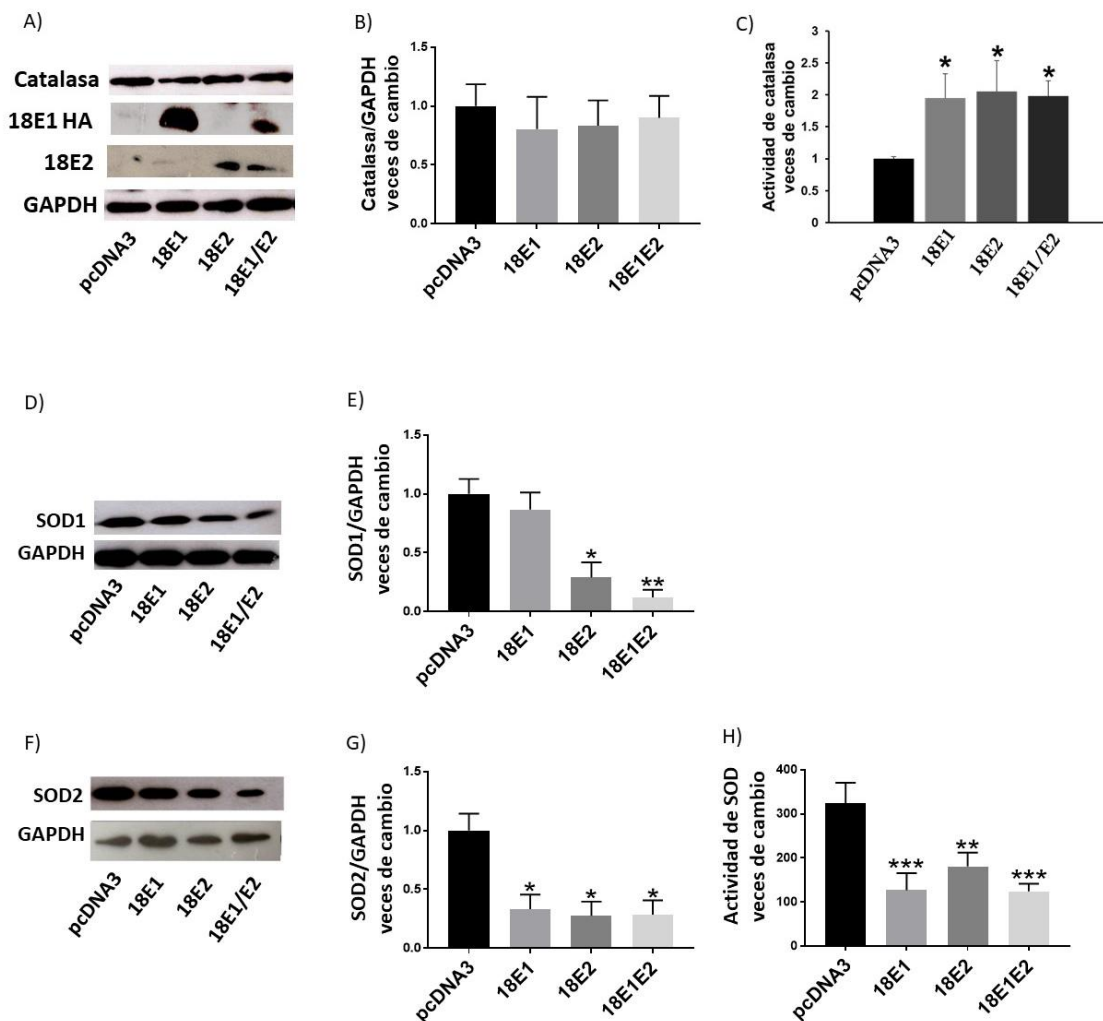


Figura 9. La expresión de E1, E2 y E1/E2 disminuye la expresión y actividad de SOD, aunque no cambia los niveles de catalasa si aumenta su actividad. A) Inmunoblot representativo y B) análisis densitométrico de los niveles de catalasa en células C33A transfectadas con E1, E2 y E1/E2 de VPH18. La gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se analizó como control de carga. C) Actividad de la enzima catalasa en células transfectadas. D) Inmunotransferencia representativa y análisis densitométrico de los niveles de SOD1 y SOD2 en células C33A transfectadas con plásmidos E1, E2 y la conjunción E1/E2 de VPH18. Nuevamente GAPDH se empleó como control de carga. F) Actividad de la enzima SOD en células transfectadas. La expresión de E1, E2 y E1/E2 disminuye tanto los niveles de SOD como su actividad. Los datos son representados como el promedio \pm DE, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ frente al control (pcDNA3). $n = 3$.

La expresión combinada de proteínas E1 y E2 induce daño al DNA

Por último, se evaluó si la expresión de E1, E2 o E1/E2 podría inducir daño al DNA. Se encontró que sólo en las células con expresión combinada de E1 y E2 la relación γ H2AX/H2AX aumentó 4.3 veces con respecto al control, indicando que sólo en estas condiciones existe daño a DNA (Fig. 11).

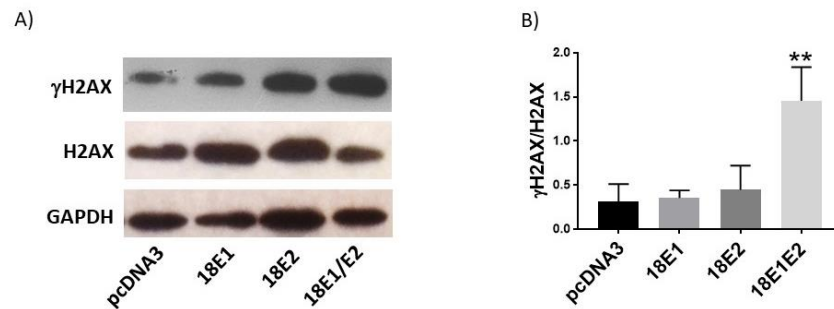


Figura 11. La expresión de E1/E2 de VPH18 aumenta la relación γ H2AX/H2AX en células C33A. A) inmunoblot representativo y B) análisis densitométrico de H2Ax y γ H2AX en células transfectadas con E1, E2 y E1/E2. Los datos están expresados como el promedio \pm DE, ** $p < 0.005$ frente al control de pcDNA. $n=3$.

Discusión

Se ha descrito que la infección por VPH es causa necesaria más no suficiente para el desarrollo de cáncer cervical. Así, se han identificado diversos factores de riesgo adicionales a la infección por VPH que promueven el proceso carcinogénico⁶⁹. Recientemente se ha propuesto al OS como un factor crítico en el desencadenamiento del cáncer de cuello uterino⁵⁴, ya que induce daño al DNA, con una alta probabilidad de inducir la integración del genoma viral al genoma celular. La integración del genoma viral induce en una gran proporción de los casos, el rompimiento del marco de lectura abierto de E2 con la posterior sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7⁷⁰. Por lo tanto, el probable mecanismo por el cual OS induciría la integración del genoma del VPH es ahora objeto de investigación. Para determinar si las proteínas tempranas E1, E2, E6 y E7 del VPH modulan el estado redox celular y daño al DNA, se realizaron una serie de experimentos para medir el impacto de estas proteínas en la regulación del estado redox.

Demostramos que la expresión de E6 del VPH16 y 18 induce un incremento en la producción de ROS. La producción de ROS comienza cuando el O_2 se reduce a O_2^- por diferentes procesos celulares, estas ROS son más reactivas que el O_2 induciendo la producción de otras ROS aun más reactivas y tóxicas⁴⁴. Como consecuencia, las células expresan enzimas antioxidantes como SOD1 y 2, y catalasa, que a su vez reducen el O_2^- en H_2O_2 y el H_2O_2 en H_2O , respectivamente⁴⁶. El OS inducido por E6 podría estar asociado al sistema antioxidante celular, en el cual están implicadas catalasa y SOD, que son potentes enzimas antioxidantes que regulan el OS⁴⁵.

En este trabajo se encontró que los niveles de catalasa disminuyen en presencia de E6. Este efecto podría deberse a cambios epigenéticos inducidos por E6⁷¹, los cuales podrían afectar la expresión de catalasa. Por otra parte, se ha encontrado que la presencia de E6 promueve la sobreexpresión del miRNA 30b, que a la vez degrada al RNAm de catalasa^{72, 73}. Considerando que los niveles de expresión enzimática no reflejan necesariamente su actividad antioxidante, se midió el efecto de E6 sobre la actividad de catalasa y se observó una disminución significativa en la presencia de E6. En cualquier escenario son necesarios más estudios para

determinar los mecanismos implicados en la modulación del estado redox observada en nuestro estudio.

Respecto a las otras enzimas antioxidantes, no se observaron cambios en los niveles de SOD1/2 ni en su actividad debido a la acción de E6. Algunos informes han demostrado que E6* del VPH16, una isoforma generada por el *splicing* de E6, induce incremento de ROS y daño del DNA en una línea celular derivada de osteosarcoma U-2 OS. Este aumento en ROS se asoció a una disminución de los niveles de la proteína SOD2⁵⁷. En el presente estudio, no se encontraron cambios en los niveles de proteína y actividad de SOD1 o SOD2 mediante la expresión ectópica de E6 de ambos tipos de VPH, probablemente debido a las diferencias entre las líneas celulares utilizadas. De cualquier modo debe considerarse que E6 sufre un proceso de *splicing* independientemente del tipo celular, generando la expresión tanto de E6 completa como de la forma trunca de E6, E6*, de manera que los posibles efectos independientes de E6* podrían ocultarse en presencia de la proteína E6 completa.

Se sabe que altos niveles de RONS están asociados a la ruptura de la doble cadena de DNA. Por ejemplo, las oxidaciones inducidas a las bases nitrogenadas del DNA como 8-oxo-guanina, provoca que las topoisomerasas, enzimas encargadas de remover la tensión superficial del DNA durante la replicación, sean atrapadas en estos sitios induciendo rompimiento de DNA de doble cadena^{74, 75}. Así, el aumento de ROS inducido por E6 podría promover daño al DNA. Por lo tanto medimos si E6 inducía daño a DNA mediante la determinación de γ H2AX, biomarcador para el daño del DNA⁶⁸. Nuestros datos muestran que E6 de ambos tipos de virus aumentó la relación de γ H2AX/H2AX, lo que sugiere que el efecto ejercido por E6 sobre el daño del DNA se debe en parte a una reducción de los niveles de catalasa y su actividad dando lugar al aumento de ROS.

En contraste con E6, encontramos que la expresión de la oncoproteína E7 disminuyó la señal de ROS, asociada a un aumento en los niveles de catalasa y su actividad. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Shim y cols. (2005)⁶⁷, quienes señalaron que la proteína E7 de VPH16 aumenta los niveles de catalasa y su actividad en células HaCaT, un modelo celular de queratinocitos

inmortalizados. En nuestro caso, además, de demostrar que los niveles y la actividad de catalasa aumentan con E7 de VPH16, también encontramos que el mismo efecto sucedía con E7 de VPH18. Por el contrario, se encontró que los niveles de SOD1, así como la actividad SOD disminuyeron por la acción de E7. Es probable que la reducción de los niveles de SOD1 refleje la disminución de la actividad enzimática observada para SOD, ya que no se detectaron cambios en la proteína SOD2. Vale la pena mencionar que SOD1 se encuentra principalmente en el citosol donde realiza su actividad enzimática, reduciendo O_2^- a H_2O_2 ⁷⁶. Es posible que en presencia de E7, O_2^- no se acumule debido a la ausencia de actividad SOD, ya que O_2^- dismuta espontáneamente a H_2O_2 además de que se sabe que otras enzimas como la NADPH oxidasa pueden reducir el O_2^- a H_2O_2 ⁷⁷. El H_2O_2 es entonces reducido a H_2O por la alta actividad de la catalasa sin causar OS o daño al DNA(Figura 7).

Es importante considerar que la transcripción de E6 y E7 de los VPH-AR ocurre a partir de un RNA mensajero bicistronico y por lo tanto ambos oncogenes se expresan simultáneamente durante la infección, aunque los niveles de ambas proteínas podrían ser diferentes⁶⁹. En nuestro estudio co-expresamos a E6 y E7 simultáneamente en células C33A, mostrando que la co-expresión de E6 y E7 no cambia los niveles de ROS ni induce daño al DNA, en relación a las células con el vector control. En cuanto a las enzimas antioxidantes, se observó que el efecto individual de cada oncoproteína sobre catalasa es neutralizado cuando se expresan ambas oncoproteínas, puesto que no existen cambios ni en los niveles ni en la actividad de catalasa. Dado que la expresión combinada de E6/E7 sólo disminuyó los niveles de SOD1 pero no de SOD2, es posible que la reducción de la actividad de la SOD se relacione exclusivamente con el efecto de las oncoproteínas sobre los niveles de SOD1, como se observa en la figura 5. La co-expresión de E6 y E7 no indujo ningún cambio en la relación γ H2AX/H2AX, sugiriendo que el daño al DNA promovido por E6 es evitado por el efecto protector otorgado por E7. En contraste con los datos obtenidos por Marrullo y colaboradores (2015)⁷⁸ en un modelo de cáncer de cabeza y cuello, nosotros no encontramos incremento en el OS ni evidencia de daño al DNA cuando E6 y E7 se expresan conjuntamente,

probablemente debido a los efectos contrarios de tales oncoproteínas. Es posible que el contexto celular utilizado en este trabajo de alguna manera influya en las diferentes acciones de E6 y E7 sobre sus blancos celulares.

Nuestros datos sugieren que el OS es eficientemente controlado en el cáncer de cuello uterino a través de la regulación de enzimas antioxidantes por proteínas del VPH. Resulta importante investigar el comportamiento de las proteínas del VPH en las diferentes neoplasias relacionadas con el VPH.

En este trabajo se utilizaron células C33A, células que se caracterizan por expresar una proteína p53 mutada en su motivo de unión al DNA, careciendo así de sus funciones transcripcionales⁷⁹. En este sentido es importante señalar que Shim y cols.⁶⁷ también encontraron un aumento en los niveles de catalasa debido a E7, cuando se usa un modelo mutado de p53⁸⁰. Por lo tanto, es posible que nuestros hallazgos sean independientes de p53; aunque se pueden encontrar diferentes efectos de las proteínas del VPH, sobre el estado redox celular, en contextos celulares distintos, incluido uno con p53 funcional, que merece estudios adicionales. Adicionalmente, se determinó la influencia de las proteínas E1 y E2 en el estado redox celular. Previamente, Lai y cols. (2013)⁵⁸ demostraron que la proteína E2 de VPH18 induce ROS en células HaCaT, el cual se asoció a una modificación de las crestas mitocondriales promovida por dicha proteína viral. Nosotros también encontramos que E2 y la conjunción de E1/E2 del VPH18 promueve un incremento de ROS en células C33A, mientras que E1 de forma aislada no produce tal efecto. El aumento observado en los niveles de ROS no sólo podría deberse a la acción de la proteína E2 en las crestas mitocondriales; sino también a la modulación de los niveles de proteína SOD1/2 y su actividad. En nuestro trabajo encontramos que los niveles de SOD1 sólo disminuyen en presencia de E2 y la conjunción de E1/E2. Así también, encontramos que los niveles de SOD2 y la actividad de SOD, disminuían para todas las condiciones. Por otro lado, también se observó que si bien no existen cambios en los niveles de catalasa, si existe un aumento significativo de su actividad cuando E1, E2 y su conjunción están presentes. Es posible que el incremento en ROS encontrado en presencia de E2 y E1/E2, se deba principalmente a la capacidad de E2 para inducir modificaciones en las crestas mitocondriales junto con

una disminución en la actividad de SOD. Sin embargo, para E1 la disminución de la actividad de SOD podría ser neutralizada por el aumento de la actividad de catalasa, con un mecanismo parecido al sugerido para E7, donde O_2^- es dismutado espontáneamente a H_2O_2 y sucesivamente degradado a H_2O por la acción de catalasa. El aumento de ROS asociado a daño al DNA, sólo en células co-transfectadas con E1/E2, indica un efecto aditivo de ambas proteínas.

A lo largo de las diferentes etapas de desarrollo del cáncer cervical, se ha demostrado que los tejidos displásicos positivos para VPH muestran altos niveles de OS en contraste con los tejidos de cáncer positivos a VPH o a los no displásicos negativos al virus, indicando una modulación diferencial de OS durante el establecimiento del cáncer cervical⁵⁴. En este trabajo se demostró que las proteínas tempranas del VPH tienen un efecto diferencial sobre la modulación de ROS y se propone que este efecto está de alguna manera involucrado en la progresión del cáncer, ya que en las primeras etapas de la infección E1 y E2 son altamente expresados en comparación con E6 y E7⁷⁰. Una vez que se produce la integración del genoma viral, E2 y E1 dejan de expresarse debido a la interrupción del marco abierto de lectura de E2. Este proceso promueve la sobre-expresión de los oncogenes virales y en consecuencia, la transformación celular. En nuestro estudio se demuestra que E1 y E2 inducen OS y daño al DNA. Por lo tanto, los efectos de E1 y E2 sobre el estado oxidativo podría influir en la integración del genoma viral. El aumento de OS en células C33A debido a E1/E2 podría simular a los resultados obtenidos por De Marco y cols. (2012)⁵⁴ y Visalli y cols. (2016)⁸¹, que demuestran altos niveles de ROS en los tejidos displásicos. Por otra parte, la expresión conjunta de los oncogenes E6 y E7 produjo un equilibrio en el estado redox, lo que podría explicar en parte la reducción de ROS en los tejidos cancerosos encontrada por De Marco y cols. (2012)⁵⁴. En este punto, sería relevante explorar el efecto de los agentes antioxidantes en las primeras etapas de las infecciones por VPH, como una estrategia para evitar la integración del genoma viral y el consiguiente desarrollo del cáncer cervical.

La Figura 11 muestra el efecto propuesto de las proteínas tempranas del VPH en el estado redox celular, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo. Estos

datos proporcionan información sobre la participación del VPH en la modulación de ROS durante el desarrollo del cáncer cervical.

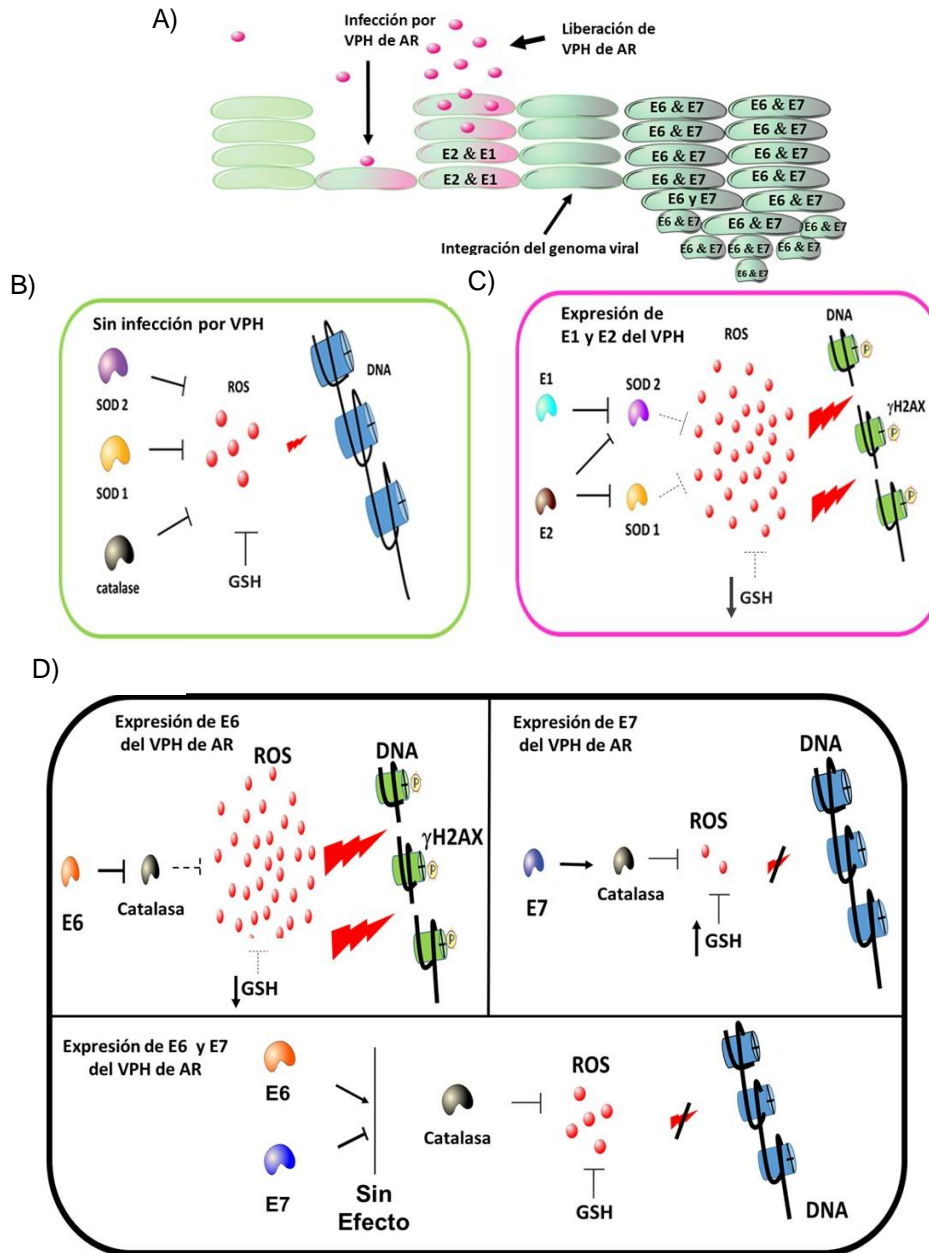


Figura 12. Las proteínas tempranas de los Virus del Papiloma humano de alto riesgo (VPH-HR) modulan diferencialmente el estado redox. El VPH infecta las células epiteliales, lo que induce la replicación del genoma y la producción de viriones como parte de su ciclo de vida. Las

células infectadas exhiben altos niveles de expresión de proteínas E1 y E2 durante las primeras etapas de una infección por VPH. Una vez que ocurre la integración, E6 y E7 se sobreexpresan promoviendo cambios celulares posteriores que impulsan el desarrollo del cáncer (A). En las células no infectadas, la producción de ROS está regulada por las enzimas antioxidantes GSH, SOD1/2 y catalasa que evitan el daño del DNA (B). En las células infectadas por el VPH, E1 y E2 disminuyen la expresión de SOD1/2, lo que induce un aumento de ROS asociado a la depleción de GSH y daño al DNA (C). En las células transformadas por VPH, la oncoproteína E6 aumenta los niveles de ROS que induce daño en el DNA al disminuir el GSH y la catalasa. Por el contrario, la oncoproteína E7 disminuye los niveles de ROS debido a la activación de catalasa y aumento de GSH, mientras que el DNA no es dañado. Mientras tanto, los efectos opuestos de las oncoproteínas E6 y E7 sobre la producción de catalasa, GSH y ROS evitan el daño en el DNA inducido por E6 solo (D).

Conclusiones

1. Las proteínas virales E1 y E2 disminuyen la actividad y expresión de SOD induciendo estrés oxidante y daño al DNA.
2. La oncoproteína E6 aumenta los niveles de ROS induciendo daño al DNA asociado a la disminución de la expresión y actividad de catalasa además de GSH.
3. La oncoproteína E7 aumenta la expresión y actividad de catalasa así como los niveles de GSH evitando aumento de ROS y daño de DNA.
4. La expresión conjunta de los oncogenes virales E6 y E7 no afectan la actividad ni expresión de catalasa manteniendo niveles normales de ROS sin promover daño al DNA.

Perspectivas

Verificar si el estrés oxidante inducido por E1/E2 del VPH 18 promueve la integración del genoma viral al genoma celular. De comprobarse este evento, se pueden usar antioxidantes que eviten el OS y a la vez evitar la integración del genoma viral al genoma celular.

Ahondar en los mecanismo moleculares relacionados con la disminución de la actividad y expresión de catalasa así como de GSH cuando E6 está presente. Un mecanismo probable es el aumento de mir30b que está implicado en la regulación de catalasa. Se ha comprobado que este mismo miRNA es regulado positivamente por la presencia de E6.

Estudiar si E7 activa algún mecanismo implicado en el aumento de la relación GSH/GSSG y catalasa. Un mecanismo relacionado al aumento de ambos parámetros es la activación de factores de transcripción como Nrf2, molécula maestra para mantener la homeostasis redox.

Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015, 1;136(5): E359–E386.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009, 20;384(2):260-5.
3. D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med*. 2011, 53 Suppl 1:S5-S11.
4. Rubin MA, Kleter B, Zhou M: Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am. J. Pathol* 2001.159;(4): 1211–8.
5. Daling JR, Madeleine MM, Schwartz SM. A population-based study of squamous cell vaginal cancer; HPV and cofactors. *Gynecol.oncol.* 2002 84(2): 263–70.
6. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol.* 1996 87 (1): 59- 64.
7. Clark MA, Hartley A, Geh JL. Cancer of the anal canal. *Lancet Oncol.* 2004 5(3): 149–57.
8. zur Hausen, H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002: 342–350.
9. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, *et al.* Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.* 2001; 82:15-33.
10. Sapp M, Bienkowska-Haba M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.* 2009, 276(24):7206-16.
11. Bernard HU. Regulatory elements in the viral genome. *Virology.* 2013;445(1-2):197-204.
12. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology.* 2013; 445(1-2):35-56.
13. Gillitzer E, Chen G, Stendlund A: Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J*, 2000, 19:3069–3079.
14. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013; 445(1-2):57-79.
15. Desaintes C, Goyat S, Garbay S: Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*, 1999, 18(32):4538-45.
16. Demeret, Desaintes C, Yaniv M: Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type18 viral oncogenes. *J Virol.* 1997, 71(12): 9343–9349. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):99-114.
17. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 2013 Oct;445(1-2):80-98.;76(19):9806-18.
18. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, *et al.* Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2002;76(19):9806-18.

19. DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):99-114.
20. Crusius K, Auvinen E, Steuer B, *et al.* The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res*. 1998;25;241(1):76-83.
21. Di Domenico F, Foppoli C, Blarzino C, *et al.* Expression of human papilloma virus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009, 8;28:4.
22. Kim SH, Oh JM, No JH, *et al.* Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*. 2009;30(5):753-7
23. Oh JM, Kim SH, Cho EA, *et al.* Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):402-10
24. Mantovani F, Banks L, 2001: The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 20:7874–87.
25. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol*. 2001;75(12):5559-66.
26. Thomas M, Pim D and Banks L. The role E6-p53 in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*.1999;18:7690-7700.
27. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013; 445(1-2):115-37.
28. Pim D, Massimi P, Banks L. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene*.1997;15(3):257-64. PubMed PMID: 9233760.
29. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996; 56(20):4620-4.
30. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25(38):5220-7.
31. Munger K, Basile JR, Duensing S: Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogen*. 2001; 20: 7888–98.
32. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013;445(1-2):169-74.
33. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*.2013;445(1-2):175-86.
34. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res*. 2009 Apr;88(4):307-17.
35. Raff AB, Woodham AW, Raff LM *et al.* The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013 Jun;87(11):6062-72
36. Cullen AP, Reid R, Champion M, *et al.* Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol*. 1991;65(2):606-612.

37. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189(1):12-9.
38. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, *et al.* Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008;68(1):307–313.
39. Gray E, Pett MR, Ward D, *et al.* *In vitro* progression of human papillomavirus 16 episome-associated cervical neoplasia displays fundamental similarities to integrant-associated carcinogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(10):4081–4091.
40. Winder DM, Pett MR, Foster N, *et al.* An increase in DNA double-strand breaks, induced by KU70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and *de novo* viral integration events. *J. Pathol.* 2007;213(1):27–34.
41. Someya M, Sakata K-I, Matsumoto Y, *et al.* The association of DNA-dependent protein kinase activity with chromosomal instability and risk of cancer. *Carcinogenesis.* 2006;27(1):117–122.
42. Chen Wongworawat Y, Filippova M, Williams VM, *et al.* Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes. *Am J Cancer Res.* 2016,15;6(4):764-80.
43. De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses.* 2013; 5(2):708-31.
44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
45. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6(4):391-7.
46. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; 53:401-26.
47. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(1):221-9.
48. Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, *et al.* Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 2003 Feb 14;278(7):4536-41.
49. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med.* 2004, 36:1208-1213.
50. Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:36-44.
51. Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One.* 2009 Aug 11;4(8):e6588.

52. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010; 44(5):479-96.
53. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996, 1;313 (Pt 1):17-29.
54. De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, *et al.* Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One.* 2012; 7(3):e34366.
55. Shim JH, Kim KH, Cho YS, *et al.* Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids.* 2008; 34(1):135-41.
56. Conway M, Alam S, Ryndock E, *et al.* Tissue-spanning redox gradient-dependent assembly of native human papillomavirus type 16 virions. *J. of Virology*; .200910515-10526.
57. Williams VM, Filippova M, Filippov V, *et al.* Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol.* 2014; 88(12):6751-61.
58. Lai D, Tan CL, Gunaratne J, *et al.* Localization of HPV-18 E2 at mitochondrial membranes induces ROS release and modulates host cell metabolism. *PLoS One.* 2013; 8(9):e75625.
59. Pedraza-Chaverrí J, Reyes-Fermín LM, Nolasco-Amaya EG, *et al.* ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol.* 2009; 61(5):491-501.
60. Zielonka J, Kalyanaraman B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(8):983-1001.
61. Kalyanaraman B, Dranka BP, Hardy M, *et al.* HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes—the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(2):739-44.
62. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006; 1(6):3159-65.
63. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.
64. Molina-Jijón E, Zarco-Márquez G, Medina-Campos ON, *et al.* Deferoxamine pretreatment prevents Cr(VI)-induced nephrotoxicity and oxidant stress: role of Cr(VI) chelation. *Toxicology.* 2012; 291(1-3):93-101.
65. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010; 44(5):479-96.
66. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008; 22(3):305-9.
67. Shim JH, Cho KJ, Lee KA, *et al.* E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics.* 2005; 5(8):2112-22.
68. Tang S, Tao M, McCoy JP Jr, *et al.* The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-

- positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol.* 2006; 80(9):4249-63.
69. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89(2):191-9.
 70. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(1):11-22.
 71. Durzynska J, Lesniewicz K, Poreba E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2017;772:36-50
 72. Chiantore MV, Mangino G, Iuliano M, *et al.* Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016; 142(8):1751-63.
 73. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:407052.
 74. Pourquier P, Ueng LM, Fertala J, *et al.* Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J Biol Chem.* 1999, 26;274(13):8516-23.
 75. Daroui P, Desai SD, Li TK, *et al.* Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem.* 2004,9;279(15):14587-94.
 76. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling,vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-606.
 77. Nakamura Y, Ohtaki S, Makino R, *et al.* Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. *J Biol Chem.* 1989;264(9):4759-61.
 78. Marullo R, Werner E, Zhang H, *et al.* HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis.* 2015; 36(11):1397-406.
 79. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene.* 1991; 6(5):873-5.
 80. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, *et al.* p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14(5):833-9.
 81. Visalli G, Riso R, Facciola A, *et al.* Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol.* 2016; 88(2):336-44.

Anexos

Research Paper

Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage

Alfredo Cruz-Gregorio^{1,2}, Joaquín Manzo-Merino³, María Cecilia González-García^{1,2}, José Pedraza-Chaverri⁴, Omar Noel Medina-Campos⁴, Mahara Valverde⁵, Emilio Rojas⁵, María Alexandra Rodríguez-Sastre⁵, Claudia María García-Cuellar², Marcela Lizano^{2,5}✉

1. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México;
2. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, México/Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, México;
3. CONACyT Research Fellow, Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, México;
4. Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México;
5. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, México.

✉ Corresponding author: E-Mail: lizano@unam.mx; Tel.: +52-555-628-0400 (ext. 31035)

© Ivyspring International Publisher. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2017.06.20; Accepted: 2017.10.31; Published: 2018.01.01

Abstract

Oxidative stress has been proposed as a risk factor for cervical cancer development. However, few studies have evaluated the redox state associated with human papillomavirus (HPV) infection. The aim of this work was to determine the role of the early expressed viral proteins E1, E2, E6 and E7 from HPV types 16 and 18 in the modulation of the redox state in an integral form. Therefore, generation of reactive oxygen species (ROS), concentration of reduced glutathione (GSH), levels and activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) and deoxyribonucleic acid (DNA) damage, were analysed in epithelial cells ectopically expressing the viral proteins. Our research shows that E6 oncoproteins decreased GSH and catalase protein levels, as well as its enzymatic activity, which was associated with an increase in ROS production and DNA damage. In contrast, E7 oncoproteins increased GSH, as well as catalase protein levels and its activity, which correlated with a decrease in ROS without affecting DNA integrity. The co-expression of both E6 and E7 oncoproteins neutralized the effects that were independently observed for each of the viral proteins. Additionally, the combined expression of E1 and E2 proteins increased ROS levels with the subsequent increase in the marker for DNA damage phospho-histone 2AX (γ H2AX). A decrease in GSH, as well as SOD2 levels and activity were also detected in the presence of E1 and E2, even though catalase activity increased. This study demonstrates that HPV early expressed proteins differentially modulate cellular redox state and DNA damage.

Key words: Human papillomavirus early-expressed proteins, redox state, ROS, catalase, SOD1/2, GSH, DNA damage.

Introduction

A persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main requirement for cervical cancer development [1], being HPV16 and HPV18 the most prevalent types found in cancer biopsies [2]. E6 and E7 are the main viral oncoproteins that bind to and modulate numerous cellular proteins, resulting in immortalization and transformation.

Among the best-studied interactions, E7 degrades and inactivates pRb, an essential molecule for cell cycle control [3], while E6 oncoprotein binds to and inactivates p53 and PDZ domain-containing proteins [4]. The transcription of E6 and E7 genes is controlled during the viral life cycle through the negative regulation of E2 viral protein [5]. Viral genome

integration into the host genome is considered a key event in cervical cancer progression, which results in the increased expression of the transcripts encoding E6 and E7 oncogenes due to the loss of the E2 open reading frame (ORF) [6, 7].

E1 is an ATP-dependent viral helicase that associates with the origin of replication, inducing the unwinding of the viral DNA [8]. However, this process depends on the activity of E2, which increases specificity of E1 to the origin of replication and improves the replication process [9]. E2 has anti-proliferative functions that inhibit cell growth and induce apoptosis, which is done in part by suppressing the transcription of E6 and E7 and the consequent increase in p53 and pRb proteins [10]. Nevertheless, a role of E2 in cancer development has been suggested, as shown for its ability to induce skin tumour formation in a murine model [11].

The development of cancer is an uncommon outcome in the natural life cycle of HPV and other factors are needed to promote cancer progression [12], such as the immunological status, genetic susceptibility and oxidative stress (OS) [13].

The balance between oxidant and antioxidant molecules has been defined as a redox state. Oxidants, such as reactive oxygen species (ROS), are generated during cell metabolism, inflammation, infections, mechanical and chemical stress or cancer [14]. Physiological ROS production is related to cell signalling, proliferation and differentiation. However, elevated levels of ROS induce OS, which occurs when ROS surpass the effect of antioxidant molecules. When this condition persists, oxidative damage to lipids, proteins or nucleic acids occur, which can lead to cellular processes, such as apoptosis, necrosis or cancer [15]. Antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase (SOD), are critical in the balance of ROS production; free radical scavengers are also involved, such as glutathione [16].

The expression patterns of HPV proteins change in relation to cellular differentiation [17]. These protein patterns could differentially influence the cellular redox state, eventually contributing to cancer development. Thus, the participation of HPV in modulating the redox state has become a topic of interest. It has been shown that E7 oncogene modulates the expression of catalase, B-cell lymphoma extra-large (Bcl-xL), interleukin-8 (IL-8), Fas, Bad and cytochrome C, resulting in resistance to OS-induced cell death in human keratinocyte cells [18]. The E6 small isoform E6* increases OS and induces deoxyribonucleic acid (DNA) damage [19]. Recently, Marrullo and co-workers [20] reported that HPV16 E6 and E7 oncoproteins induce OS and DNA damage in head and neck cancer cells. Lai and

collaborators [21] demonstrated that HPV18 E2 binds to the mitochondrial crest proteins, such as ATP synthase, cytochrome c1 or cytochrome c oxidase subunit II, inducing mitochondrial crest damage and OS. Although some studies support the association of HPV proteins and OS, they focus on the analysis of individual viral proteins. Therefore, our main goal was to explore the redox state and DNA damage in a cervical cell model expressing the early proteins E6, E7, E1 and E2, analysed in an integral fashion. We used the C33A cell line, derived from cervical cancer, which presents a p53 mutation [22]. Despite such mutation, this cell line has proved being a useful epithelial model negative to HPV to reveal functional aspects of HPV proteins [23, 24]. In this study, we found that the HPV early expressed proteins differentially modulate ROS production and DNA damage as a possible consequence of alterations in the expression and activity of the antioxidant enzymes catalase and SOD.

Materials and Methods

Plasmids

The HPV16 and HPV18 E6 open reading frames were cloned into the p3XFLAG-CMV10 vector (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by standard PCR techniques. p3XFLAG-CMV10 vector harbours an ampicillin resistance cassette and a CMV promoter. HPV18 E7 and E1 sequences were cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen) adding at the N-terminus a 5X-histidine tag and a HA tag, respectively. HPV18 E2 expressing plasmid was generated by cloning the E2 coding region into the pcDNA3 vector. pcDNA3 vector harbours an ampicillin resistance cassette and a CMV promoter. Identity of each plasmid was verified by automated sequencing. HA tagged HPV16 E7 expressing plasmid was a kind gift from Dr. Lawrence Banks (ICGEB, Italy).

Cell culture and transfection

C33A cervical cancer derived cell line negative for HPV, was acquired from American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) F12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). For transfection, 280,000 cells were plated in a 60-mm dish and incubated to allow adherence; cells were transfected using PolyFect® (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. For single transfection, 2.5 µg of the indicated plasmid was used, whereas for combined transfection 1.25 µg of each plasmid was used. Forty-eight h after transfection, cells were harvested and processed either for immunoblot, ROS

measurement, GSH quantification, or enzymatic activity analysis. Transfection efficiency was evaluated by immunofluorescence assays by counting one hundred cells, randomly selected, in three different experiments for each condition. Briefly, cells were seeded on slides in a 60-mm dish, then transfected and after 48 h, fixed and stained with primary antibodies diluted in PBS: anti-FLAG (1:50) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for E6 from both HPV types; anti-HA (1:50) (Roche, Basel, Switzerland) for HPV16 E7 and HPV18 E1; anti-HPV18 E7 (1:50) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) for HPV18 E7; or anti-HPV18 E2 (1:50) (Santa Cruz Biotechnologies) for HPV18 E2. After washing with PBS, slides were incubated with Alexa 488 in PBS (1:700) or Alexa 555 in PBS (1:700) secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), when appropriate. After several washes cells were counterstained using DAPI and mounted for fluorescence analysis using the EVOS FL microscope (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Percentage of positive cells was graphed and statistical analysis was performed.

Cell viability

Viability of C33A cells transfected with the different plasmids was assessed by evaluating their lysosomal metabolism using the dual fluorochrome test: carboxyfluorescein diacetate (CFDA, Sigma-Aldrich)/ethidium bromide (Sigma-Aldrich). 48 hours post-transfection, C33A cells were harvested and mixed with a fluorochrome solution containing 0.015 µg/ml of CFDA and 0.02 µg/ml of ethidium bromide; then cells were analysed with a fluorescence microscope (Olympus BX-60), which contains a double filter that detects the fluorescence of both compounds. Green cells were identified as metabolically active or alive, while red cells were identified as dead cells. One hundred cells were randomly selected for each condition in three independent experiments and evaluated. Results are expressed as percentages.

Western blot analysis

Protein extracts were obtained by adding sample buffer to the cells, which were scraped and lysed by pipetting and boiling. Equal amounts of protein were loaded and separated in a SDS-PAGE; then, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and incubated with the proper primary antibody. Membranes were blocked using 7.5% milk in TBS/T buffer. Primary antibodies were prepared in TBS/T buffer as follows: anti-glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH, 1:1000) (Santa Cruz Biotechnologies), anti-SOD2 (1:1000) (Cell Signalling,

Danvers, MA, USA), anti-SOD1 (1:1000) (Cell Signalling), anti-catalase (1:500) (Cell Signalling), anti-γH2AX (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK), anti-H2AX (1:1000) (Upstate, Darmstadt, Germany), anti-His (1:1000) (Cell Signalling), anti-HA (1:1000) (Roche), anti-FLAG M2 (1:2000) (Sigma-Aldrich), and anti-HPV18 E2 (1:1000) (Abcam). Membranes were washed three times with PBS/T and incubated with HRP coupled secondary anti-mouse or rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnologies). Membranes were finally developed using the ChemoLuminiscent Reagent (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) accordingly to the manufacturer's instructions. Densitometric analysis was performed using the ImageJ program ver.1.48h3, National Institutes of Health (NIH).

ROS quantification

ROS production was measured using the fluorescent probe dihydroethidium, DHE, as previously described by Pedraza-Chaverrí *et al.* [25]. DHE is oxidized to 2-hydroxyethidium (2-OH-E⁺) and ethidium (E⁺) in the cytosol by intracellular oxidants, such as superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical ([•]OH), peroxynitrite (ONOO⁻) and peroxides [26, 27]. Due to their DNA binding capacity, both compounds are then retained in the nucleus, with which it is stained. ROS was identified as a red fluorescent signal at the microscope and quantified by fluorometry. Forty-eight h after transfection, 20 µM DHE was diluted in DMEM F12 without phenol red and added to the cells incubating for 30 min at 37 °C. The quantitative data of ROS and cell images were collected through the Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader from Biotek (Winoosky, VT, USA), which combines digital wide field microscopy with a conventional multi-mode microplate, providing high sensitivity in ROS quantification. Thus, cellular ROS production was visualized and measured at 510-560 nm excitation and at 590 nm emission. ROS were visualized and quantified in sixteen different fields per well per condition, in three independent experiments, using Gen5™ 3.0 software (<https://www.biotek.com/products/software-robotics-software/gen5-microplate-reader-and-imager-software/>, Biotek) for data acquisition and analysis.

GSH quantification

Total glutathione (reduced glutathione [GSH] + oxidized glutathione [GSSG]) was evaluated by the enzymatic recycling method described by Rahman *et al.* [28], in which GSH is oxidized by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB, detectable at λ=412 nm) and TNB-glutathione adducts (GS-TNB). Both GS-TNB and

GSSG are reduced by glutathione reductase (GR) in the presence of NADPH, to GSH, which in turn is oxidized by DTNB to TNB. In this manner, the amount of total glutathione calculated in this first step represents the sum of GSH and GSSG.

Next, GSSG was determined by the enzymatic recycling method mentioned above, where samples were previously treated with 2-vinylpyridine (2-VP). 2-VP, that can covalently associate with GSH, to remove all reduced glutathione, leaving the oxidized form of glutathione as the only measurable substrate of the assay. Finally, GSH was calculated by subtracting GSSG from total glutathione (GSH + GSSG).

Briefly, the cell extract of each transfection was diluted with 120 μ l of KPE buffer (0.1 M potassium phosphate, 5 mM disodium EDTA, pH 7.5). Then, two separate samples of 20 μ l each were used to measure either total glutathione or GSSG (these samples were previously treated with 2-VP), mixed with DTNB (2.5 mM) and GR (250 U/ml). Finally, β -NADPH was added and the absorbance at $\lambda=412$ nm was measured at intervals of 60 secs, for 2 min. The rate of change in absorbance for each experiment was compared with GSH or GSSG standards.

Antioxidant enzyme activity assays

The antioxidant enzyme activity was measured as previously described by Molina-Jijón *et al.* [29]. Briefly, SOD activity was spectrophotometrically evaluated at 560 nm based on nitroblue tetrazolium (NBT) reduction to formazan. The level of protein that inhibits NBT reduction to 50% was defined as one unit of SOD activity, comprising the activity of SOD 1 and SOD 2. Catalase activity was assayed at 240 nm by a method based on the decomposition of H_2O_2 by catalase contained in the samples. Units of catalase enzymatic activity are expressed as K/mg protein, as previously described by Aebi [30].

Statistical analysis

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

Results

HR-HPV E6 oncoproteins increase ROS production and decrease GSH levels

The transfection efficiency of the plasmids used in this study (E6, E7 and E6/E7 from HPV16 and 18 and E1, E2 and E1/E2 from HPV18) was evaluated in the C33A cell line, finding an average transfection efficiency of 49% (data not shown). To determine the

influence of HPV16 and HPV18 E6 oncoproteins on the redox state, ROS production and GSH levels were measured. C33A cells transfected with flag-tagged E6 expressing plasmids from HPV types 16 and 18 showed an increase in ROS of 61% and 42%, respectively, compared to cells transfected with p3X control vector (Figure 1A and 1B). No differences were found in the levels of ROS among HPV types. It is known that a natural cellular response to an increment in ROS is its neutralization by antioxidant molecules such as GSH. As a result, GSH is oxidized and its levels decrease as long as ROS increase. Therefore, we evaluated GSH status in C33A cells transfected with plasmids expressing E6 from HPV16 and 18, where a measurable reduction in GSH levels was found (67% and 76%, respectively), compared with the control vector (Figure 1C). We also demonstrated that the observed changes in ROS levels due to the expression of the E6 oncoproteins, had no effect in cell viability as measured by the CFDA/Et-Br assay (Figure 1D).

E6 proteins modulate the levels and activity of antioxidant enzymes

To determine whether E6 affects the antioxidant enzymes catalase and SOD, their levels and activities were evaluated. Figures 2A and B show a remarkable decrease in the catalase protein levels in the presence of E6 from HPV16 (up to 89%) and HPV18 (up to 92%) compared with cells transfected with the control vector. We further analysed if the reduction in protein levels also affected catalase activity. Figure 2C shows a decrease in catalase activity in the presence of E6 proteins from HPV16 (52%) and HPV18 (26%) with no differences among viral types. Afterwards, SOD1 and 2 levels and activity, which are also key antioxidant enzymes implicated in ROS regulation, were measured in the presence of E6 proteins. We did not find differences in SOD1 or 2 protein levels compared with the control cells, as indicated by the immunoblot and densitometric analysis (Fig. 2D, E, F, G). Furthermore, E6 oncoproteins did not modulate SOD activity (Fig. 2H).

E6 oncoproteins induce DNA damage

The presence of high levels of ROS is closely associated with DNA damage since it favours the breakdown of double-stranded DNA [31]. To determine if the increase in ROS induced by E6 oncoproteins could lead to DNA damage, we measured the phosphorylated form of the histone variant H2AX (γ H2AX), a proficient biomarker for double-stranded DNA breaks [32]. We found that the γ H2AX/H2AX ratio increased 2.2- and 2.3-fold in cells expressing E6 oncoproteins from HPV16 and 18,

respectively, compared to cells transfected with the control plasmid, p3X (Fig. 3), which was associated with the increase in ROS.

HPV E7 oncoproteins reduce ROS levels and increase GSH levels

It has previously been demonstrated that the HPV16 E7 oncoprotein induces the expression of catalase and a decrease in ROS levels [33]. Therefore, we were interested in analysing the effect of E7 from both HPV16 and HPV18 in ROS production in the C33A cell line. Our results, demonstrated that E7 from HPV16 and 18 reduced the levels of ROS in 60% and 42%, respectively, compared to control transfected cells (Fig. 4A and 4B). Regarding GSH, we found that E7 from HPV16 and 18 increased GSH levels in 3 and 2.4-fold in C33A transfected cells, respectively (Figure 4C). C33A cell viability did not show any change in E7 transfected cell, in comparison with the p3X control vector (Figure 4D).

E7 oncoproteins change the levels and activity of antioxidant enzymes

In contrast to the effect of E6 oncoproteins, ROS production decreased in cells expressing E7, as depicted in Figure 4; hence, we wondered if E7 could also affect catalase and SOD levels and their activities. C33A cells, transfected with HPV16 and 18 E7

expressing plasmids, exhibited 3.4- and 3.2-fold enrichment in catalase protein levels, respectively (Fig. 5A, B), with an increase in catalase activity of 46% and 40%, correspondingly (Fig. 5C). Additionally, SOD1 protein levels decreased in 37% and 52% in cells carrying E7 from HPV16 and 18, respectively (Fig. 5D, E). However, the levels of SOD2 did not change, as demonstrated by Western blot analysis (Fig. 5F, G). Meanwhile, SOD1/2 enzymatic activity decreased in 50% in the presence of E7 from HPV16 and 27% for HPV18 (Fig. 5H). Since E7 decreased ROS levels, as expected the γ H2AX levels were not altered in the presence of E7 from either HPV type 16 or 18 as shown in Figure 6.

The combined expression of E6 and E7 does not affect ROS production

We demonstrated that the redox status of C33A cells is modulated by E6 and E7 with opposite effects (Figs. 1 and 4). It is worth noting that during an HPV infection, E6 and E7 oncoproteins are simultaneously expressed when translated from a single bicistronic E6-E7 transcript [34]. Therefore, we analysed the effect of the combined expression of E6 and E7 on redox regulation. E6 expressing plasmids were co-transfected together with tagged versions of E7 from both HPV16 and 18. Our results show no differences in either ROS production or GSH levels or

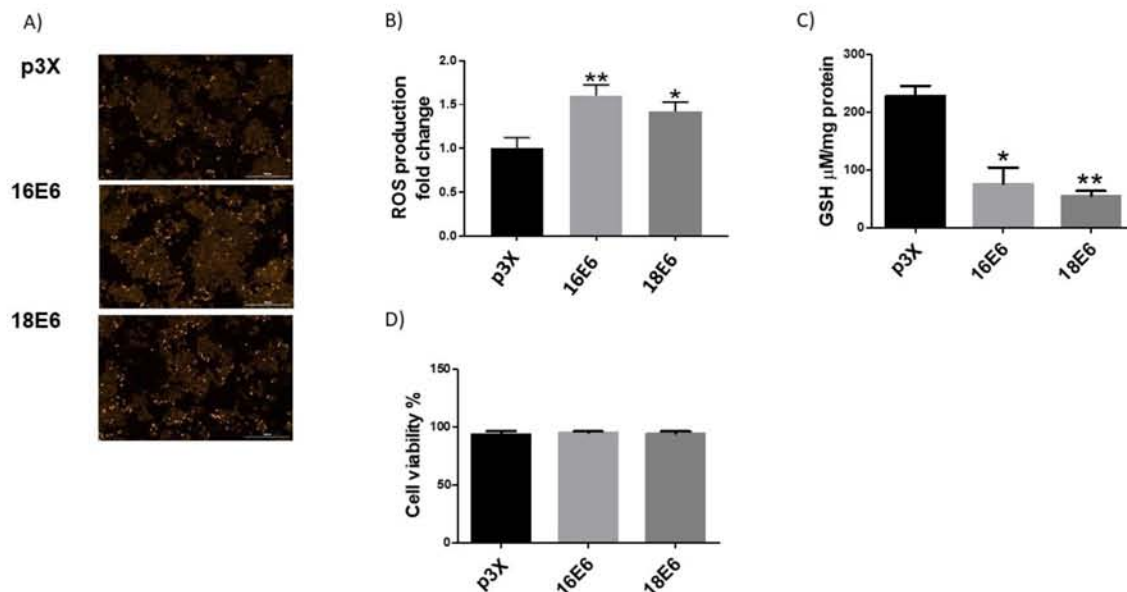


Figure 1. Human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins increase the production of reactive oxygen species (ROS) and GSH in C33A cells. Representative images (A) and quantitative data (B) of ROS induced by E6 from HPV types 16 and 18. Quantitative data were obtained 48 hours after transfection in cells expressing E6 from each viral type, comparing with p3X transfected cells as control. The mean intensity of ethidium fluorescence was measured in 16 different fields per well per condition using Gen5™ 3.0 software for image acquisition and quantification. E6 decreased GSH (C) and did not change C33A cell viability in comparison with the control vector (D). The fluorescence intensity, GSH levels and cell viability are expressed as the mean±SD. Tukey's test *p<0.05 and **p<0.005 vs control (p3X), n=3.

cell viability when cells simultaneously expressed E6 and E7 oncogenes from each viral type, compared to the control (Fig. 7A, B, C, D). Additionally, catalase levels and activity did not show any change when both oncogenes were co-expressed (Fig. 8A, B, C). Among the antioxidant enzymes tested, SOD1 protein levels decreased in 63% and 67% in the presence of both oncoproteins E6/E7 from HPV16 and 18, respectively (Fig. 8D, E); in contrast, SOD2 remained unchanged (Fig. 8F, G). A decrease in SOD activity was also found when E6 and E7 were expressed together (Fig. 8H), although γ H2AX levels did not change (Fig. 9A, B).

E1 and E2 co-expressed proteins increase ROS levels and decrease GSH levels

We further analysed the effect of HPV E1 and E2

proteins in the redox state. Since such viral proteins are highly conserved among HPV types [8, 35], we tested E1 and E2 from HPV type 18.

ROS levels were evaluated in cells transfected with HA-tagged E1 and E2 expressing plasmids. Figure 10 shows that while E1 did not affect this parameter, E2 increased ROS in 36%. Interestingly, the combined expression of E1 and E2 proteins showed a 46% increase in ROS compared to the control cells (Fig. 10A, B). We measured GSH in C33A cells expressing E1, E2 and E1/E2, finding a measurable decrease in GSH levels in 50%, 68% and 57%, respectively (Figure 10C). No changes in viability were found in cells expressing E1, E2 or E1/E2 (Figure 10D).

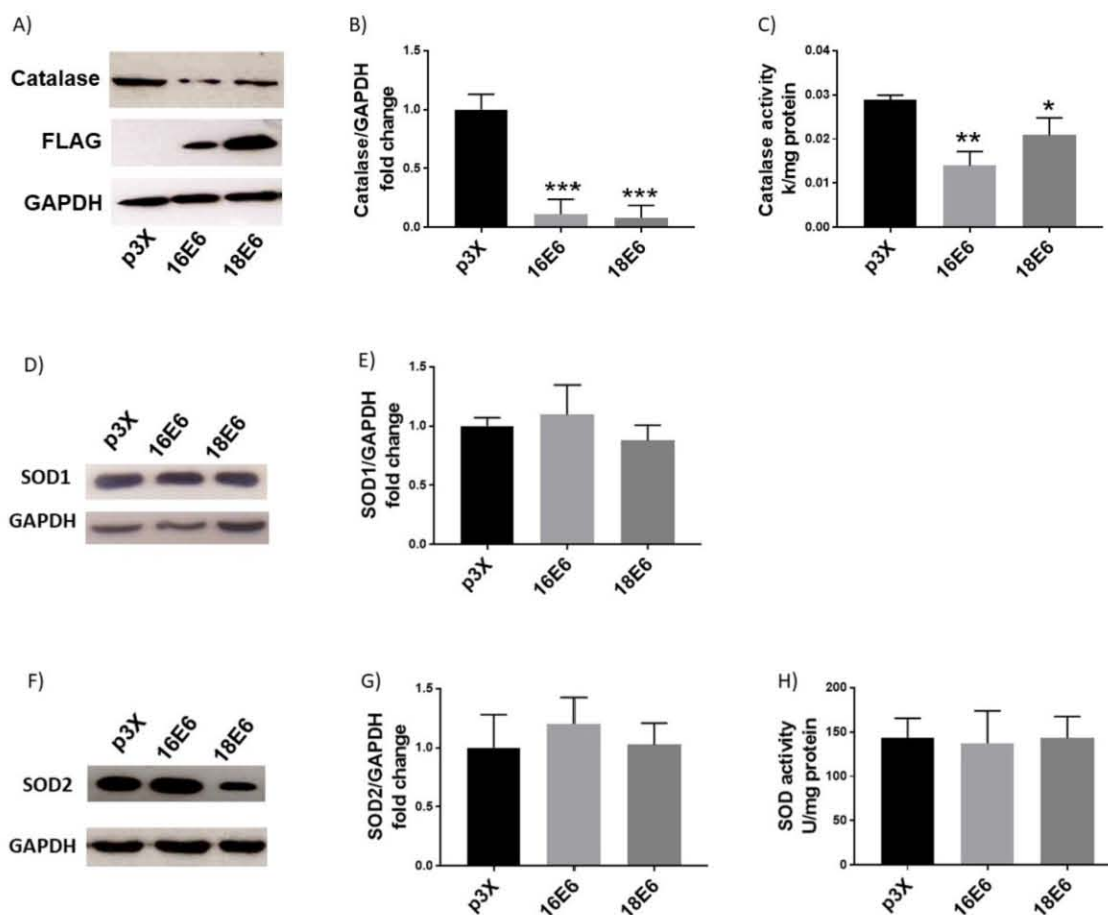


Figure 2. Human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins decrease catalase protein levels and activity and do not affect SOD1/2 levels or activity. Representative immunoblot (A) and quantitative densitometric (B) showing E6 expression and catalase protein levels in C33A cells after 48 hours of transfection with Flag-tagged HPV16 E6 or HPV18 E6 and p3X vector; glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Catalase enzymatic activity in C33A transfected cells expressing HPV16 or 18 E6 oncoproteins (C). Representative immunoblot (D) and densitometric analysis (E) of superoxide dismutase (SOD) 1 in C33A transfected cells transfected; GAPDH was used as a loading control. Representative immunoblot (F) and densitometric analysis (G) of SOD2 expression, in relation to GAPDH. SOD enzymatic activity in C33A transfected cells (H). Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * p <0.05, ** p <0.005, and *** p <0.0005 vs p3X control, n =3.

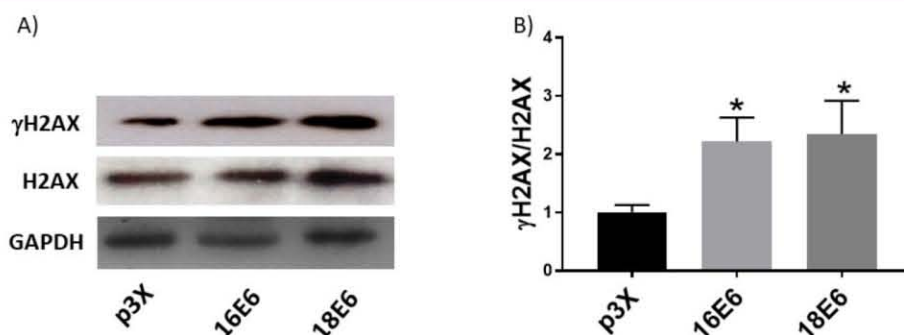


Figure 3. Human papillomavirus (HPV) E6 oncoproteins increase DNA damage in C33A cells. Representative immunoblots (A) showing total H2AX and γ H2AX in C33A cells 48 hours after transfection with Flag-tagged HPV16 E6, HPV18 E6 and p3X vector. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Densitometry of γ H2AX and H2AX proteins (B). Data are expressed as the ratio of relative units between γ H2AX and H2AX. Data are shown as the mean \pm SD. Tukey's test * p <0.05 vs p3X control. n=3.

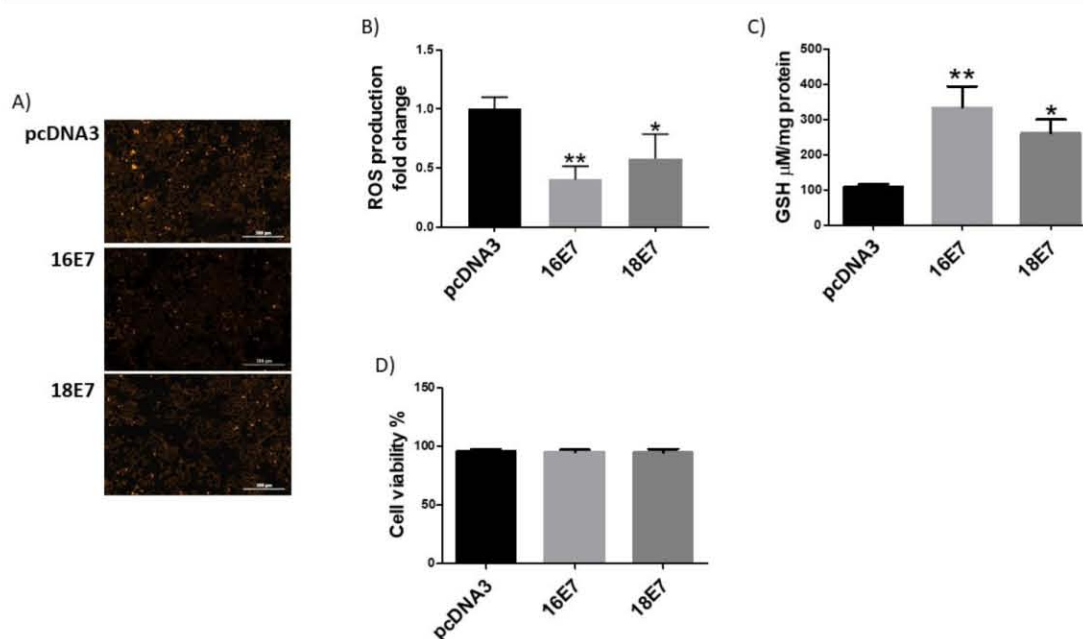


Figure 4. Human papillomavirus (HPV) E7 oncoproteins decrease reactive oxygen species (ROS) and increase GSH in C33A cells. Representative images (A) and quantitative data (B) of ROS levels in HA-tagged HPV16 E7, HIS-tagged HPV18 E7 and control pcDNA3 expressing cells. Quantitative data were obtained 48 hours after transfection. The mean intensity of ethidium fluorescence was measured in 16 different fields per well per condition using Gen5™ 3.0 software for image acquisition and quantification. HPV 16 and 18 E7 increase GSH (C) without affecting cell viability (D), in comparison with pcDNA3 transfected cells. The fluorescence and GSH quantification and cell viability are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * p <0.05 and ** p <0.005 vs control (p3X), n=3.

E1 and E2 increase catalase activity

We next evaluated whether E1 and E2 proteins could affect the antioxidant enzyme levels or activity. We performed transient transfection of C33A cells with plasmids encoding HA-tagged E1 and E2 from HPV18. Figure 11A, B show that catalase levels were not affected by the presence of HPV18 E1 and E2, either singly transfected or combined. Nevertheless, when measuring catalase activity, we found an

increase of approximately 1.9-fold for the tested conditions (Fig. 11C). Furthermore, we evaluated whether E1 and E2 affected SOD1 and SOD2 protein levels and activities. As depicted in figure 11D, E, SOD1 levels decreased in the presence of E2 in 71% or E1/E2 in 88%. Meanwhile, SOD2 levels decreased in 67% for E1, 73% for E2 and 72% for E1/E2 (Fig. 11F, G). Moreover, the presence of E1 decreased SOD activity in 61%, E2 in 44% and E1/E2 in 62% (Fig. 11H).

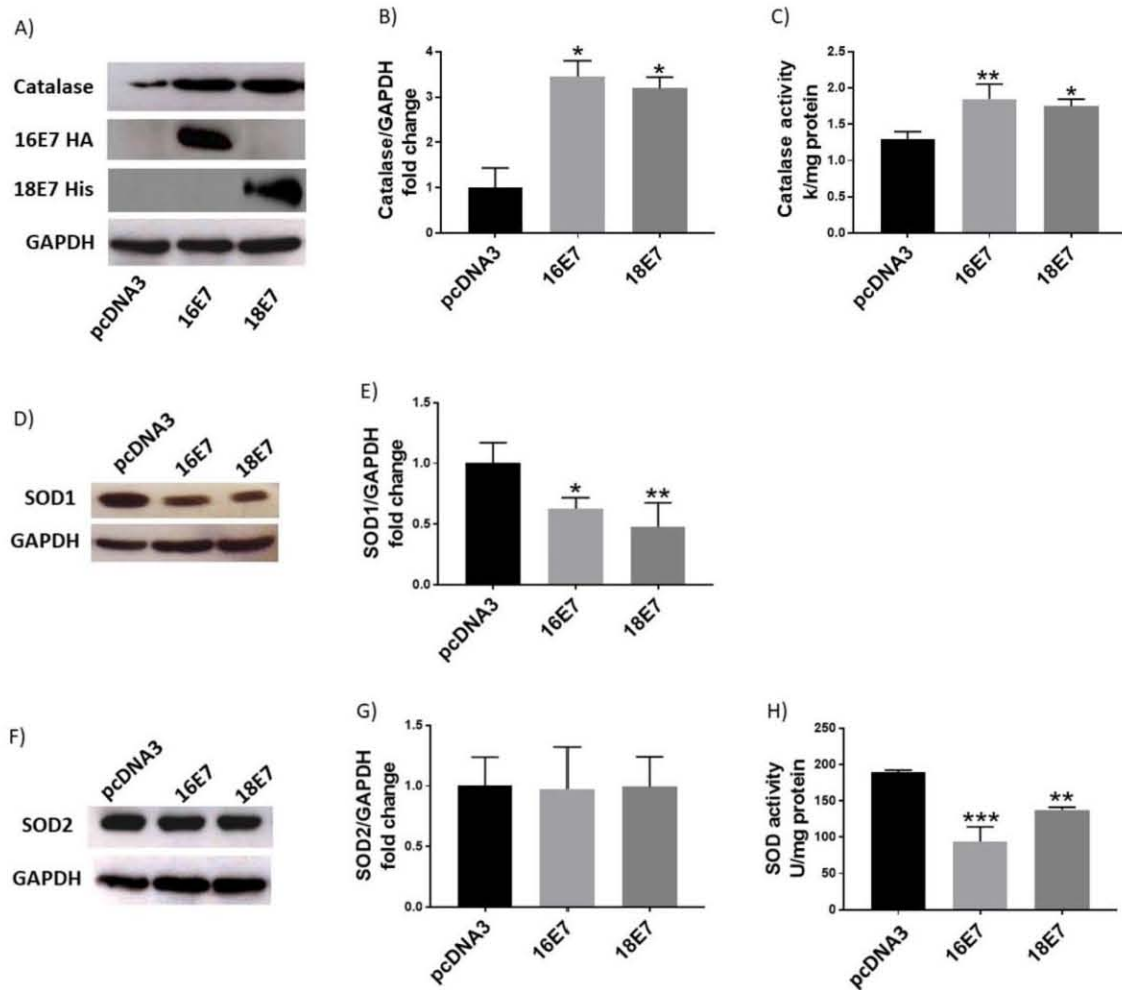


Figure 5. Human papillomavirus (HPV) E7 oncoproteins increase catalase protein levels and activity and decrease SOD1 protein levels and SOD activity. Representative immunoblot (A) and densitometric analysis (B) of catalase levels in C33A cells 48 hours after transfection with HA-tagged HPV16 E7, HIS-tagged HPV18 E7 or control pcDNA3 plasmids. Catalase enzymatic activity in cells harbouring HPV E7 oncoproteins (C). Representative immunoblot of SOD1 and SOD2 (D, F) and respective densitometric analysis (E, G) in C33A transfected cells. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. SOD enzymatic activity in C33A transfected cells is shown (H). Data is expressed as the mean±SD, Tukey's test *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.005 vs pcDNA3 control (pcDNA3), n=3.

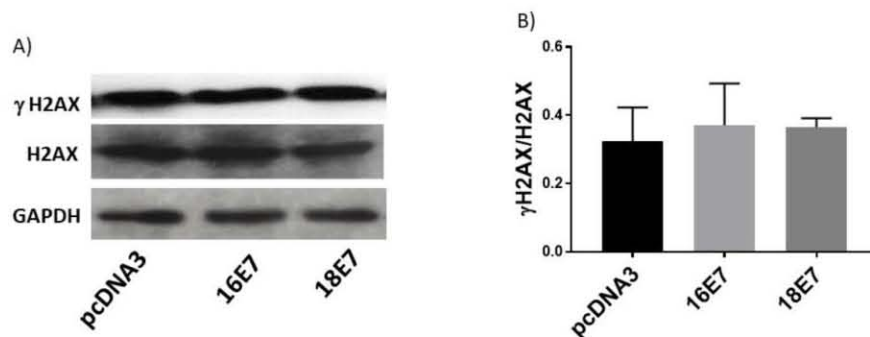


Figure 6. Human papillomavirus (HPV) E7 oncoproteins do not alter phospho-histone 2 AX (γH2AX) protein levels. Representative immunoblot of total H2AX and γH2AX (A) and densitometric analysis (B) of the ratio γH2AX/H2AX in C33A cells 48 h post-transfection. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Data are expressed as the ratio of relative units between γH2AX and H2AX. Data are presented as the mean±SD, n=3.

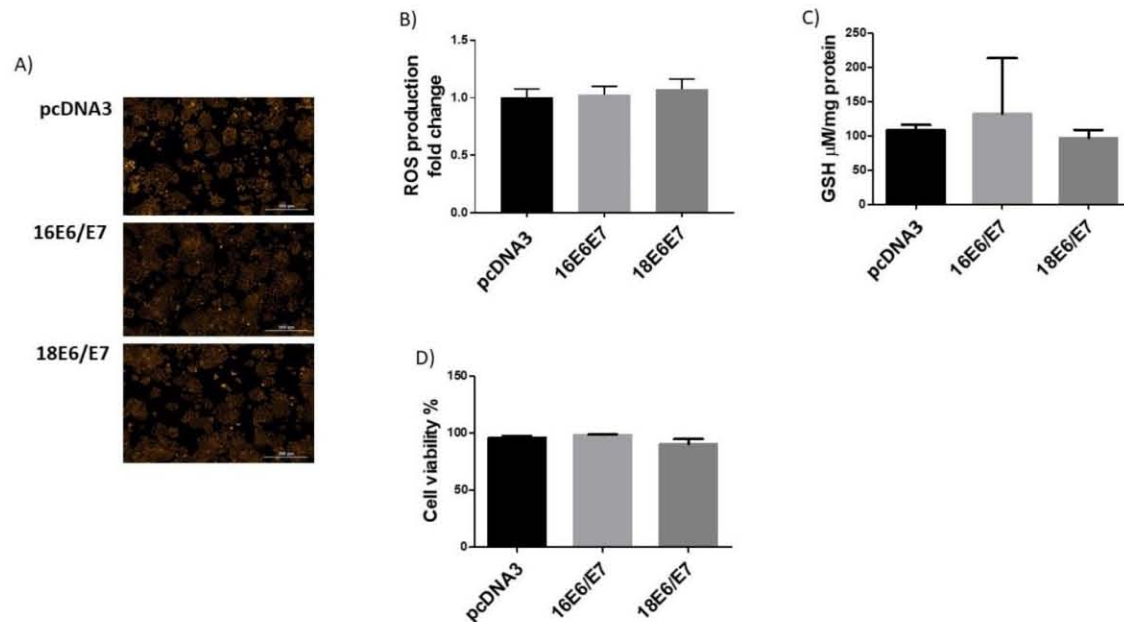


Figure 7. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 co-expressed oncoproteins do not alter the production of reactive oxygen species (ROS) neither GSH levels in C33A cells. Representative images (A) and quantitative data (B) of ROS levels in HPV16 E6/E7, HPV18 E6/E7 and control pcDNA3 transfected cells. GSH levels were not altered in the presence of E6/E7 oncoproteins from HPV16 and 18 (C). C33A viability is similar in cells expressing E6/E7 oncoproteins in comparison with cells transfected with the control vector (D). Data are presented as the mean \pm SD, n=3.

The combined expression of E1 and E2 proteins induces DNA damage

Finally, we evaluated whether E1, E2 or E1/E2 protein expression could induce DNA damage, as measured through the γ H2AX levels. We found that only the combined expression of E1 and E2 increased the ratio of γ H2AX/H2AX (4.3-fold) above the control cells (Fig. 12A, B).

Discussion

Oxidative stress has been proposed as a critical factor in triggering cervical cancer due to DNA damage induced by different reactive species, which increases the probability to produce HPV genome integration [36], frequently resulting in a disruption of the E2 open reading frame and subsequent over-expression of the E6 and E7 oncoproteins [37]. Therefore, the mechanism by which OS probably induces the integration of the HPV genome into the cellular genome is now a subject of investigation. To determine whether HPV E6, E7, E1 and E2 early expressed proteins modulate cellular redox state and its implication in DNA damage, we conducted a series of experiments to measure the impact of these proteins in redox regulation.

It was demonstrated that E6 from HR-HPV increased ROS production. ROS production begins when O_2 is reduced to O_2^- by different cellular processes, becoming poisonous when it accumulates in the cells. Consequently, cells express antioxidant enzymes, such as SOD1/2 and catalase, glutathione peroxidase (GPx) and thioredoxin (TRx), and non-enzymatic antioxidants, such as glutathione and vitamins (A, C, E), which represent the whole antioxidant barrier [15]. In this study, we found a GSH depletion associated to ROS increase in the presence of E6. This condition could involve the regulation of catalase or SOD, which are potent antioxidant enzymes regulating OS. We demonstrated that catalase levels decreased in the presence of E6 from HR-HPV. Considering that enzyme levels do not necessarily reflect its antioxidant activity, we measured catalase activity in the presence of E6, finding a decrease due to this oncoprotein. One possible explanation of such catalase down-regulation could be an effect of epigenetic changes, such as the modulation of miRNAs by E6 oncoprotein [38, 39], although further studies are needed to determine the mechanisms by which HPV proteins modulate the redox state.

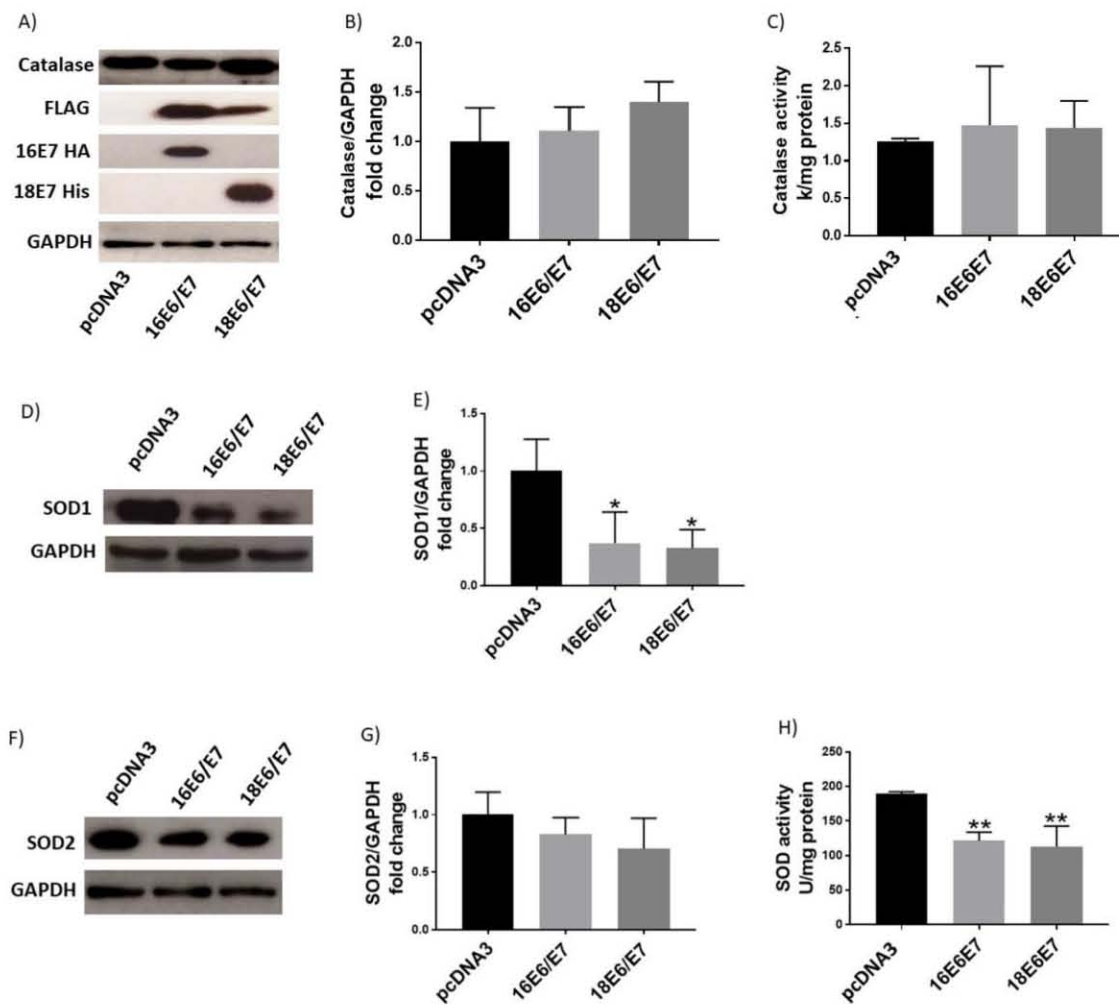


Figure 8. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 co-expressed oncoproteins decrease SOD1 protein levels and SOD activity. Representative immunoblot (A) and densitometric analysis (B) of catalase in C33A cells. Catalase enzymatic activity in transfected cells (C). Immunoblot and densitometric analysis of SOD1 (D, E) and SOD2 (F, G). SOD enzymatic activity (H) in C33A transfected cells. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Data are presented as the mean±SD. Tukey's test *p<0.05 and **p<0.005 vs control (p3X), n=3.

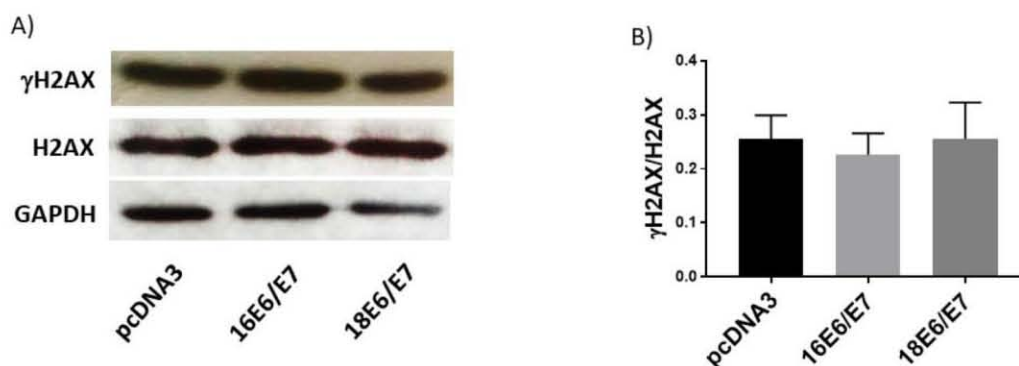


Figure 9. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 co-expressed oncoproteins do not affect DNA integrity in C33A cells. Immunoblot of gammaH2AX, H2AX (A) and densitometric analysis (B) of gammaH2AX in relation to H2AX. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Data are expressed as the ratio of relative units between gammaH2AX and H2AX. Data are presented as the mean±SD, n=3.

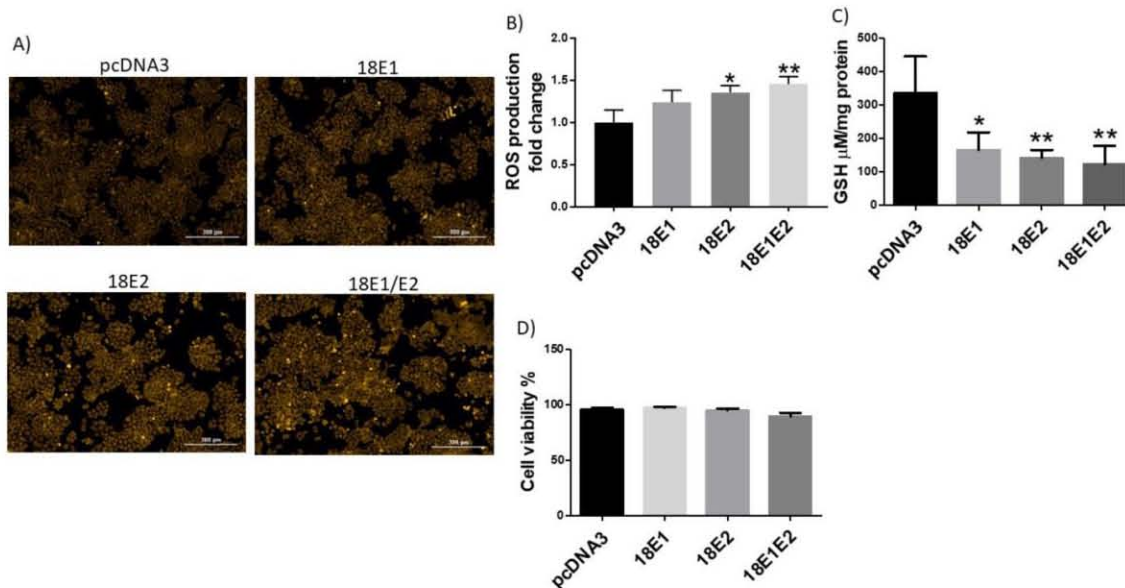


Figure 10. Human papillomavirus (HPV) E1/E2 proteins increase the production reactive oxygen species (ROS), while GSH is decreased in the presence of E1, E2 or E1/E2 in C33A transfected cells. Representative images (A) and quantitative data (B) of ROS levels in cells transfected with HPV18 E1, HPV18 E2, HPV18 E1/E2 or pcDNA3 control. Quantitative data were obtained at 48 h post-transfection. The mean intensity of ethidium fluorescence was measured in 16 different fields per well per condition using Gen5™ 3.0 software for image acquisition and quantification. Presence of GSH (C) and viability (D) in C33 transfected cells. Data are expressed as the mean \pm SD. Tukey's test * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ vs control (pcDNA3). $n = 3$.

In contrast, SOD1/2 levels or activity were not modified by E6. Some reports have shown that HPV16 E6*, a spliced isoform of E6, increases ROS and DNA damage in the osteosarcoma derived cell line U-2 OS, associated to a decrease in SOD2 protein levels [19]. In the present study, no changes were found in SOD1 or SOD2 protein levels and activity when E6 proteins from both HPV types were ectopically expressed. It should be considered that when wild type E6 is expressed, both full-length E6 and E6* are produced, making it possible that independent effects of E6* could be hidden in the presence of full-length E6.

It is well known that persistent ROS levels promote double-stranded DNA breakdown [31]; therefore, we sought to determine the effect of E6 on γ H2AX, a proficient biomarker for DNA damage [32]. Our data showed that E6 from both viral types increased γ H2AX, suggesting that the effect exerted by E6 on DNA damage is somehow due to a reduction in catalase levels and activity, resulting in an increase in ROS.

In contrast to E6, we found that E7 from HPV16 and 18 decreased ROS, which was associated with an increase in the levels and enzymatic activity of catalase. Our results agree with those reported by Shim *et al.* [33], who showed a similar effect for HPV16 E7 in HaCaT cells, an immortalized keratinocyte cell model. Moreover, we also found that the presence of E7 decreased OS, avoiding DNA damage,

as could be reflected by the γ H2AX marker (Figure 6).

Interestingly the co-expression of E6 and E7 did not change ROS levels nor induced DNA damage. Regarding the tested antioxidant enzymes, the individual effect of E6 oncoprotein on catalase seems to be neutralized by E7. Since the combined expression of E6/E7 exclusively decreased SOD1, but not SOD2 levels, it is possible that the reduction in SOD activity is exclusively related to SOD1, as seen in Figure 5. These pieces of evidence suggest that the DNA damage induced by E6 is somehow avoided by the protective effect granted by E7. In contrast to the data obtained by Marrullo and co-workers in a head and neck cancer model [20], we did not find an increase in OS or evidence of DNA damage when both, E6 and E7 proteins, were expressed. It is possible that the cellular context used in this study somehow influences the different actions for E6 and E7 oncoproteins. Indeed, in this work C33A cells were used, which are characterized by a p53 protein mutated in its DNA binding motif, thus lacking its transcriptional functions [22]. It is worth to notice that Shim *et al.* also found an increase in catalase levels due to E7, when using a p53 mutated model [33, 40]. Thus, it is possible that our findings might be p53-independent; although different effects of the HPV proteins, regarding cellular redox, could be found in distinct cell contexts, including a functional p53, which deserves further studies.

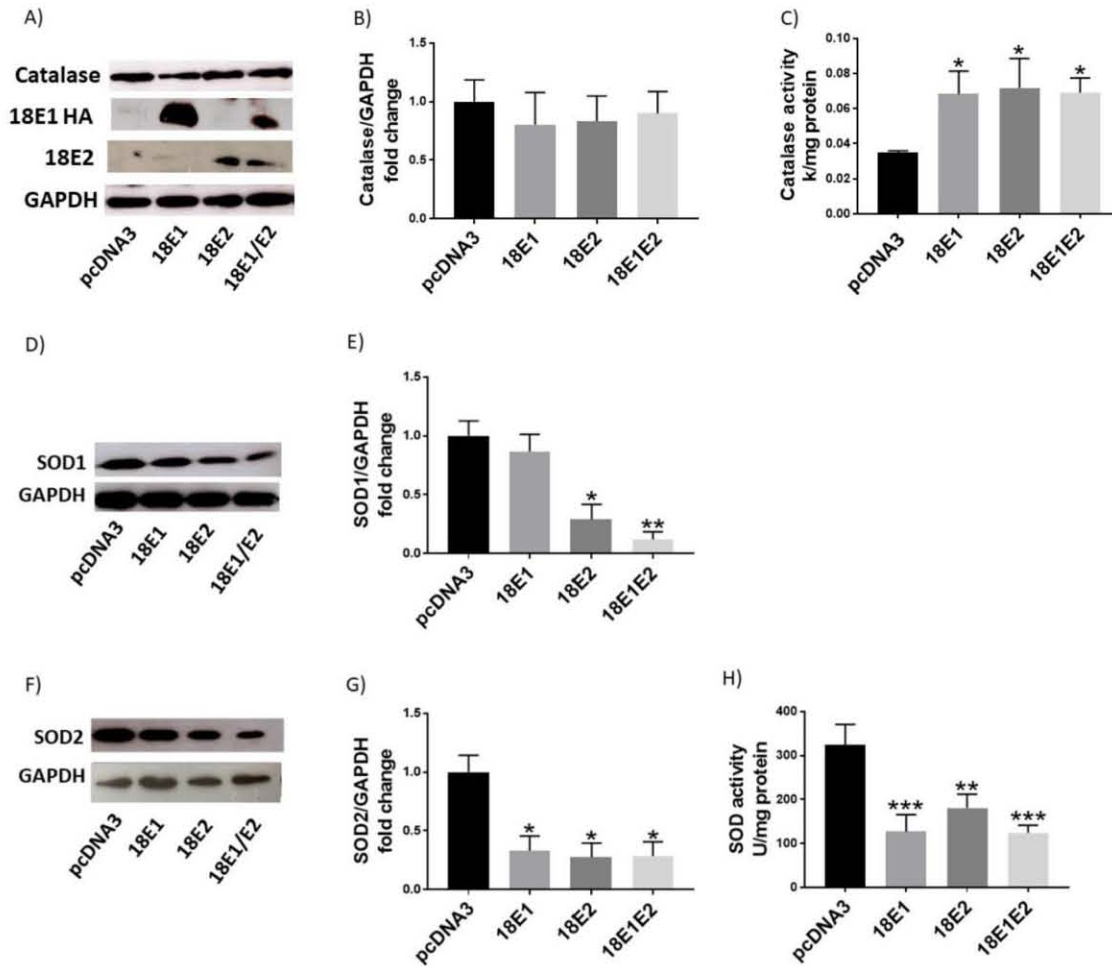


Figure 11. Human papillomavirus (HPV) E1, E2 and E1/E2 increase catalase activity, while SOD1 and SOD2 protein levels and SOD activity decrease. Representative immunoblot (A) and densitometric analysis (B) of catalase levels in C33A cells transfected with HA-tagged HPV18 E1, HPV18 E2, HPV 18 E1/E2 or control pcDNA3 plasmids 48 hours after transfection. Catalase enzymatic activity in C33A transfected cells (C). Representative immunoblot of SOD1 (D) and SOD2 (F) and densitometric analysis of SOD1 (E) and SOD2 (G) levels in C33A cells transfected with HA-tagged HPV18 E1, HPV18 E2, HPV 18 E1/E2 or control pcDNA3 plasmids. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. SOD enzymatic activity in C33A transfected cells (H). Data are presented as mean±SD. *p<0.05, **p<0.005, and ***p<0.0005 vs control (pcDNA3). n=3.

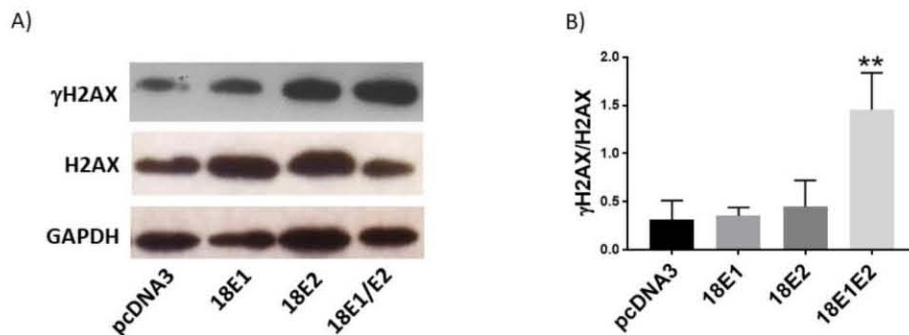


Figure 12. Human papillomavirus (HPV) 18 E1/E2 promote DNA damage in C33A transfected cells. Representative immunoblot (A) and densitometric analysis (B) of γ H2AX and H2AX proteins. Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. Data are expressed as the ratio of relative units between γ H2AX and H2AX at 48 hours post transfection and presented as the mean±SD. Tukey's test **p<0.005 vs pcDNA3 control. n=3.

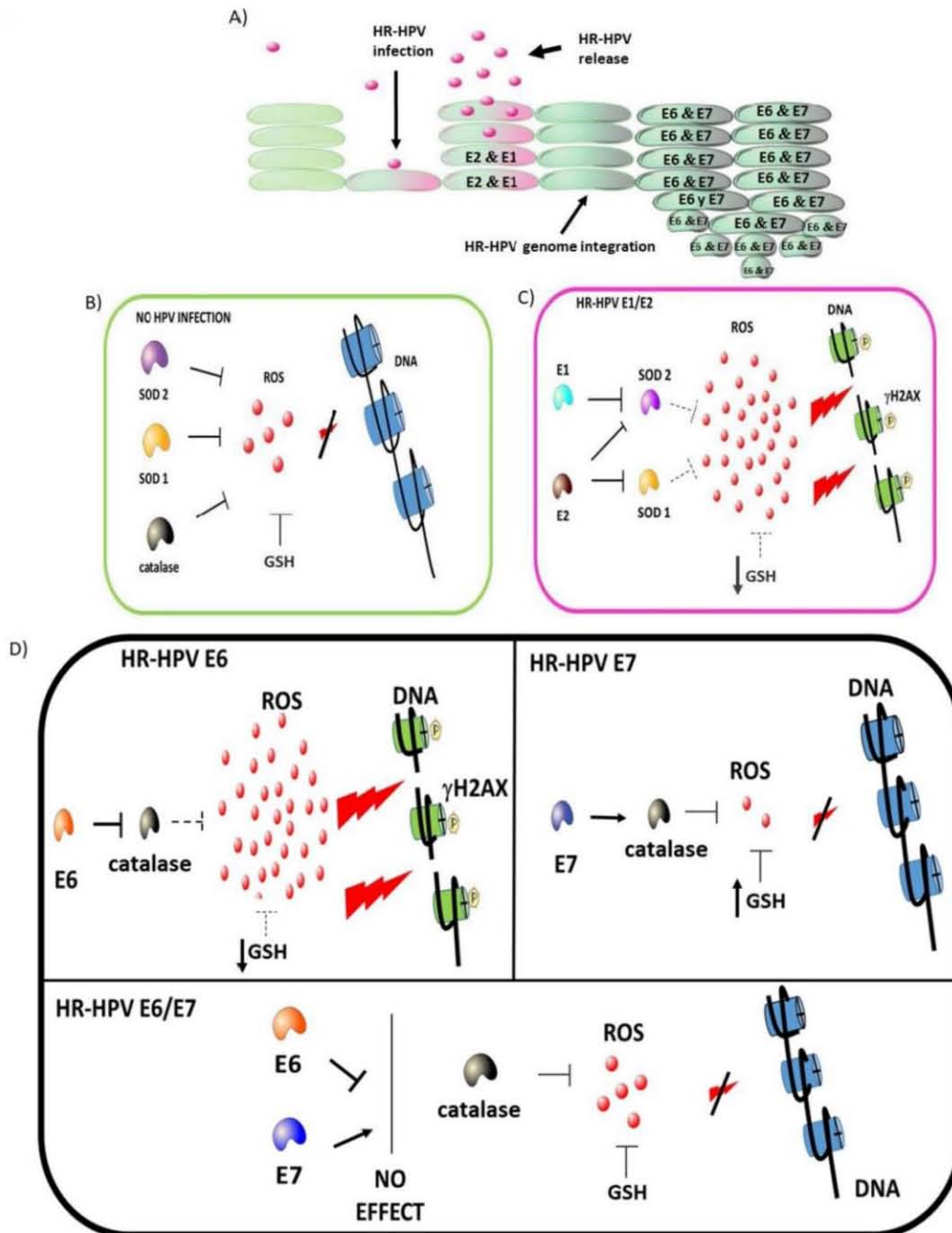


Figure 13. High-risk human papillomavirus (HR-HPV) early expressed proteins differentially modulate the redox state. HPV infects epithelial cells, inducing genome replication and virion production as part of the viral life cycle. High levels of E1 and E2 proteins are expressed during the early stages of an HPV infection. Once integration occurs, E6 and E7 accumulate with the subsequent cellular changes driving to cancer development (A). In non-infected cells, ROS production is controlled by GSH, SOD1/2 and catalase avoiding DNA damage (B). In HPV-infected cells, E1 plus E2 decrease SOD 1/2 expression (dot line), increasing ROS, which is associated to a depletion in GSH and the induction of DNA damage (C). In HPV-transformed cells, the E6 oncoprotein increases the levels of ROS and induces DNA damage by decreasing GSH and catalase. In contrast, the E7 oncoprotein decreases ROS levels due to the increase of catalase and GSH, while DNA damage is not induced. Meanwhile, in the presence of both E6 and E7 oncoproteins, the effect of E7 avoids the E6-driven DNA damage (D).

Additionally, we determined the influence of E1 and E2 proteins on cellular redox state. Lai et al. [21]

showed that the E2 from HPV18 induced ROS in HaCaT cells, with no apoptotic effect, which was

associated to a modification of the mitochondrial crests. In agreement with such data, we found that E2 from HPV18 did not affect cell viability, while an increase in ROS generation in C33A cells was promoted. Moreover, HPV18 E1 plus E2 increased ROS production, while E1 separately did not. The observed increase in ROS levels could be due to the action of E2 protein on the mitochondrial crests as well as to the modulation of SOD1/2 levels and activity, as we found. The SOD1 levels only decreased in the presence of E2 and E1/E2, but not with E1 alone. Furthermore, we found that E1 and E2 alone or together increased catalase activity. It is feasible that the increase in ROS found in the presence of E2 and E1/E2 is mainly due to the ability of E2 to induce modifications in mitochondrial crests along with a decrease in SOD activity. Moreover, the increase in ROS was associated with DNA damage only in E1/E2 co-expressing cells, indicating an additive effect of both proteins. Our results are consistent with Sakakibara et al. [41], who demonstrated that E1 plus E2 induce DNA damage, in foci that possibly represent viral replication factories. Nevertheless, it is still necessary to determine whether the increase in ROS induced by E1 and E2 is implicated in the viral replication process.

The increase in OS and DNA damage in C33A cells due to E1/E2 could resemble the results obtained by De Marco et al. [42] and Visalli et al. [43], who demonstrated the presence of high levels of ROS and DNA damage in dysplastic tissues, where it is known that E1 and E2 are highly expressed. Our results also show that the co-expression of E6/E7 oncogenes produced a balance in the redox state, which could partially explain the reduction of ROS with no DNA damage in cancer tissues, where E6 and E7 are overexpressed. Our data suggest that the early expressed HPV proteins tightly regulate OS, which could be a critical event in the establishment of an HPV persistent infection and/or in the development of cervical cancer.

In summary, this study shows that E1, E2, E6 and E7 early-expressed proteins from HR-HPV differentially modulate ROS production and DNA damage, which is due in part to the antioxidant modulation exerted by GSH, SOD1, SOD2 and catalase, impacting in the cellular redox state, which could influence the outcome of an HPV infection. Figure 13 shows a proposed model for the role of the early expressed HPV proteins on the modulation on cellular redox state.

Acknowledgments

This research was partially supported by CONACyT grant 261499, PAPIIT-UNAM grant

IN206214 and Instituto Nacional de Cancerología, México. Alfredo Cruz-Gregorio is a Ph.D. student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, and wants to thank CONACyT for supporting his Ph.D. studies 240039 and PAEP-UNAM.

Author contributions

All of the authors listed made substantial contributions to the manuscript and qualify for authorship, and no authors have been omitted. Conception and design: Marcela Lizano; development of methodology and acquisition of data: Alfredo Cruz-Gregorio, María Cecilia González-García, Omar Noel Medina-Campos, María Alexandra Rodríguez-Sastre; analysis and interpretation of data: Alfredo Cruz-Gregorio, Joaquín Manzo-Merino, Marcela Lizano, Mahara Valverde, Emilio Rojas; writing and revision of the manuscript: Alfredo Cruz-Gregorio, Marcela Lizano, Joaquín Manzo-Merino, José Pedraza-Chaverri, María Alexandra Rodríguez-Sastre, Claudia María García-Cuéllar.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189(1):12-9.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):1-17.
- Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996; 56(20):4620-4.
- Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 1999; 18(53):7690-700.
- Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology.* 2009; 384(2):375-9.
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, *et al.* HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002; 67(4):574-82.
- Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(7):3159-63.
- Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology.* 2013; 445(1-2):35-56.
- McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013; 445(1-2):57-79.
- Desaintes C, Demeret C, Goyat S, *et al.* Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* 1997; 16(3):504-14.
- Pfefferle R, Marcuzzi GP, Akgül B, *et al.* The human papillomavirus type 8 E2 protein induces skin tumors in transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(9):2310-5.
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002; 89(2):191-9.
- Foppoli C, De Marco F, Cini C, *et al.* Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(8):1622-32.
- Darr D, Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 1994; 102(5):671-5.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
- Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997; 6(4):391-7.

17. Doorbar J, Quint W, Banks L, *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30(5):F55-70.
18. Shim JH, Kim KH, Cho YS, *et al.* Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncogene. *Amino Acids*. 2008; 34(1):135-41.
19. Williams VM, Filippova M, Filippov V, *et al.* Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol*. 2014; 88(12):6751-61.
20. Marullo R, Werner E, Zhang H, *et al.* HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis*. 2015; 36(11):1397-406.
21. Lai D, Tan CL, Gunaratne J, *et al.* Localization of HPV-18 E2 at mitochondrial membranes induces ROS release and modulates host cell metabolism. *PLoS One*. 2013; 8(9):e75625.
22. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene*. 1991; 6(5):873-5.
23. Hwang SG, Lee D, Kim J, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*. 2002; 277(4):2923-30.
24. Vaisman CE, Bonilla-Moreno R, Villegas-Septúveda N. Analysis of the Expression of E6*E7, a Short Splicing Variant of HPV-16-E6 in the HPV Negative Cervical Carcinoma Cells C33-A. *FASEB J*. 2017; no. 1 Supplement 1b163.
25. Pedraza-Chaverri J, Reyes-Fermin LM, Nolasco-Amaya EG, *et al.* ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of alpha-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Exp Toxicol Pathol*. 2009; 61(5):491-501.
26. Zielonka J, Kalyanaram B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48(8):983-1001.
27. Kalyanaram B, Dranka BP, Hardy M, *et al.* HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes—the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(2):739-44.
28. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006; 1(6):3159-65.
29. Molina-Jijón E, Zarco-Márquez G, Medina-Campos ON, *et al.* Deferoxamine pretreatment prevents Cr(VI)-induced nephrotoxicity and oxidant stress: role of Cr(VI) chelation. *Toxicology*. 2012; 291(1-3):93-101.
30. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-6.
31. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010; 44(5):479-96.
32. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*. 2008; 22(3):305-9.
33. Shim JH, Cho KJ, Lee KA, *et al.* E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics*. 2005; 5(8):2112-22.
34. Tang S, Tao M, McCoy JP Jr, *et al.* The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*1 transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol*. 2006; 80(9):4249-63.
35. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, *et al.* Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1):17-27.
36. De Marco F. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses*. 2013; 5(2):708-31.
37. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(8):550-60.
38. Chiantore MV, Mangino G, Iuliano M, *et al.* Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the expression of cancer-related microRNAs: additional evidence in HPV-induced tumorigenesis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; 142(8):1751-63.
39. Gómez-Gómez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:407052.
40. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, *et al.* p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*. 1993; 14(5):833-9.
41. Sakakibara N, Mitra R, McBride AA. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol*. 2011; 85(17):8981-95.
42. De Marco F, Bucaj E, Foppoli C, *et al.* Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One*. 2012; 7(3):e34366.
43. Visalli G, Riso R, Facciola A, *et al.* Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol*. 2016; 88(2):336-44.



Cellular redox, cancer and human papillomavirus

Alfredo Cruz-Gregorio^{a, b}, Joaquín Manzo-Merino^c, Marcela Lizano^{b, d, *}

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

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

^c CONACYT-Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, Mexico

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

ARTICLE INFO

Keywords:

HPV proteins
OS
RONS
HPV genome integration
DNA damage

ABSTRACT

High-risk Human Papillomavirus (HR-HPV) is the causative agent of different human cancers. A persistent HR-HPV infection alters several cellular processes involved in cell proliferation, apoptosis, immune evasion, genomic instability and transformation. Cumulative evidence from past studies indicates that HR-HPV proteins are associated with oxidative stress (OS) and has been proposed as a risk factor for cancer development.

Reactive oxygen and nitrogen species (RONS) regulate a plethora of processes inducing cellular proliferation, differentiation and death. Oxidative stress (OS) is generated when an imbalance in the redox state occurs due to deregulation of the oxidant and antioxidant systems, which, in turn, promotes the damage of DNA, proteins and lipids, allowing the accumulation of mutations and genome instability. OS has been associated with the establishment and development of different cancers, and it has recently been proposed as a co-factor in cervical cancer development.

This review is focused on evidence regarding the association of OS with HR-HPV proteins, and the interplay of the viral proteins with different elements of the antioxidant and DNA damage response (DDR) systems, emphasizing the processes that might be required for the viral life cycle and viral DNA integration into the host genome, which is a key element in the carcinogenic process induced by HR-HPV.

1. Introduction

High-risk Human Papillomavirus (HR-HPV) infection is the most prevalent sexually transmitted disease, and persistent HR-HPV infection is well recognized as being requisite for cervical cancer development (Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 1996). Moreover, HR-HPV has been recognized as the causative agent for other anogenital cancers and a subset of head and neck cancers (Chaturvedi et al., 2011; Fakhry and Gillison, 2006).

HPV infections induce inflammation as a general immune response against the pathogens (Mogensen, 2009). In this process, leukocytes migrate to the infection site and release different chemokines to promote viral infection elimination, the chronic persistence of which is proposed as being involved in cancer development (Coussens and Werb, 2002). The chronic inflammatory process increases cellular lev-

els of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), leading to the oxidation of proteins, lipids and DNA (Bartsch and Nair, 2006).

Although the inflammatory process induced by HPV is a main source of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), HPV proteins have been associated with the production and reduction of these species. Thus, this review is focused on the role of HR-HPV proteins in the regulation of cellular redox elements that promote OS, as factors cooperating in the development of HR-HPV-related cancers.

2. Human papillomavirus and cervical cancer

A persistent infection with HR-HPV is the main risk factor for cervical cancer development (Walboomers et al., 1999). Among the HPV types identified so far (Burd, 2003), nearly forty types infect the mucosa of the anogenital region and are classified as low-risk (LR) or high-risk (HR) HPVs, according to their carcinogenic potential (Munoz et al., 2003).

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

Email address: lizano@unam.mx (M. Lizano)

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.01.003>

Received 2 October 2017; Received in revised form 10 January 2018; Accepted 10 January 2018

Available online xxx

0168-1702/© 2017.

HPVs are small double-stranded DNA viruses whose genome consists of 8000 base pairs divided into three regions: the long control region (LCR) and the early and late regions. The early region encodes 6 proteins: E1, E2, E4-E7 (Zheng and Baker, 2006). E1 and E2 are involved in viral DNA replication and the regulation of viral oncogene expression (Abbate et al., 2004; Gillitzer et al., 2000). The E4 protein has been associated with the cyokeratin collapse during virion release in the final steps of the viral cycle (Doorbar, 2013). E5-E7 are the viral oncogenes that participate in cell immortalization and transformation (Moody and Laimins, 2010). In a multistage model for skin carcinogenesis, Maufort et al. (2007) showed that the E5 protein participates in the initiation, promotion and progression of cancer (Maufort et al., 2007). It is well known that E6 and E7, among their diverse interactions with cellular proteins, associate with p53 and induce the degradation of pRb, two of the main tumour suppressors (Boyer et al., 1996; Thomas et al., 1999). Additionally, the L1 and L2 proteins are encoded by the late viral region and form the HPV capsids (Baker et al., 1991; Finnen et al., 2003).

A key feature in cervical cancer development is the integration of the viral genome into the host genome. This event leads to cancer progression through the over-expression of the viral oncogenes E6 and E7 due to the lack of the E2 repressor (Badaracco et al., 2002; Romanczuk and Howley, 1992). The integration process can be induced by different mechanisms; for instance, the rupture of chromosome fragile sites (Thorland et al., 2000), replication stress (Jang et al., 2014), epigenetic modifications (Chaiwongkot et al., 2013; Groves et al., 2016), a decrease in the activity of DNA repair machinery (Winder et al., 2007), inflammation (Williams et al., 2011) or oxidative stress (OS) (Chen Wongworawat et al., 2016).

3. Cancer and RONS

The cellular redox state is defined as the balance between antioxidant and oxidant molecules. Oxidants include reactive oxygen and nitrogen species, which are generated during cellular homeostasis or cellular diseases including cancer (Darr and Fridovich, 1994). RONS have been associated with the regulation of cell proliferation, signalling and differentiation by acting as second messengers in several signal transduction pathways (Valko et al., 2007). However, RONS levels can overcome the effect of enzymatic and non-enzymatic antioxidant molecules, inducing OS. Antioxidant enzymes include superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), among others. Among the non-enzymatic antioxidants, glutathione (GSH) and vitamins A, C and E are the most important (Cadenas, 1997; Kryston et al., 2011; Valko et al., 2006). When the OS persists, RONS can oxidize lipids, proteins or nucleic acids, which in turn can induce apoptosis, necrosis and, in exceptional cases, cancer (Valko et al., 2007).

Cancer is defined as a multistage cellular process including initiation, promotion, and progression stages (Valko et al., 2007). It has been proposed that oxidative stress participates in these stages. For instance, RONS directly oxidize DNA, inducing DNA damage, which allows the appearance of mutations; moreover, RONS can activate the proliferative processes involved in cancer initiation. During this stage, several gene mutations accumulate, in part due to RONS oxidation, and DNA integrity is affected (Valko et al., 2006).

The promotion stage is associated with the induction of proliferation or the inhibition of apoptosis. It has been shown that the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) activates growth factors such as the platelet-derived growth factor (PDGF) and the epidermal growth factor (EGF), with the consequent up-regulation of proliferation (Bae et al., 1997).

The cancer progression stage involves genetic and chromosome instability. OS participates by adding further DNA alterations, such as

DNA adducts, which cause DNA and chromosome disruption (Valko et al., 2006). Furthermore, OS promotes the oxidation of DNA nitrogenous bases producing 8-oxo-guanine, inducing the trapping of topoisomerases in these oxidized DNA sites, which in turn breaks the double-stranded DNA (Daroui et al., 2004; Pourquier et al., 1999). Moreover, the levels of the components of the antioxidant system, catalase, SOD and glutathione, are decreased in several tumours, while RONS levels are increased (Khan et al., 2010). Several cancer types have been associated with a deregulation of RONS and OS, including bladder (Miyajima et al., 1997), brain (Salganik et al., 2000), breast (Brown and Bicknell, 2001), gastric (Oliveira et al., 2003), liver (Calvisi et al., 2004), lung (Azad et al., 2008), oral (Bahar et al., 2007), cervix (Sharma et al., 2010) and ovarian (Senthil et al., 2004) cancers, as well as melanoma (Fruehauf and Trapp, 2008), and lymphoma (van de Wetering et al., 2008).

4. RONS production

Aerobic living systems use oxygen (O_2), as the final electron acceptor in the electron transport chain (ETC) in mitochondria to produce energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) (Wallace, 2012). In this process, O_2 can be reduced to its most reactive radical, O_2^- , during electron leakage in the mitochondria, through cytochrome P450 reductase or cytochrome b5 in the endoplasmic reticulum (ER), or through NADPH oxidases (NOXs) or xanthine oxidase (XO) in the cytosol. In turn, O_2^- is transformed into H_2O_2 by different enzymes such as superoxide dismutase (SOD) or NOXs (Valko et al., 2007). Nitric oxide synthase (NOS) produces NO^- , which can react with O_2^- to produce peroxynitrite ($ONOO^-$) (Dijkstra et al., 1998) (Fig. 1). O_2^- , H_2O_2 , and $ONOO^-$ have been defined as RONS. Their production is balanced during cellular metabolism by the antioxidant action of enzymes or antioxidant scavengers. For instance, H_2O_2 is reduced by catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) to produce H_2O . In addition, GPx can also convert $ONOO^-$ into NO^- , a non-reactive substance (Valko et al., 2007). In cellular homeostasis, cells exposed to RONS do not suffer significant injury due to the action of these antioxidant molecules. Nevertheless, the protection granted by SOD, CAT, GPx, GR and the antioxidant scavengers can be overcome by a greater production of O_2^- , H_2O_2 , or $ONOO^-$ or a depletion of antioxidants, with a consequent induction of oxidative stress (Halliwell, 2007). Thus, during oxidative stress, RONS surpass antioxidant control systems, generating oxidative damage in DNA, proteins and lipids (Phaniendra et al., 2015) (Fig. 2). Then, the resultant lipid radicals, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE), are highly reactive and in turn can damage DNA (Halliwell, 2007).

Together, RONS and lipid radicals induce DNA damage, triggering the antioxidant system and DNA repair machinery through the activation of ATM/ATR kinases (Liou and Storz, 2010). ATM and ATR kinases are the main proteins that detect DNA damage, activating the DNA damage response (DDR) signalling pathway (Fig. 2). The DDR signalling pathway activates p53 through its phosphorylation at threonine (Thr) 18 and serine (Ser) 20. p53 then arrests growth and cell cycle process, allowing time for the repair of the damaged DNA (Craig et al., 2003; Zilfou and Lowe, 2009). When DNA is not repaired, p53 promotes apoptosis, ensuring the elimination of cells that are potentially cancerous due to their augmented mutagenic rate and genomic instability (Colotta et al., 2009; Hussain et al., 2003). The establishment of cellular antioxidant responses needs to be fast and efficient to neutralize the potential oxidant effects provoked by RONS. One initial mechanism in response to increased RONS is the activation of transcriptional factors such as Nrf2 and FoxO3, which induce the expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx) or antioxidant scavengers such as glutathione (Dinkova-Kostova et al., 2002; Putker et al., 2015; Valko et al., 2007).

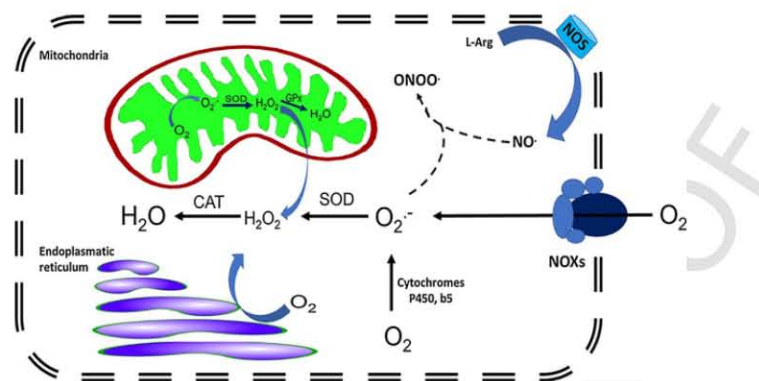


Fig. 1. Cellular RONS metabolism. The leakage of electrons in the mitochondria during the ETC is the first source of reactive oxygen species. O_2 is reduced to $O_2^{\bullet-}$, which in turn is reduced to H_2O_2 by the antioxidant enzyme SOD. Next, H_2O_2 can be reduced to H_2O by other antioxidant enzymes such as CAT or GPX. $O_2^{\bullet-}$ can also be produced by other mechanisms; for instance, when NOXs is activated it can produce $O_2^{\bullet-}$ from O_2 . On the other hand, NOS produce NO from L-Arg. Subsequently, $O_2^{\bullet-}$ plus NO produce ONOO. Additionally, H_2O_2 can be produced at the endoplasmic reticulum (ER) under stress conditions. These RONS damage cellular DNA, proteins and lipids; nevertheless, cells have an antioxidant system that counteracts their effects.

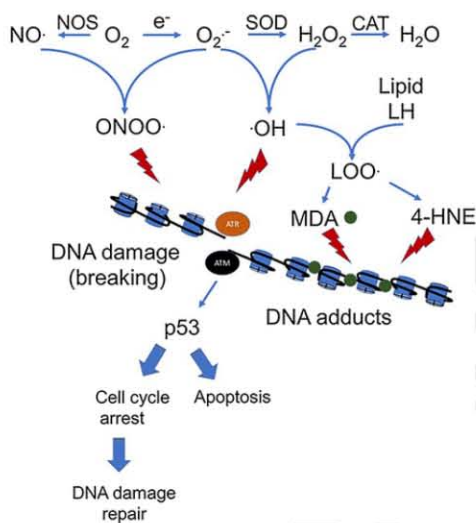


Fig. 2. RONS induced DNA damage. RONS act at different levels oxidizing lipids, proteins and DNA. Different pathways are involved in cancer progression associated to RONS production. The SOD2 enzyme degrades $O_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 , in turn H_2O_2 is converted to H_2O by catalase or glutathione peroxidase enzymes. However, in oxidative stress conditions, $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 increase and produce another RONS such as ONOO $^{\bullet}$, OH $^{\bullet}$, or lipid radicals (LOO $^{\bullet}$). These highly oxidant species can damage DNA inducing genomic instability with the subsequent activation of p53 dependent DNA repair pathways; when DNA damage is not repaired, mutations accumulate contributing to cancer.

5. Regulation of antioxidant elements by Nrf2 transcriptional factor

The nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (Nrf2) is a master transcriptional factor that is quickly activated after an elevation of RONS or electrophiles, such as benzo-[a]pyrene diol epoxide derivatives (Ma and He, 2012). Nrf2 belongs to a group of the cap 'n' collar (CNC) subfamily of the basic region leucine zipper (bZip) transcription factors. This basic region is responsible for DNA binding, while the

acidic region is needed for transcriptional activity. Nrf2 binds to and regulates DNA sequences called antioxidant response elements (ARE), which are cis enhancers with a consensus sequence (5'-GTGAC-NNNGC-3'), inducing the expression of antioxidant-related genes. Additionally, Nrf2 associates with Maf proteins (MafG, MafK, MafF), stabilizing the Nrf2 complex in ARE-specific sites to cause the antioxidant response (Suzuki and Yamamoto, 2015).

5.1. Nrf2 activation

During redox homeostasis, Nrf2 is degraded via the proteasome due to binding with its negative regulator, Keap1, which induces Nrf2 ubiquitination and subsequent degradation. Keap1 acts as a bridge between Nrf2 and Cullin3-Rbx1 (Cul3), an E3 ubiquitin ligase, which in turn conjugates ubiquitin proteins to Nrf2 (Cullinan et al., 2004). Ubiquitinated Nrf2 is recognized by the 26S proteasome subunit, starting the unfolding and subsequent degradation of Nrf2 (Suzuki and Yamamoto, 2015). Hence, Nrf2 needs to be released from Keap1 to translocate to the nucleus and activate its target genes (Nguyen et al., 2009). This dissociation is induced by oxidative agents or electrophiles, which promote conformational changes in Keap1 by oxidizing thiol groups in Keap1.

Keap1 has 27 cysteine residues that can be modified by oxidation; however, three of them, namely Cys226, Cys613 and Cys151, are reported to be necessary for its association with Cul3. When these cysteines are modified in oxidative stress conditions, the thiol group is disrupted, inducing a conformational change, which allows Nrf2 to be released and avoids its degradation (Fourquet et al., 2010). Afterwards, Nrf2 translocates to the nucleus, where it associates with Maf proteins to bind to ARE sites. These ARE sites regulate genes such as haemoxigenase (HO), CAT, SOD2 or NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1), which act as part of the antioxidant physiological barrier. The expression of these genes efficiently decreases the levels of oxidant or electrophilic molecules (Nguyen et al., 2009). Hundreds of genes related to oxidative stress, as well as genes responsive to electrophilic and inflammatory stress, are induced by the activation of Nrf2 (Taguchi et al., 2011); in this way, Nrf2 exerts antioxidant and cytoprotective functions. Once the redox homeostasis is reached due to the decrease in oxidant elements, Keap1 translocates to the nucleus, sequestering and exporting Nrf2 to the cytosol, where it is degraded via the proteasome (Fig. 3).

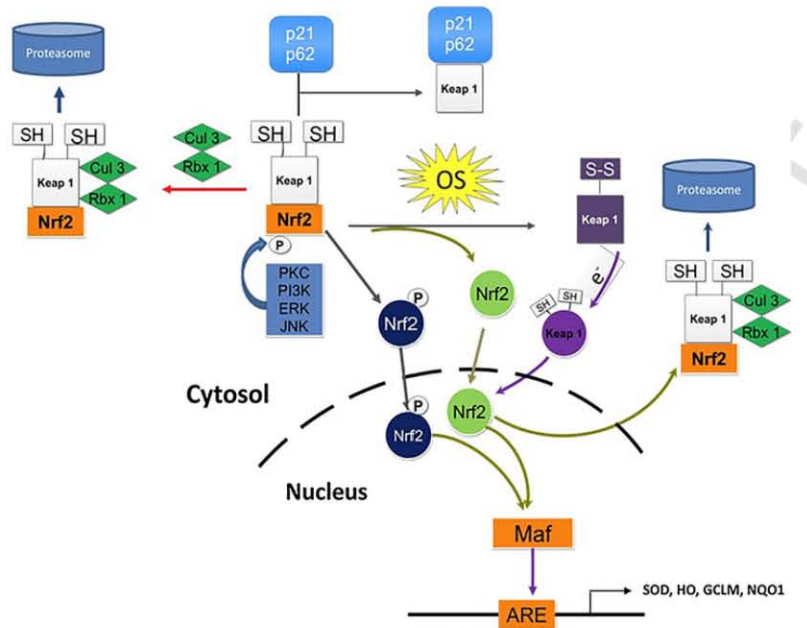


Fig. 3. Nrf2 activating pathways. Keap1 is the negative regulator of Nrf2, which respond to OS. In OS conditions Nrf2 releases from Keap1 due to conformational changes in Keap1. Nrf2 is degraded via proteasome in basal conditions; however, when oxidative stress settles, Nrf2 translocates to the nucleus to activate ARE responsive genes, involved in the response to oxidative stress or detoxifying activity. When cells reach the homeostasis during redox imbalance, Keap1 translocates to the nucleus and binds to Nrf2, exporting it to the cytosol where the degradation via proteasome is carried out. Nrf2 can be activated by phosphorylation induced by cellular kinases allowing its release and nuclear translocation or by p21, p62 proteins.

5.2. Alternative Nrf2 activation

As an alternative antioxidant response, Nrf2 can be activated by other processes, which include inactivation of the Keap1 gene via epigenetic repression, thereby diminishing Keap1 levels and maintaining Nrf2 activity (Guo et al., 2015); for instance, Keap1 expression is silenced through promoter hypermethylation (Wang et al., 2008). Additionally, Keap1 could be displaced from the Nrf2 complex by different proteins, such as p62 or p21, that directly bind to Keap1 (Chen et al., 2009a, 2009b; Komatsu et al., 2010). Nrf2 can also be regulated through post-transcriptional modifications such as the phosphorylation of serines or threonines by different cellular kinases, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinases (ERKs). For example, phosphorylation of Nrf2 at serine 40 allows its dissociation from Keap1 and its translocation to the nucleus (Huang et al., 2002).

Normally, Keap1 is associated with actin filaments through the double glycine repeat (DGR) domain that plays a key role in the stabilization of the Nrf2-Keap1 complex (Kang et al., 2004). Oxidative stress is an inductor of actin filament depolymerization. Thus, once the level of ROS is increased, the Keap1 DGR domain detaches from actin filaments due to actin depolymerisation, which allows Nrf2 to be released, enabling its translocation to the nucleus. Both Nrf2 release from Keap1 and actin depolymerization are key events leading to the activation of antioxidant genes (Fig. 3).

Importantly, Nrf2 has been shown to have opposing functions in cancer, with one role as a protective transcriptional factor and the other role as an oncogene. In the first case, Nrf2 decreases ROS levels, avoiding OS and DNA damage and acting as a suppressor of cancer development; in the second case, it confers protection against neoplastic

drugs, avoiding apoptosis and senescence and suppressing the eradication of malignancy (Menegon et al., 2016).

5.3. Nrf2 in cervical cancer

Nrf2 has been associated with cancer development and chemoresistance in several neoplasms (No et al., 2014). In colon and lung cancer, Nrf2 is active and confers resistance to anticancer drugs (Kansanen et al., 2013). In cervical cancer, higher amounts of activated Nrf2 have been found in cancer samples in comparison with non-cancer tissues (Ma et al., 2012). Moreover, the inhibition of Nrf2 expression by a specific shRNA induced an augmentation of the effects of the anticancer drugs tested in cervical cancer-derived cell lines.

Regarding Nrf2 activation in cervical cancer, it has been reported that in cervical cancer tissues, the Keap1 promoter is hypermethylated compared to non-transformed tissues. Thus, Keap1 is not expressed in late stages of cervical cancer, and consequently, Nrf2 remains active (Ma et al., 2015). Additionally, the authors demonstrated increased proliferative and invasive capabilities in SiHa cells overexpressing Nrf2. In agreement with Nrf2 activation in SiHa cells, Kontostathi et al. (2017) found that this transcriptional factor is up-regulated in cancer samples in comparison with immortalized human cervical keratinocytes (HCK1T) (Kontostathi et al., 2017). Moreover, Nrf2 activation has been associated with an overexpression of antioxidant and detoxifying proteins, such as peroxiredoxin-2 (PRDX2), transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP), and stress induced-phosphoprotein 1 (STIP1) (Kontostathi et al., 2017). The deregulation of the antioxidant system at different stages in cervical cancer seems to be associated with chemoresistance due to the ability of Nrf2 to regulate the redox and detoxifying system in the late clinical stages of cervical cancer (Kontostathi et al., 2017; Ma et al., 2015, 2012). Additionally, increased antioxidant activity has been found in patients with cervical

squamous cell carcinoma (Beevi et al., 2007; Demirci et al., 2011; Looi et al., 2008), indicating that the OS might be a common feature in this neoplasm. Since E6 and E7 are expressed in HPV-related cancers, it is possible that Nrf2 actions are affected by the presence of these oncoproteins. Still, it is necessary to investigate the role of the HPV proteins with regard to Nrf2 and how their effects could be associated with clinical outcomes.

6. HPV proteins in the modulation of the redox state

Different cellular mechanisms are activated after a virus infects a cell, including humoral and adaptive immune responses. These processes, in turn, induce inflammation and OS (Stanley, 2010). Furthermore, OS is not only associated with the elimination of a viral infection but is also required for the efficient encapsidation of the viral genome; several studies have demonstrated the ability of viral proteins to promote OS. Table 1 describes the action of viral proteins in the onset of OS.

6.1. HPV E2 protein

E2 is a 52-KDa protein, whose major functions are associated with genome replication and transcriptional regulation of the viral oncogenes E6 and E7 (McBride, 2013). E2 binds to the viral DNA, favouring viral replication. It has been shown that E2 interacts with E1 providing specificity to the DNA origin of replication site (Mohr et al., 1990). E2 proteins are localized predominantly in the nuclei of infected cells. However, E2 from HPV18 and 16 can translocate from the nucleus to the cytoplasm, thus HR-HPV E2 may have nuclear and cytosolic functions (Blachon et al., 2005) including the induction of apoptosis.

HR-HPV E2 has been associated with the promotion of OS, as shown by Lai et al. (Lai et al., 2013), with HPV18 E2 associating with the inner mitochondrial membrane proteins including complex III, IV and V and inducing OS. Moreover, HPV18 E2 modifies the mitochondrial cristae morphology, increasing the release of mitochondrial ROS. These functions have not been observed for the non-oncogenic HPV8 E2 protein (Lai et al., 2013). Recently, our group showed that the HPV18 E2 increases ROS, with a consequent decrease in GSH levels and in the amount and activity of SOD 1/2. Moreover, the co-expression of E2 plus E1 from HPV18 also induces OS and DNA damage at higher levels than those observed for E2 alone (Cruz-Gregorio et al., 2018), suggesting that during the replicative cycle of HR-HPV, E1 and E2 promote OS.

The apoptosis process can be triggered by the increase in ROS through the redox sensor Ask1, ultimately activating the JNK pathway (Circu and Aw, 2010). ROS-mediated apoptotic signalling is also associated with a reduction in GSH levels. HPV E1 and E2 as well as the co-expression of both viral proteins have been demonstrated to reduce GSH levels and to promote mitochondrial disruption with the loss of cellular redox balance; therefore, this could be a mechanism by which HR-HPV E2 proteins promote apoptosis.

It has been demonstrated that the E2 DNA binding domain has a cysteine residue in position 340, which, if oxidized by RONS, could regulate E2 functions in viral transcription processes (Grossel et al., 1996; McBride et al., 1992). Hence, the redox state could affect HR-HPV protein functions, while HR-HPV proteins may modulate the redox state during infection.

6.2. HPV E5 protein

E5 is the smallest of the HPV oncoproteins, with only 83 amino acids and a molecular weight of 14 KDa. It is localized mainly in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (GA) (Conrad et al., 1993). By itself, HPV16 E5 induces chromosome abnormalities, and together

Table 1
Effect of HPV proteins in the cellular redox metabolism.

HPV protein	Cellular target	Cellular effect	References
E1	Activates ATR kinase and γ H2AX Decreases GSH, SOD1	DNA damage	Sakakibara et al., 2011 Cruz-Gregorio et al., 2018
E2	Decreases GSH, SOD1 Increases ROS, catalase activity Associates with the inner mitochondrial membrane proteins of complex III, IV and V	DNA damage Loss of cristae structure	Cruz-Gregorio et al., 2018 Lai et al., 2013
E1/E2	Activate ATR kinase and γ H2AX Decrease GSH, SOD1, SOD2	DNA damage	Sakakibara et al., 2011 Cruz-Gregorio et al., 2018
E5	Induces Bax degradation via proteasome, which, in turn regulates apoptosis induced by H_2O_2	Apoptosis	Oh et al., 2010
E6	Decreases expression and activity of catalase	DNA damage	Cruz-Gregorio et al., 2018
E6*	Increases ROS Decreases SOD1, GPX 1/2	DNA damage	Williams et al., 2014
E7	Increases ROS Increases expression and activity of catalase isoforms, Stabilizes glutathione S-transferase P1 (GSTP1), during UV irradiation and H_2O_2 exposure Senses redox environment through its cysteins 59 and 68 inducing conformational changes and cytoplasm-nucleus shuttling	Increased cell viability Resistance to OS-inducing cell death	Shim et al., 2005 Shim et al., 2008 Cruz-Gregorio et al., 2018
E6/E7	Increases NADPH oxidase 2 (NOX2) Increases ROS	DNA damage	Mileo et al., 2009 Chemes et al., 2014 Camporeale et al., 2017 Marullo et al., 2015

with E6, it induces koilocytosis in epithelial cells (Hu et al., 2010; Krawczyk et al., 2008). This oncoprotein also binds to the 16K subunit of the V-ATPase, decreasing its activity, which, in turn, inhibits the acidification of endosomes (Conrad et al., 1993; Straight et al., 1995). Endosome acidification is necessary to induce the loading of the correct antigenic peptides on MHC class II (MHC II) molecules and their maturation. In this manner, E5 avoids endosome acidification and decreases immune recognition (Zhang et al., 2003). It has also been shown that in primary keratinocytes harbouring HPV16 E5, the levels of cyclooxygenase 2 (COX2) are decreased, impacting the reduction of ER stress responses (Sudarshan et al., 2010). Additionally, the presence of E5 stimulates proteasome-mediated degradation of Bax, a pro-apoptotic protein that regulates apoptosis induced by H_2O_2 (Oh et al., 2010), probably as a survival mechanism during HR-HPV infection.

Although E5 has not been directly associated with the modulation of the redox state, it is quite probable that this oncoprotein could in-

duce changes in the levels of oxidants due to its effect on COX2. In this sense, Ramos et al. demonstrated in the skin of mice that when COX2 levels decrease, antioxidant enzymes such as CAT or SOD are overexpressed (Ramos et al., 2009).

6.3. HPV E6 and E6* proteins

The HPV E6 oncoprotein is composed of 150 amino acids with a molecular weight between 16 and 18 kDa. HR-HPV E6 is associated with the immortalization of human keratinocytes (Klingelutz and Roman, 2012). E6 proteins from HR-HPVs have the exceptional property to produce spliced forms of E6 called E6*, which are truncated forms of E6 lacking the C-terminus of the full-length E6 (Pim et al., 1997). HR-HPV E6 associates with the E3 ubiquitin ligase E6AP, which, in turn, initiates p53 degradation, as well as the PDZ domain containing proteins through the ubiquitin-proteasome system (UPS) (Mantovani and Banks, 2001; Thomas et al., 1999). The regulation of cellular redox status by E6 is currently under investigation. It has been demonstrated that the E6* isoform from HPV16 decreases the levels of the SOD 2 and GPx 1/2 antioxidant proteins, which, in turn, produces an increase in ROS levels and DNA damage (Williams et al., 2014). Furthermore, the E6 from HPV16 and 18 affects the expression and activity of catalase and reduces GSH, inducing OS and DNA damage (Cruz-Gregorio et al., 2018).

Oxidative stress is induced in the presence of E6 and E7 oncoproteins from HPV18, as demonstrated by Marullo and co-workers, who showed that the combined expression of E6/E7 induces the overexpression and activation of NADPH oxidase 2 (NOX2) in a head and neck cancer-derived cell model. This activation increased ROS levels and induced chromosomal abnormalities (Marullo et al., 2015). Elevated levels of ROS are associated with OS-induced apoptosis (Circu and Aw, 2010). The role of the HR-HPV E6 oncoproteins in the inhibition of apoptosis has been thoroughly reviewed (Finzer et al., 2002; Li et al., 2005; Yuan et al., 2012). For instance, the E6 protein interacts with and downregulates several pro-apoptotic proteins such as the FADD receptor (Filippova et al., 2004), caspase 8 (Filippova et al., 2007; Manzo-Merino et al., 2014), Bak (Thomas and Banks, 1999), Bax (Magal et al., 2005) and p53 (Mantovani and Banks, 2001), ensuring cell survival. Although, E6 induces OS in different cellular models (Marullo et al., 2015; Cruz-Gregorio et al., 2018), it has been shown that HR-HPV-positive cells exhibit oxidant-induced programmed cell death resistance due to the transcriptional up-regulation of miscellaneous cellular factors including NFκB and survivin, which display antioxidant activities (Baratchi et al., 2011). Additionally, the fact that p53 is downregulated by HR-HPV E6 proteins allows a substantial failure in the apoptotic system and plays an important role in HR-HPV inhibition of apoptosis.

6.4. HPV E7 oncoprotein

E7 is a 10-kDa oncoprotein with huge transformation capability because it induces the degradation of the tumour suppressor pRb via the proteasome (Boyer et al., 1996). pRb is a key protein in the control of cellular proliferation, regulating the entrance into the S-phase during the cell cycle. When pRb is degraded, the E2F replication factor is released, which induces the expression of cellular factors such as cyclins and cyclin dependent kinases (CDKs), promoting the entrance of the cell into the S phase (Boyer et al., 1996; Munger et al., 2001). The role of E7 in OS modulation was initially demonstrated in HaCaT cells, where a protective effect of E7 and a resistance to OS-induced cell death was observed when cells were exposed to oxidative conditions (Shim et al., 2008). Additionally, it has been demonstrated that this protection is due in part to the overexpression of catalase, an efficient antioxidant enzyme whose main action is the processing of H₂O₂ into

H₂O (Shim et al., 2005). Moreover, the GSH levels are increased in the presence of E7 from HPV16 and 18, which is associated with a reduction in ROS production (Cruz-Gregorio et al., 2018). Besides, Mileo et al. found that HPV16 E7 interacts with and stabilizes glutathione S-transferase P1 (GSTP1) during UV irradiation and H₂O₂ exposure (Mileo et al., 2009). GSTP1 neutralizes cell damage induced by electrophiles through its enzymatic activity, and its main action involves conjugating xenobiotics with reduced glutathione (GSH). Thus, this enzyme is critical in cell detoxification (Hayes et al., 2005). The evidence demonstrating that E7 promotes the expression of catalase, B-cell lymphoma-extra large protein (Bcl-xL), interleukine-8, Fas, Bad and cytochrome C has been associated with OS-induced cell death resistance, indicating that E7 grants protection against apoptosis in cells exposed to H₂O₂ (Shim et al., 2008). In addition, it has been demonstrated that in astrocytes, HPV16 E7 also protects against apoptosis induced by H₂O₂ (Lee et al., 2001).

The HR-HPV E7 oncoprotein is a cysteine-rich protein; close to 7% of the amino acids in E7 are cysteines. These cysteines are targeted and oxidized by ROS. For instance, when cysteine 24, localized in the E7 pRb-binding motif LxCxK, is oxidized, E7 loses its capacity to bind to pRb (Chemes et al., 2014). A recent study found that the cysteine residues at positions 59 and 68, localized in the E7 carboxy terminal domain, can be oxidized by ROS, creating a disulphide bond between those residues. This disulphide bond induces a conformational change in E7, provoking a globular and tight conformation of E7, protecting E7 against ROS. Cysteine 68 is also associated with E7 cytoplasm-nucleus shuttling, since when this cysteine is oxidized, E7 localizes mainly in the cytoplasm and, in contrast, when this residue is reduced, E7 remains in the nucleus (Camporeale et al., 2017).

6.5. Effect of oxidative stress in the formation of HPV virions

Although there is strong evidence indicating the ability of the HR-HPV proteins to modulate the redox state, there exists data indicating that OS is required for properly finishing the HR-HPV viral life cycle. HPV L1 and L2 proteins are expressed in the late phase of the viral cycle. These proteins auto-assemble to build the viral capsid (Buck et al., 2005, 2004). L1 is a 57-kDa protein, which composes 80% of the capsid. Meanwhile, L2, a 53-kDa protein, composes the other 20%. Five units of L1 proteins associate with each other to form an L1 pentamer. In the hollow of each L1 pentamer, an L2 protein is located, forming a complex which is called capsomere. The HPV capsid has 72 capsomeres arranged in an icosahedral lattice structure (Buck et al., 2004). During viral production, the capsomeres are assembled at the superficial layers of the epithelium, culminating the viral cycle. This process seems to be associated with cellular OS. Conway and co-workers found a close dependence of the capsomere assembly on the redox state. An oxidative environment induces disulphide interactions between the L1 proteins, resulting in the capsomere assembly (Conway et al., 2009). Furthermore, oxidative stress induced by glutathione disulphide (GSSG) accelerates disulphide bond formation between the L1 proteins (Buck et al., 2005). Thus, HR-HPV needs an oxidative environment in the upper layers to induce HR-HPV virion maturation and release (Fig. 4).

7. OS and DNA damage

DNA is highly susceptible to ROS damage, since both the ribose backbone and the nitrogenous bases are targeted by ROS. HO•, O₂•⁻ and H₂O₂ induce the oxidation and breakage of nucleic acids, as well as alteration of the nitrogenous bases and DNA adducts (Phaniendra et al., 2015). It has been found that the major molecules derived from DNA damage induced by ROS are 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-nitroguanine (De Marco, 2013; Valko et al., 2006). These alterations lead to the production of mutations by trans-

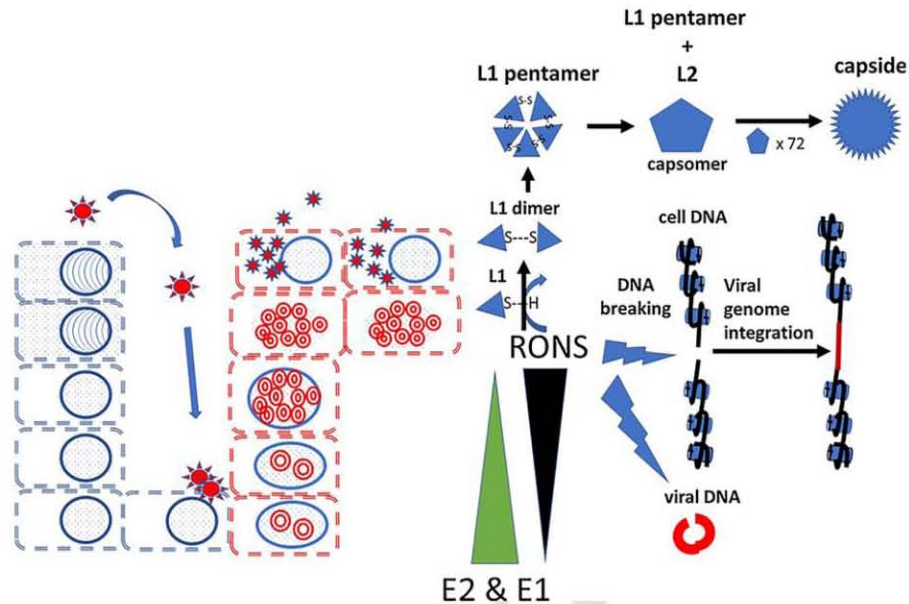


Fig. 4. HPV life cycle and OS. HPV infection requires the entrance of the viral particle to the basal layer in the epithelium where it starts the expression of viral proteins to culminate the productive viral life cycle. Across the different layers of the epithelium, the production of RONS promotes the formation of disulfide bonds among the L1 monomers allowing viral capsid formation. The rise of RONS induces OS, which promotes viral and cellular DNA damage. Thus, the viral DNA integration into the cellular genome is likely to occur.

version (from G:C to T:A), due to the presence of apurinic sites (Waris and Ahsan, 2006). Thus, the cellular oxidative state can result in mutations and/or aberrant gene expression that contribute to cancer establishment.

DNA damage can be attributed to various cell metabolic processes associated with an increase in RONS. In addition to ROS generation, other agents induce DNA damage; for instance, UV light; X, γ or cosmic rays; chemical reagents such as aromatic amines, aryl chloride, and vinyl chloride; and certain metals such as iron, copper, chromium, cobalt, and vanadium (Burton and Jauniaux, 2011; Holmström and Finkel, 2014; Valko et al., 2006). The abovementioned reagents can induce 2000–10,000 spontaneous DNA injuries in one day, so cells have evolved complex mechanisms to monitor DNA integrity by activating repair pathways (Blanpain et al., 2011; Lindahl, 1993). The cellular mechanism recognizes and responds to DNA damage is generally known as the DNA damage response (DDR). DDR requires multiple sensor proteins, transducers and effectors acting in a coordinated network of different repair pathways. Thus, DNA repair processes recognize, remove and repair errors, constituting the main mechanism that guarantees genetic stability and, consequently, cell survival (Sancar et al., 2004).

8. HPV replication is associated with the DNA damage repair (DDR) pathways

DNA damage and genome instability are recognized as hallmarks of HR-HPV infection and cervical cancer development. Recently, Cortes et al. found that the ablation of E6 oncoprotein expression in HeLa cells decreases DNA damage (Cortes Gutierrez et al., 2017). Additionally, E6/E7 expression has been associated with an increase in G2-M phase proteins, such as Aurora-1, cdk1, Plk1 and Nek2, avoiding the G2-M checkpoint (Patel et al., 2004). Moreover, it has been demonstrated that the mitotic checkpoint is independently regulated by E6 and E7 (Thomas and Laimins, 1998). Regarding E7, Park et al. showed that

HPV16 E7 also delays the activation of DNA repair, slowing the action of γ H2AX, a marker of DNA damage involved in DNA repair (Park et al., 2014). The E6 oncoprotein has been associated with the deregulation of CHK1, increasing the cytotoxicity exerted by benzo [a] pyrene in human fibroblasts (Chen et al., 2009a, 2009b). Moreover, E6 from HPV types 5 and 8 increases DNA damage induced by UV exposure in human foreskin keratinocytes (HFKs) (Wallace et al., 2012). This study also showed that E6 promotes p300 inhibition, which reduces ATR levels. A reduction in ATR levels delays the recognition of DNA damage, augmenting thymine dimers, with a consequent increase in DNA double-strand breaks.

Additionally, the expression of E6* or E6/E7 from HPV16 induces OS and DNA damage in human keratinocytes, as well as chromosomal instability (Marullo et al., 2015; Williams et al., 2014). Recently, we demonstrated that HR-HPV E6 induces OS and DNA damage that is associated with a decrease in GSH levels without affecting cell viability (Cruz-Gregorio et al., 2018), which could be involved in cancer initiation due to the accumulation and persistence of mutations.

A characteristic feature of OS-induced damage is the rupture of double-stranded DNA. Double-strand breaks (DSBs) are detected by the ATM proteins, which activate the DNA repair pathways, so ATM is a crucial molecule for DNA maintenance. Moody and Laimins showed that HPV31 induces DNA damage and activates the ATM pathway, providing an optimal HPV31 replication environment (Moody and Laimins, 2009). The HR-HPV genome replication process needs the action of the E1 helicase plus E2 (Bergvall et al., 2013). Sakakibara et al. found that E1 increases the levels of proteins associated with DNA damage response, such as ATM, Chk2 and H2AX (Sakakibara et al., 2011). In the same study, they found that E2 localizes with DNA damage response elements in the nuclear foci of human foreskin keratinocytes (HFK). These foci could be related to centres of viral replication, where proteins associated with the DNA damage response are also recruited, such as the MRE complex, Ku70/80, ATRIP and Chk1 (Kadaja et al., 2007), suggesting that the DDR is necessary to achieve

optimal HR-HPV DNA replication. When OS surpasses the antioxidant barrier in HR-HPV-infected cells, cellular DNA becomes susceptible to rupture, probably contributing to the viral integration process.

9. OS and HPV DNA integration

The integration of the HR-HPV genome into the cellular genome is a necessary step in HR-HPV-induced carcinogenesis (Cullen et al., 1991; Wentzensen et al., 2004). Once this occurs, E2 and E1 expression decrease, since the E2 open reading frame (ORF) is generally disrupted (Badaracco et al., 2002). In consequence, E6 and E7 viral oncogenes are over-expressed, promoting cellular transformation (Moody and Laimins, 2010).

The rupture of double-stranded DNA is necessary for HR-HPV integration, and one of the promoting factors of that rupture is the exposure to OS (Chen Wongworawat et al., 2016). Accordingly, Visalli et al. found that DNA damage markers are increased in HR-HPV-positive dysplastic cervical lesions compared to normal cytology samples that are negative for HR-HPV (Visalli et al., 2016). De Marco et al. also found an increase in DNA and protein damage induced by ROS in dysplastic HPV16-positive tissues when measuring OS biomarkers 8-oxo-dG and protein carbonyls, in comparison with HPV16-positive cancer or non-dysplastic HR-HPV-negative tissues (De Marco et al., 2012). Thus, it has been proposed that HR-HPV proteins could modulate the redox state and DNA damage, since in dysplastic stages where OS is increased, concomitant with the expression of HR-HPV E1 and E2, DNA damage is augmented in comparison with neoplastic stages where E6 and E7 are overexpressed (De Marco, 2013). Moreover, these results suggest that RONS levels are somehow differentially regulated throughout the different stages of HR-HPV-positive neoplasms, resulting in different grades of DNA damage related with cancer development. Recently, we demonstrated that HR-HPV early-expressed proteins regulate the redox state in a differential manner (Cruz-Gregorio et al., 2018).

The continued expression of E6 and E7 oncoproteins is required for the formation and maintenance of tumour cells. These oncoproteins differentially affect DNA integrity and cooperate to induce chromosome instability (Duensing et al., 2000; Duensing and Munger, 2002). In addition, HPV16 E7 induces abnormal centrosome number and multipolar mitotic spindles, which promotes neoplastic progression in neonatal foreskin keratinocytes (NHK) (Duensing et al., 2001), probably contributing to chromosome instability.

Thus, OS is a condition that can promote DNA damage and DNA DSBs, not only of the host genome but also of the viral DNA, facilitating the process of viral DNA integration into the host genome. In this regard, it has been demonstrated that the E6* isoform induces OS, permitting the integration of foreign DNA into the cellular genome, possibly indicating that this process occurs during the natural history of HR-HPV infection (Chen Wongworawat et al., 2016).

10. Concluding remarks

Oxidative stress has been widely associated with the development of different types of cancer; therefore, the use of antioxidant agents has evolved as a novel therapeutic proposal in oncology (Liu and Wang, 2015). In HR-HPV-induced cancer, the viral proteins seem to have a regulatory effect on the OS establishment, having distinct roles regarding their level of expression throughout the different stages of cancer. For instance, the early-expressed HR-HPV viral proteins, E6, E6*, E1 and E2 decrease the activity and expression of antioxidants, such as SOD 1/2 or catalase, and even GSH scavengers, inducing oxidative stress and DNA damage. Although the E7 oncoprotein confers oxidative resistance, avoiding DNA damage, the final effect of the early-expressed HR-HPV proteins is the induction of OS, promoting virion as-

sembly and the completion of the viral life cycle. However, OS induces DNA damage, which in turn could induce HR-HPV genome integration into the cellular genome, triggering the carcinogenic process.

The study of the mechanism by which HR-HPV proteins regulate the redox state and viral DNA integration will suggest new possibilities for cancer treatments involving the oxidant/antioxidant balance, which could be of benefit in HR-HPV-related cancers.

Conflict of interest

No conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This research was partially supported by CONACyT grant 261499, PAPIIT-UNAM grant IN206214 and Instituto Nacional de Cancerología, México. Alfredo Cruz-Gregorio is a Ph.D. student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, and wants to thank CONACyT for supporting his Ph.D. studies Ref. 240039 and PAEP-UNAM.

References

- Abbate, E.A., Berger, J.M., Botchan, M.R., 2004. The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2. *Genes Dev.* 18, 1981–1996. <https://doi.org/10.1101/gad.1220104>.
- Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1080/10937400701436460>.
- Badaracco, G., Venuti, A., Sedati, A., Marcente, M.L., 2002. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J. Med. Virol.* 67, 574–582. <https://doi.org/10.1002/jmv.10141>.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., Rhee, S.G., 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide: role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 217–221.
- Bahar, G., Feinmesser, R., Shpitzer, T., Popovtzer, A., Nagler, R.M., 2007. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109, 54–59. <https://doi.org/10.1002/ncr.22386>.
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowsert, L.M., Olson, C., Brown, J.C., 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60, 1445–1456. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82181-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82181-6).
- Baratchi, S., Kanwar, R.K., Kanwar, J.R., 2011. Survivin mutant proteins differentiated dopaminergic SK-N-SH cells against oxidative stress. *PLoS One* 6, e158658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015865>.
- Bartsch, H., Nair, J., 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Arch. Surg.* 391, 499–510. <https://doi.org/10.1007/s00423-006-0073-1>.
- Beevi, S.S., Rasheed, M.H., Geetha, A., 2007. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin. Chim. Acta* 375, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.028>.
- Bergvall, M., Melendy, T., Archambault, J., 2013. The E1 proteins. *Virology* 445, 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>.
- Blachon, S., Bellanger, S., Demeret, C., Thierry, F., 2005. Nucleo-cytoplasmic shuttling of high risk human Papillomavirus E2 proteins induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 36088–36098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505138200>.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., Passegue, E., 2011. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.012>.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., Band, V., 1996. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 56, 4620–4624.
- Brown, N.S., Bicknell, R., 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth: metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 3, 323–327.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* 78, 751–757.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.-Y.S., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2005. Maturation of papillomavirus capsids. *J. Virol.* 79, 2839–2846. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005>.
- Burd, E.M., 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–17.
- Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>.
- Cadenas, E., 1997. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 6, 391–397.
- Calvisi, D.F., Ladu, S., Hironaka, K., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., 2004. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF-alpha transgenic mouse model of liver cancer. *J. Hepatol.* 41, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.07.030>.

- Camporeale, G., Lorenzo, J.R., Thomas, M.G., Salvatierra, E., Borkosky, S.S., Rizzo, M.G., Sanchez, I.E., de Prat Gay, G., Alonso, L.G., 2017. Degenerate cysteine patterns mediate two redox sensing mechanisms in the papillomavirus E7 oncoprotein. *Redox Biol.* 11, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.020>.
- Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., Ekalaksananan, T., Kongyingoes, B., Klee-bkaow, P., Chumworathayi, B., Patarapadungkit, N., Reuschenbach, M., von Knebel Doberitz, M., 2013. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int. J. Cancer* 132, 2087–2094. <https://doi.org/10.1002/ijc.27906>.
- Chaturvedi, A.K., Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., Hernandez, B.Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M.T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C.F., Wentzensen, N., Jordan, R.C., Altekruze, S., Anderson, W.F., Rosenberg, P.S., Gillison, M.L., 2011. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J. Clin. Oncol.* 29, 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>.
- Chemes, L.B., Camporeale, G., Sanchez, I.E., de Prat-Gay, G., Alonso, L.G., 2014. Cysteine-rich positions outside the structural zinc motif of human papillomavirus E7 provide conformational modulation and suggest functional redox roles. *Biochemistry* 53, 1680–1696. <https://doi.org/10.1021/bi401562e>.
- Chen Wongworawat, Y., Filippova, M., Williams, V.M., Filippov, V., Duerksen-Hughes, P.J., 2016. Chronic oxidative stress increases the integration frequency of foreign DNA and human papillomavirus 16 in human keratinocytes. *Am. J. Cancer Res.* 6, 764–780.
- Chen, B., Simpson, D.A., Zhou, Y., Mitra, A., Mitchell, D.L., Cordeiro-Stone, M., Kaufmann, W.K., 2009. Human papilloma virus type 16 E6 deregulates CHK1 and sensitizes human fibroblasts to environmental carcinogens independently of its effect on p53. *Cell Cycle* 8, 1775–1787. <https://doi.org/10.4161/cc.8.11.8724>.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., Zhang, D.D., 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell* 34, 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.029>.
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.
- Conrad, M., Bubb, V.J., Schlegel, R., 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67, 6170–6178.
- Conway, M.J., Alam, S., Ryndock, E.J., Cruz, L., Christensen, N.D., Roden, R.B.S., Meyers, C., 2009. Tissue-spanning redox gradient-dependent assembly of native human papillomavirus type 16 virions. *J. Virol.* 83, 10515–10526. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-09>.
- Cortes Gutierrez, E.L., Garcia-Vielma, C., Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Pina-Sanchez, P., Zapata-Benavides, P., Gosalvez, J., 2017. Expression of the HPV18/E6 oncoprotein induces DNA damage. *Eur. J. Histochem.* 61, 2773. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2773>.
- Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- Craig, A., Scott, M., Burch, L., Smith, G., Ball, K., Hupp, T., 2003. Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transcription domain. *EMBO Rep.* 4, 787–792. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor901>.
- Cruz-Gregorio, A., Manzo-Merino, J., González-García, M.C., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Valverde, M., Rojas, M., Rodríguez-Sastre, M.A., García-Cuellar, C.M., Lizano, M., 2018. Human Papillomavirus types 16 and 18 early-expressed proteins differentially modulate the cellular redox state and DNA damage. *Int. J. Biol. Sci.* 14 (1), 21–35. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21547>.
- Cullen, A.P., Reid, R., Campion, M., Lorincz, A.T., 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasms. *J. Virol.* 65, 606–612.
- Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., Diehl, J.A., 2004. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell Biol.* 24, 8477–8486. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004>.
- Daroui, P., Desai, S.D., Li, T.-K., Liu, A.A., Liu, L.F., 2004. Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 14587–14594. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311370200>.
- Darr, D., Fridovich, I., 1994. Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol.* 102, 671–675.
- De Marco, F., Bucaj, E., Foppoli, C., Fiorini, A., Blarmino, C., Filipi, K., Giorgi, A., Schinina, M.E., Di Domenico, F., Coccia, R., Butterfield, D.A., Perluigi, M., 2012. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. *PLoS One* 7, e34366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034366>.
- De Marco, F., 2013. Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses* 5, 708–731. <https://doi.org/10.3390/v5020708>.
- Demirci, S., Ozsaran, Z., Celik, H.A., Aras, A.B., Aydin, H.H., 2011. The interaction between antioxidant status and cervical cancer: a case control study. *Tumori* 97, 290–295. <https://doi.org/10.1700/912.10024>.
- Dijkstra, G., Moshage, H., van Dullemen, H.M., de Jager-Krikken, A., Tiebosch, A.T., Kleibeuker, J.H., Jansen, P.L., van Goor, H., 1998. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 186, 416–421. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199812\)186:4<416::AID-PATH201>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199812)186:4<416::AID-PATH201>3.0.CO;2-U).
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P., 2002. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11908–11913. <https://doi.org/10.1073/pnas.172398899>.
- Doorbar, J., 2013. The E4 protein: structure, function and patterns of expression. *Virology* 445, 80–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>.
- Duensing, S., Munger, K., 2002. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res.* 62, 7075–7082.
- Duensing, S., Lee, L.Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C.P., Munger, K., 2000. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10002–10007. <https://doi.org/10.1073/pnas.170093297>.
- Duensing, S., Duensing, A., Crum, C.P., Munger, K., 2001. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* 61, 2356–2360.
- Fakhry, C., Gillison, M.L., 2006. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J. Clin. Oncol.* 24, 2606–2611. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.1291>.
- Filippova, M., Parkhurst, L., Duerksen-Hughes, P.J., 2004. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 25729–25744. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401172200>.
- Filippova, M., Johnson, M.M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S.S., Williams, K., Duerksen-Hughes, P.J., 2007. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J. Virol.* 81, 4116–4129. <https://doi.org/10.1128/JVI.01924-06>.
- Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., Garcea, R.L., 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 77, 4818–4826.
- Finzer, P., Aguilar-Lemarroy, A., Rosl, F., 2002. The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett.* 188, 15–24.
- Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D., Toledano, M.B., 2010. Activation of NRF2 by nitrosative agents and H2O2 involves KEAP1 disulfide formation. *J. Biol. Chem.* 285, 8463–8471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051714>.
- Fruehauf, J.P., Trapp, V., 2008. Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma?. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8, 1751–1757. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.11.1751>.
- Gillitzer, E., Chen, G., Stenlund, A., 2000. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J.* 19, 3069–3079. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.3069>.
- Grossel, M.J., Barsoum, J., Prakash, S., Androphy, E.J., 1996. The BPV-1 E2 DNA-contact helix cysteine is required for transcriptional activation but not replication in mammalian cells. *Virology* 217, 301–310. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0117>.
- Groves, I.J., Knight, E.L.A., Ang, Q.Y., Scarpini, C.G., Coleman, N., 2016. HPV16 oncogene expression levels during early cervical carcinogenesis are determined by the balance of epigenetic chromatin modifications at the integrated virus genome. *Oncogene* 35, 4773–4786. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.8>.
- Guo, Y., Yu, S., Zhang, C., Kong, A.-N.T., 2015. Epigenetic regulation of Keap1-Nrf2 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.013>.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>.
- Hayes, J.D., Fanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- Holmström, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>.
- Hsu, L., Potapova, T.A., Li, S., Rankin, S., Gorbsky, G.J., Angeletti, P.C., Ceresa, B.P., 2010. Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication. *Virology* 405, 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.025>.
- Huang, H.-C., Nguyen, T., Pickett, C.B., 2002. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 42769–42774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206911200>.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285. <https://doi.org/10.1038/nrc1046>.
- Jang, M.K., Shen, K., McBride, A.A., 2014. Papillomavirus genomes associate with BRD4 to replicate at fragile sites in the host genome. *PLoS Pathog.* 10, e1004117. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004117>.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., Ustav, M., 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J.* 26, 2180–2191. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor7601665>.
- Kang, M.-I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.-G., Yamamoto, M., 2004. Scaffold of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2046–2051. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308347100>.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levenon, A.-L., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.
- Khan, A., Tania, M., Zhang, D., Chen, H., 2010. Antioxidant enzymes and cancer. *Chin. J. Cancer Res.* 22 (2), 87–92. <https://doi.org/10.1007/s11670-010-0087-7>.
- Klingelutz, A.J., Roman, A., 2012. Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology* 424, 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.018>.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>.
- Kontostathi, G., Zoidakis, J., Makridakis, M., Lygirov, V., Mermelekas, G., Papadopoulos, T., Vougas, K., Vlamis-Gardikas, A., Drakakis, P., Loutradis, D., Vlahou, A., Anagnou,

- N.P., Pappa, K.I., 2017. Cervical cancer cell line secretome highlights the roles of transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3, peroxiredoxin-2, and NRF2 on cervical carcinogenesis. *Biomed. Res. Int.* 418070, 3. <https://doi.org/10.1155/2017/4180703>.
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F.A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D.P., Hanover, J., Schlegel, R., 2008. Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am. J. Pathol.* 173, 682–688. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080280>.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmm.2010.12.016>.
- Lai, D., Tan, C.L., Gunaratne, J., Quek, L.S., Nei, W., Thierry, F., Bellanger, S., 2013. Localization of HPV-18 E2 at mitochondrial membranes induces ROS release and modulates host cell metabolism. *PLoS One* 8, e75625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075625>.
- Lee, W.T., Lee, J.E., Lee, S.H., Jang, H.S., Giffard, R.G., Park, K.A., 2001. Human papilloma virus type 16 E7 genes protect astrocytes against apoptotic and necrotic death induced by hydrogen peroxide. *Yonsei Med. J.* 42, 471–479. <https://doi.org/10.3349/ymj.2001.42.5.471>.
- Li, T.-T., Zhao, L.-N., Liu, Z.-G., Han, Y., Fan, D.-M., 2005. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncoprotein. *World J. Gastroenterol.* 11, 931–937.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>.
- Liou, G.-Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 44, 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.
- Liu, J., Wang, Z., 2015. Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 29430, 3. <https://doi.org/10.1155/2015/294303>.
- Looi, M.-L., Mohd Dali, A.Z.H., Md Ali, S.A., Wan Ngah, W.Z., Mohd Yusof, Y.A., 2008. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *Eur. J. Cancer Prev.* 17, 555–560. <https://doi.org/10.1097/CJ01.0b013e3283305a10b>.
- Ma, Q., He, X., 2012. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. *Pharmacol. Rev.* 64, 1055–1081. <https://doi.org/10.1124/pr.110.004333>.
- Ma, X., Zhang, J., Liu, S., Huang, Y., Chen, B., Wang, D., 2012. Nrf2 knockdown by shRNA inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy in cervical cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69, 485–494. <https://doi.org/10.1007/s00280-011-1722-9>.
- Ma, J.-Q., Tuersun, H., Jiao, S.-J., Zheng, J.-H., Xiao, J.-B., Hasim, A., 2015. Functional role of NRF2 in cervical carcinogenesis. *PLoS One* 10, e0133876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133876>.
- Magal, S.S., Jackman, A., Ish-Shalom, S., Botzer, L.E., Gonen, P., Schlegel, R., Sherman, L., 2005. Downregulation of Bax mRNA expression and protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. *J. Gen. Virol.* 86, 611–621. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80453-0>.
- Mantovani, F., Banks, L., 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874–7887. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204869>.
- Manzo-Merino, J., Massimi, P., Lizano, M., Banks, L., 2014. The human papillomavirus (HPV) E6 oncoprotein promotes nuclear localization of active caspase 8. *Virology* 450–451, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.013>.
- Marullo, R., Werner, E., Zhang, H., Chen, G.Z., Shin, D.M., Doetsch, P.W., 2015. HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* 36, 1397–1406. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv126>.
- Maufort, J.P., Williams, S.M.G., Pitot, H.C., Lambert, P.F., 2007. Human papillomavirus 16 E5 oncoprotein contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 67, 6106–6112. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0921>.
- McBride, A.A., Klausner, R.D., Howley, P.M., 1992. Conserved cysteine residue in the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein confers redox regulation of the DNA-binding activity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7531–7535.
- McBride, A.A., 2013. The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445, 57–79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>.
- Menegon, S., Columbano, A., Giordano, S., 2016. The dual roles of NRF2 in cancer. *Trends Mol. Med.* 22, 578–593. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.002>.
- Mileo, A.M., Abbruzzese, C., Mattarocci, S., Bellacchio, E., Pisano, P., Federico, A., Maresca, V., Picardo, M., Giorgi, A., Maras, B., Schiniina, M.E., Paggi, M.G., 2009. Human papillomavirus-16 E7 interacts with glutathione S-transferase P1 and enhances its role in cell survival. *PLoS One* 4, e7254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007254>.
- Miyajima, A., Nakashima, J., Yoshioka, K., Tachibana, M., Tazaki, H., Murai, M., 1997. Role of reactive oxygen species in cis-dichlorodiammineplatinum-induced cytotoxicity on bladder cancer cells. *Br. J. Cancer* 76, 206–210.
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.
- Mohr, I.J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E.J., MacPherson, P., Botchan, M.R., 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250, 1694–1699.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2009. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog.* 5, e1000605. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000605>.
- Moody, C.A., Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* 10, 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>.
- Munger, K., Basile, J.R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S.L., Grace, M., Zaczyn, V.L., 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7889–7898. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204860>.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518–527. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>.
- No, J.H., Kim, Y.-B., Song, Y.S., 2014. Targeting nrf2 signaling to combat chemoresistance. *J. Cancer Prev.* 19, 111–117. <https://doi.org/10.15430/JCP.2014.19.2.111>.
- Oh, J.-M., Kim, S.-H., Cho, E.-A., Song, Y.-S., Kim, W.-H., Juhm, Y.-S., 2010. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells. *Carcinogenesis* 31, 402–410. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp318>.
- Oliveira, C.P.M.S., Kassab, P., Lopasso, F.P., Souza, H.P., Janiszewski, M., Laurindo, F.R.M., Iriya, K., Laudanna, A.A., 2003. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* 9, 446–448.
- Park, J.W., Nickel, K.P., Torres, A.D., Lee, D., Lambert, P.F., Kimple, R.J., 2014. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein causes a delay in repair of DNA damage. *Radiother. Oncol.* 113, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.08.026>.
- Patel, D., Incassati, A., Wang, N., McCance, D.J., 2004. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cause polyploidy in human keratinocytes and up-regulation of G2-M-phase proteins. *Cancer Res.* 64, 1299–1306.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L., 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.
- Pim, D., Massimi, P., Banks, L., 1997. Alternatively spliced HPV-18 E6⁺ protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 15, 257–264. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201202>.
- Pourquier, P., Ueng, L.M., Fertala, J., Wang, D., Park, H.J., Essigmann, J.M., Bjornsti, M.A., Pommier, Y., 1999. Induction of reversible complexes between eukaryotic DNA topoisomerase I and DNA-containing oxidative base damages. 7, 8-Dihydro-8-oxoguanine and 5-hydroxycytosine. *J. Biol. Chem.* 274, 8516–8523.
- Putker, M., Vos, H.R., van Dorenmalen, K., de Ruiter, H., Duran, A.G., Snel, B., Burgering, B.M.T., Vermeulen, M., Dansen, T.B., 2015. Evolutionary acquisition of cysteines determines FOXO paralogs specific redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 15–28. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6056>.
- Ramos, G., Limon-Flores, A.Y., Ullrich, S.E., 2009. JP-8 induces immune suppression via a reactive oxygen species NF-kappabeta-dependent mechanism. *Toxicol. Sci.* 108, 100–109. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn262>.
- Romanczuk, H., Howley, P.M., 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3159–3163.
- Sakakibara, N., Mitra, R., McBride, A.A., 2011. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J. Virol.* 85, 8981–8995. <https://doi.org/10.1128/JVI.00541-11>.
- Salganik, R.I., Albright, C.D., Rodgers, J., Kim, J., Zeisel, S.H., Sivashinsky, M.S., Van Dyke, T.A., 2000. Dietary antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice. *Carcinogenesis* 21, 909–914.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.01.1303.073723>.
- Senthil, K., Aranganathan, S., Nalini, N., 2004. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin. Chim. Acta* 339, 27–32.
- Sharma, A., Rajappa, M., Satyam, A., Sharma, M., 2010. Oxidant/anti-oxidant dynamics in patients with advanced cervical cancer: correlation with chemoprevention. *Mol. Cell. Biochem.* 341, 65–72. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0437-2>.
- Shim, J.-H., Cho, K.-J., Lee, K.-A., Kim, S.-H., Myung, P.-K., Choe, Y.-K., Yoon, D.-Y., 2005. E7-expressing HaCaT keratinocyte cells are resistant to oxidative stress-induced cell death via the induction of catalase. *Proteomics* 5, 2112–2122. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401106>.
- Shim, J.-H., Kim, K.-H., Cho, Y.-S., Choi, H.-S., Song, E.Y., Myung, P.-K., Kang, J.S., Suh, S.-K., Park, S.N., Yoon, D.-Y., 2008. Protective effect of oxidative stress in HaCaT keratinocytes expressing E7 oncoprotein. *Amino Acids* 34, 135–141. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0499-y>.
- Stanley, M., 2010. HPV – immune response to infection and vaccination. *Infect. Agent. Cancer* 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-5-19>.
- Straight, S.W., Herman, B., McCance, D.J., 1995. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J. Virol.* 69, 3185–3192.
- Sudarshan, S.R., Schlegel, R., Liu, X., 2010. The HPV-16 E5 protein represses expression of stress pathway genes XBP-1 and COX-2 in genital keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 617–622. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.125>.
- Suzuki, T., Yamamoto, M., 2015. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>.
- Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16, 123–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x>.
- Thomas, M., Banks, L., 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt. 6), 1513–1517. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-6-1513>.
- Thomas, J.T., Laimins, L.A., 1998. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* 72, 1131–1137.
- Thomas, M., Pim, D., Banks, L., 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690–7700. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202953>.
- Thorland, E.C., Myers, S.L., Persing, D.H., Sarkar, G., McGovern, R.M., Gestonout, B.S., Smith, D.L., 2000. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res.* 60, 5916–5921.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- van de Wetering, C.I., Coleman, M.C., Spitz, D.R., Smith, B.J., Knudson, C.M., 2008. Manganese superoxide dismutase gene dosage affects chromosomal instability and tumor onset in a mouse model of T cell lymphoma. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1677–1686. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.022>.
- Visalli, G., Riso, R., Facciola, A., Mondello, P., Caruso, C., Picerno, I., Di Pietro, A., Spataro, P., Bertuccio, M.P., 2016. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J. Med. Virol.* 88, 336–344. <https://doi.org/10.1002/jmv.24327>.
- 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., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F).
- Wallace, N.A., Robinson, K., Howie, H.L., Galloway, D.A., 2012. HPV 5 and 8 E6 abrogate ATR activity resulting in increased persistence of UVB induced DNA damage. *PLoS Pathog.* 8, e1002807. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002807>.
- Wallace, D.C., 2012. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>.
- Wang, R., An, J., Ji, F., Jiao, H., Sun, H., Zhou, D., 2008. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.004>.
- Waris, G., Ahsan, H., 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.* 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S., Doeberitz, M.V.K., 2004. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dyspl. *Cancer Res.* 64, 3878–3884.
- Williams, V.M., Filippova, M., Soto, U., Duerksen-Hughes, P.J., 2011. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 6, 45–57. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>.
- Williams, V.M., Filippova, M., Filippov, V., Payne, K.J., Duerksen-Hughes, P., 2014. Human papillomavirus type 16 E6⁺ induces oxidative stress and DNA damage. *J. Virol.* 88, 6751–6761. <https://doi.org/10.1128/JVI.03355-13>.
- Winder, D.M., Pett, M.R., Foster, N., Shivji, M.K.K., Herdman, M.T., Stanley, M.A., Venkataraman, A.R., Coleman, N., 2007. An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J. Pathol.* 213, 27–34. <https://doi.org/10.1002/path.2206>.
- Yuan, C.-H., Filippova, M., Duerksen-Hughes, P., 2012. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses* 4, 3831–3850. <https://doi.org/10.3390/v4123831>.
- Zhang, B., Li, P., Wang, E., Brahm, Z., Dunn, K.W., Blum, J.S., Roman, A., 2003. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. *Virology* 310, 100–108.
- Zheng, Z.-M., Baker, C.C., 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 11, 2286–2302.
- Zilfou, J.T., Lowe, S.W., 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>.
- zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*



SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA, A.C.
**GACETA MEXICANA
DE ONCOLOGÍA**

www.elsevier.es



Biología molecular del cáncer cervicouterino

J. Manzo-Merino,^{a*} R. Jiménez-Lima,^b A. Cruz-Gregorio^b

^a Departamento de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, México D.F

^b Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, México D.F

PALABRAS CLAVE

Cáncer cervicouterino; Virus del papiloma humano; Oncogenes.

Resumen El cáncer cervicouterino es un serio problema de salud pública. Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares establecen que la infección persistente con el virus del papiloma humano es la principal causa para su desarrollo. Se han identificado más de 100 tipos del virus del papiloma humano, de los cuales 16 y 18 son causantes de más de 75% de todos los cánceres de cérvix. La mayoría de los casos de cáncer cervical se desarrolla en la zona de transformación, donde el epitelio columnar del endocervix se une al epitelio estratificado del exocervix. Entre los determinantes de progresión del cáncer cervicouterino está la ausencia de programas de *screening* y la poca accesibilidad a los recursos diagnósticos; además de otros factores, como el genotipo viral, la persistencia de la infección, probablemente la carga viral, la integración del DNA viral en el genoma celular y periodos de inmunosupresión en el organismo. Aparte del mecanismo oncogénico inducido por el virus del papiloma humano (expresión conjunta de E6 y E7), existen otros factores que contribuyen al desarrollo carcinogénico entre los que destacan la sobreexpresión, amplificación o pérdida de función de genes.

KEYWORDS

Cervical cancer; Human papillomavirus; Oncogenes.

Molecular biology of cervical cancer

Abstract Cervical cancer is a critical public health issue. Several epidemiological and molecular studies have established that persistent infection by human papillomavirus is the main cause for developing cervical cancer. More than 100 types of human papillomavirus have been identified, 18 out of them have been classified as "high-risk" because of its association with cancer. Human papillomavirus types 16 and 18 cause more than 75% of cervical cancer. Most of the cervical cancer cases develop in the transformation zone, where the columnar epithelium of the endocervix joins to the stratified epithelium of the exocervix. Among the various cervical cancer determinants are the lack of screening programs, the restricted accessibility to diagnostic resources, viral genotype, infection persistence, viral burden, viral DNA integration to the

*Autor para correspondencia: Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Avenida San Fernando 22, Col. Sección XVI, Tlalpan D.F., México, C.P. 14620, Teléfono: (55) 56280400 Ext.133. Correo electrónico: jmanzomerino@gmail.com (J. Manzo-Merino)

genome sequencing, and immunosuppression periods in the body. Besides the oncogenic mechanism, induced by human papillomavirus (expression of E6 and E7), there are other factors which contribute to the carcinogenic development, that is to say overexpression, amplification or gene function loss.

1665-9201 © 2014 Gaceta Mexicana de Oncología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

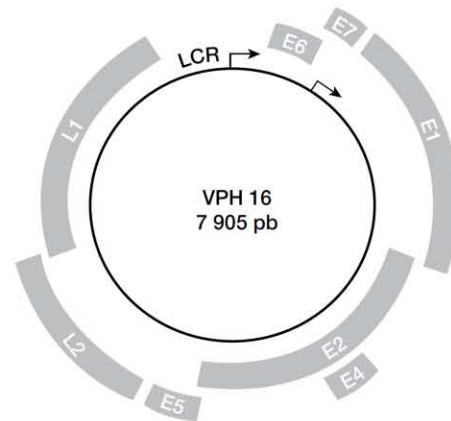
Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCu) representa un serio problema de salud pública, principalmente en países en vías de desarrollo como México. Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares establecen la infección persistente con el Virus del Papiloma Humano (HPV, *Human Papillomavirus*) como causa necesaria para el desarrollo del CaCu¹⁻³. El HPV es un virus pequeño de aproximadamente 55 nm, no envuelto que pertenece a la familia *Papillomaviridae*⁴. Estos virus están ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan específicamente el epitelio escamoso de más de 20 especies diferentes de mamíferos, así como aves y reptiles⁵. La cápside del HPV está constituida por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), conformada por las proteínas estructurales L1 y L2 que albergan el genoma viral⁶. El genoma viral consiste en DNA circular de doble cadena de 7200-8000 pares de bases (pb), con más de 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) y generalmente una hebra es transcripcionalmente activa⁷. El genoma del virus (fig. 1) ha sido dividido en tres regiones: región temprana (E: *Early*) que codifica para los genes implicados en replicación y mantenimiento del genoma viral (E1-E8); región tardía (L: *Late*), la cual codifica a las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2, y por último, la región larga de control (LCR: *Long Control Region*), la cual contiene los sitios de regulación de la transcripción y replicación viral⁸.

Se han identificado más de 100 tipos de HPV, de los cuales cerca de 18 se clasifican en “alto riesgo” dada su asociación con cáncer, y de “bajo riesgo” por su asociación con displasias de alto y bajo grado. Los tipos de HPV 16 y 18 son causantes de más de 75% de todos los cánceres de cérvix¹.

El HPV infecta las células basales del epitelio porque ingresa en micro-lesiones que exponen dichas células. Ahí se activa un mecanismo de endocitosis que requiere de clatrina y heparán sulfato, mediado por la proteína L2. El genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma. El virus replica su DNA para mantener un número de 50-100 copias de su genoma dentro de las células basales y parabasales. El patrón de expresión en estas células no está bien definido, pero generalmente las proteínas E1 y E2 son expresadas para mantener el DNA viral como episoma y facilitar la correcta segregación de los genomas durante la división celular. Al dividirse la célula infectada, una de las células hijas permanece en la parte basal del epitelio mientras que la otra célula inicia el proceso de diferenciación en la parte superior del epitelio⁹.

La amplificación del genoma viral inicia en un subgrupo de células de las capas superiores del epitelio. En esta fase, la activación del promotor dependiente de la diferenciación



El genoma viral está constituido por DNA circular de doble hebra de aproximadamente 9Kb (dependiendo del tipo viral). Está dividido en tres regiones: LCR (región larga de control); región temprana (E) que codifica las oncoproteínas y proteínas que regulan la transcripción y la región tardía (L) que codifica para las proteínas de la cápside.

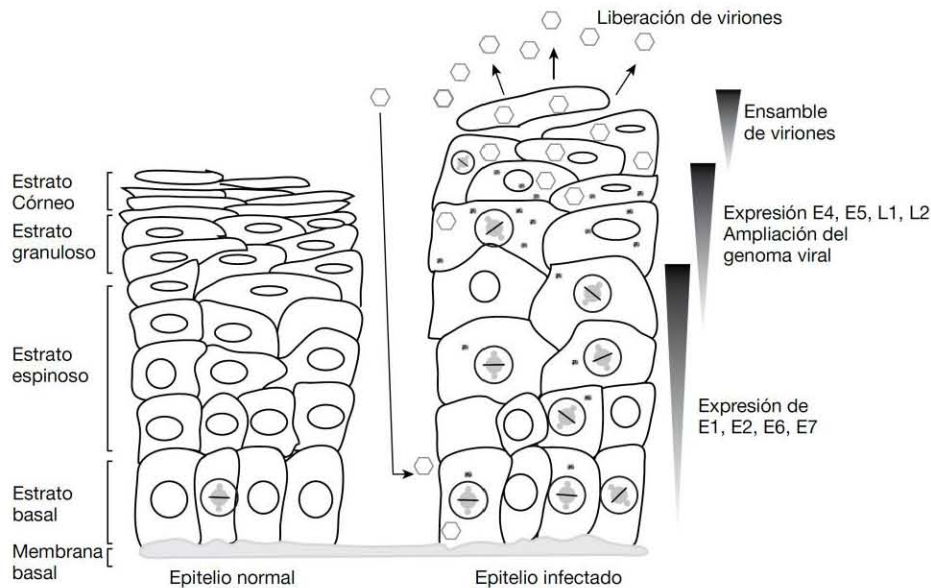
Figura 1 Organización del genoma del virus del papiloma humano

(contenido en el ORF de E7) es un evento crítico porque es necesario para incrementar el nivel de proteínas virales requeridas para la replicación (E1, E2, E4 y E5)⁹.

Las proteínas de la cápside (L1 y L2) se acumulan una vez que se ha amplificado el genoma viral para así encapsularlos. Los papilomavirus son no líticos y se liberan hasta que las células infectadas llegan a la superficie epitelial. El egreso de las partículas virales se lleva a cabo gracias a la actividad residente en E4, la cual contribuye a la desestabilización de las redes de citoqueratina (fig. 2)¹⁰.

En la ausencia de regresión, las lesiones pueden persistir y, en algunos casos, progresar a cáncer. Una característica común de los virus tumorales es su capacidad para originar tumores en sitios donde su ciclo viral productivo no puede ser completado. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado pueden soportar esta infección productiva; sin embargo, las neoplasias cervicales intraepiteliales 2 y 3 (NIC 2 y NIC 3) tienen una fase proliferativa más extensa, donde el soporte del ciclo viral puede ser adecuado o mínimo.

Se sabe que la zona de transformación es un sitio particularmente susceptible al desarrollo de cáncer. Parece que los tipos de alto riesgo no pueden completar su ciclo en esta



Los papilomavirus humanos ingresan a las células basales a través de microabrasiones en el epitelio cervical. Posterior a la infección, los genes tempranos E1-E7 son expresados y ocurre la replicación del genoma viral. En las capas superiores del epitelio, el genoma viral eleva su tasa de replicación, y los genes tardíos L1, L2 así como E4 y E5, son expresados. L1 y L2 encapsulan el DNA viral, con lo cual, los viriones pueden iniciar una nueva infección.

Figura 2 El ciclo viral en el epitelio estratificado.

área, lo que ocasionalmente conduce a una infección abortiva. La progresión de lesiones hacia cáncer microinvasor o invasor se asocia con la integración del genoma del HPV en los cromosomas del hospedero. En dicho proceso suele perderse la integridad de E2, con la subsecuente expresión de los oncogenes E6 y E7¹¹.

Patogénesis cervical

La mayoría de los casos de cáncer cervical se desarrolla en la zona de transformación, donde el epitelio columnar del endocervix se une al epitelio estratificado del exocervix. La infección de este tejido con HPV de alto riesgo induce verrugas planas cervicales, que normalmente son asintomáticas y regresan espontáneamente de manera frecuente¹². No obstante, una fracción de estas infecciones genera incremento en la población de células displásicas (conocidas como NIC), que pueden culminar en carcinoma *in situ*¹³. El carcinoma cervical *in situ* puede ser fácilmente tratado de manera local, pero las lesiones que no son tratadas pueden progresar a cáncer invasor para el cual el tratamiento es limitado. La enfermedad invasora ocurre en una minoría de las mujeres infectadas por HPV-AR; el tiempo entre la infección inicial y la aparición del cáncer es típicamente 10 años¹⁴.

La integración de genoma viral al genoma celular es un evento que interrumpe la expresión de los genes E1 y E2, previene la replicación de DNA viral y estimula el crecimiento celular^{15,16}. Aunque la proteína E2 es un factor de

transcripción esencial, también puede funcionar como represor del principal promotor viral^{17,18}. En consecuencia, la pérdida de la función de E2 —debido a la integración del DNA viral— induce una liberación del promotor a partir del cual se expresan las proteínas E6 y E7, principales estímulos oncogénicos codificados por HPV^{19,20}. En ausencia de la integración del genoma viral, la expresión de E6 y E7 puede incrementarse por otros mecanismos como por ejemplo, mutaciones en los sitios de unión a E2²¹.

La proteína E5 es considerada otro oncogén codificado por los HPV-AR, que se expresa en algunos de los casos de CaCu^{22,23}. La comparación filogenética de los genes E5 de varios HPV genitales reveló una correlación entre la secuencia de E5 y el potencial carcinogénico de éste, lo cual sugiere que la proteína E5 pudiera jugar un papel en la carcinogénesis^{24,25}. La progresión ordenada de la historia natural de las lesiones de cérvix puede ser mimetizada en células transfectadas con el DNA de los HPV-AR. Los keratinocitos primarios provenientes de cérvix poseen un número limitado de divisiones en cultivo y pueden ser inmortalizados eficientemente por la co-expresión de E6 y E7 de los HPV-AR^{26,27}. Adicionalmente, las proteínas E6 estimulan la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa, una DNA polimerasa dependiente de RNA que mantiene los extremos cromosomales en las células somáticas proliferantes²⁸. La capacidad de las proteínas E6 y E7 de interferir con las funciones de p53 y pRb respectivamente, y de influir con la actividad de la telomerasa representan las bases de la inmortalización celular^{29,30}, pues estas mismas vías se encuentran

alteradas en los procesos de inmortalización celular independiente a HPV³¹. Las proteínas E6 y E7 también son capaces de interactuar y modular las actividades de otras proteínas celulares, con lo cual contribuyen al efecto carcinogénico³². Notablemente, las proteínas E6 de los HPV-AR se unen a ciertas proteínas que poseen dominios PDZ, incluidas las que supuestamente poseen actividad de supresión tumoral³³⁻³⁶. Los genes E6 y E7 de los HPV-BR no poseen actividad inmortalizante y muestran una capacidad débil de interacción con los blancos celulares, lo cual demuestra que los efectos *in vitro* reflejan el potencial oncogénico observado en los pacientes. A pesar de que las células pueden ser inmortalizadas por secuencias del HPV, estas células no son tumorigénicas en principio. Sin embargo, el pasaje continuo de dichas células resulta en la adquisición de capacidad transformante debido a la inestabilidad genética derivada de la acción permanente de los oncogenes virales al eliminar varios puntos de control celular en la célula. Ello permite su replicación continua a pesar del daño al material genético, lo que resulta en la acumulación de mutaciones por la interferencia de las proteínas virales con la maquinaria de reparación del DNA y, como consecuencia de estos efectos, la inestabilidad genómica y anomalías cromosómicas son un “hallmark” en los cánceres inducidos por HPV³⁷⁻³⁹. Por lo tanto, algunas de las alteraciones genéticas pueden llevar a la activación de oncogenes celulares, inactivar genes supresores e interrumpir otros mecanismos de control con la final consecuencia de la adquisición del fenotipo tumorigénico en células infectadas con HPV⁴⁰. Eventos similares parecen tener lugar en células de lesiones que están en proceso de progresión en mujeres infectadas persistentemente con HPV-AR.

La infección persistente por el HPV-AR es un factor fundamental en el establecimiento del CaCu; sin embargo, existen otros factores de riesgo que elevan la posibilidad de desarrollarlo (fig. 3). Entre los determinantes de

progresión están la ausencia de programas de *screening* y la poca accesibilidad a los recursos diagnósticos; aunque otros factores, como el genotipo viral, la persistencia de la infección, probablemente la carga viral, la integración del DNA viral en el genoma celular y periodos de inmunosupresión en el organismo contribuyen a la aparición de la enfermedad. La predisposición genética representa 27% del efecto de los factores subyacentes para el desarrollo del tumor. La herencia afecta la susceptibilidad a la infección por HPV, la capacidad para resolverla y el tiempo de desarrollo de la enfermedad¹⁹.

El cáncer cervical evoluciona a partir de lesiones premalignas no invasivas, referidas como NICs o lesiones intraepiteliales escamosas (LIEs) (fig. 4).

Histológicamente, las alteraciones precancerosas se gradúan de la siguiente forma:

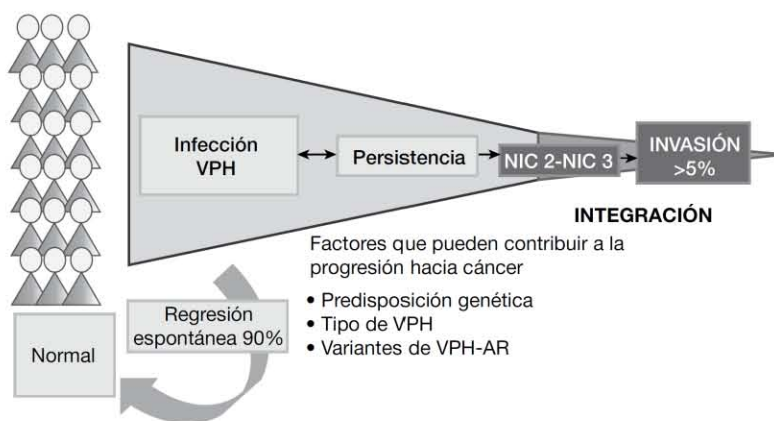
- NIC I: displasia leve
- NIC II: displasia moderada
- NIC III: displasia grave y carcinoma *in situ*

En las extensiones citológicas, las lesiones precancerosas se separan solo en dos grupos:

- Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LIE-BG): corresponden a NIC 1 o condilomas planos
- Lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LIE-AG): corresponden NIC II o III

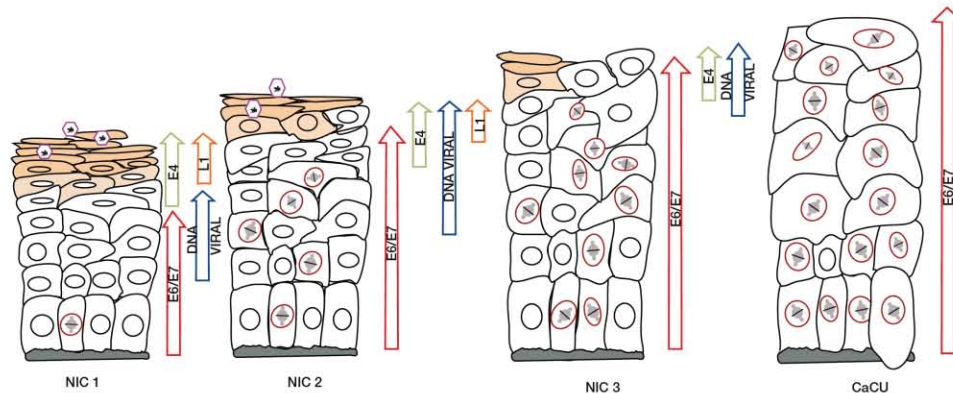
Hasta hoy, es materia de debate si el cáncer cervical generalmente se desarrolla a partir de un epitelio cervical normal infectado —vía una secuencia de lesiones bien reconocidas (NIC I-III) o directamente a través de una vía rápida inducida por lesiones NIC III.

En función del sitio de origen o de la estirpe celular de la cual se origina, el cáncer de cérvix puede ser de tipo epidermoide o escamoso, mixto o adenoescamoso, así como de otras variedades menos frecuentes, como el de células



Normalmente, las infecciones por HPV son aclaradas por el organismo y sólo una pequeña fracción evoluciona hacia lesiones de alto grado (NIC 2/NIC 3) debido a la persistencia de la infección. La acumulación de daños al DNA permite la adquisición del fenotipo maligno con la consecuencia final de desarrollo del CaCu, el cual resulta afectado por diversos factores de riesgo.

Figura 3 Esquema representativo del establecimiento del cáncer cervical.



El proceso carcinogénico inicia con la infección de la célula basal por virus de papiloma humano (HPV). Éste inicia la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 y activa una proliferación celular desmedida (NIC 1). Durante la progresión del cáncer, el patrón de expresión de genes virales cambia. Una vez establecida la infección por HPV las células inician el proceso carcinogénico, el establecimiento de NIC 2 y 3 y la restricción de la producción de viriones infecciosos a áreas cada vez menores del epitelio (representadas en naranja). Finalmente la integración del genoma viral al genoma celular conlleva la sobreexpresión de E6 y E7 (y pérdida de las proteínas E1 y E2). La adquisición del fenotipo maligno implica la expresión de productos adicionales al tumor, tales como metaloproteasas que permiten la invasión de tejidos adyacentes. Adicionalmente, la degradación de proteínas con dominios PDZ por E6 contribuye al establecimiento de la enfermedad y los episomas virales usualmente se pierden.

Figura 4 Evolución de las lesiones intraepiteliales cervicales hacia cáncer y su relación con productos del HPV.

pequeñas. El comportamiento histológico de estos tipos varía. En general, el adenocarcinoma y los carcinomas adenoescamosos son más agresivos que los epidermoides. Los tipos virales más frecuentes en casos de carcinoma invasivo son los HPV 16, 18, 45 y 31, la prevalencia acumulada de estos tipos virales explican 80% de los casos.

Si bien el mecanismo oncogénico inducido por HPV se debe a la expresión conjunta de E6 y E7, existen otros factores que contribuyen al desarrollo carcinogénico entre los que destacan la sobreexpresión, amplificación o pérdida de función de genes.

El gen *c-myc* codifica para una proteína que actúa como regulador transcripcional y se encuentra amplificado en 32-34% de los cánceres de cérvix, lo cual se traduciría en un aumento en el crecimiento y división celular al inducir el paso de G0/G1 a S^{41,42}.

Otra familia de genes que está involucrada en el desarrollo del cáncer es la familia RAS (K-ras, H-ras y N-ras). Ras codifica para una proteína (p21) que se localiza en la parte interna de la membrana y que actúa como un factor intercambiador de GTPasa. Las mutaciones en miembros de la familia Ras son muy frecuentes y provocan aumento en la capacidad de invasión y metástasis, así como disminución de la apoptosis. En cáncer cervical se han encontrado mutaciones en K-ras y H-ras del 10 al 15%⁴³. Garzetti, et al.⁴⁴, encontraron una co-relación de la expresión de ras p21 con el riesgo de metástasis a nódulos linfáticos.

Otro gen supresor de tumores es el inhibidor de la apoptosis *bcl-2* que se encuentra sobre expresado en linfomas y tumores epiteliales⁴⁵. Debido a la función de inhibir apoptosis del producto *bcl-2*, la sobreexpresión de *bcl-2* conlleva la supervivencia celular y ha sido asociada con un fenotipo menos maligno. Dos estudios revelaron sobreexpresión de *bcl-2*

en cáncer cervical en 61-63% y, en ambos casos, estuvo relacionado a una mayor supervivencia celular^{46,47}.

Además de los factores de crecimiento, la sobreexpresión o amplificación de diversos receptores de factores de crecimiento han sido implicados en el desarrollo del cáncer. De manera particular, el receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR) y Her2/neu han sido estudiados en cáncer cervical. El factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia relacionada con los receptores tirosina cinasa: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4). El EGFR se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligandos, incluidos el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) que inducen una cascada de transducción de varias señales, principalmente la MAPK, AKT y las vías de JNK, que conducen a la síntesis de DNA y a la proliferación celular.

Estas proteínas modulan diversos procesos celulares como la migración celular, la adhesión y proliferación. La sobreexpresión de EGFR usualmente está relacionada con la amplificación de su gen, y confiere una ventaja de crecimiento a las células. Este receptor se encuentra sobre expresado en una gran proporción de carcinomas de cérvix, pero también en tejido normal y lesiones precursoras. Aunque la expresión del EGFR, en tejido normal, se encuentra confinada a los estratos basales y parabasales del epitelio, en lesiones pre-malignas e invasoras, la expresión es más difusa⁴⁸. La sobreexpresión de EGFR correlaciona con un pobre pronóstico y metástasis⁴⁹⁻⁵².

Mientras que la angiogénesis es un proceso en el desarrollo de la masa tumoral debido a la expansión del tumor, la expresión del EGFR conlleva a la síntesis del factor de

crecimiento endotelial (VEGF) que inicia con el proceso angiogénico y promoción tumoral, supervivencia y metástasis.

Una alta tasa vascular en tumores de pacientes ha sido asociada con pobre supervivencia en las cuales la densidad microvascular intratumoral actuó como factor pronóstico⁵³. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un fuerte estimulante para la formación de capilares sanguíneos y también ha sido asociado al desarrollo de CaCu debido a que sus ligandos se encuentran frecuentemente expresados en líneas celulares derivadas de cáncer cervical⁵⁴.

Referencias

- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6;348(6):518-527.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 2009;10(4):321-322.
- Bzhalava D, Guan P, Franceschi S, et al. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 2013;445:224-231.
- zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:427-447.
- Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology* 2013;445:213-223.
- Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 2013;445:169-174.
- zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55-78.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30 Suppl 5:F55-70.
- Conway MJ, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res* 2009;88:307.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005;32:7-15.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994;169(2):235-240.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992 Oct 29;327(18):1272-1278.
- Goldie SJ, Grima D, Kohli M, et al. A comprehensive natural history model of HPV infection and cervical cancer to estimate the clinical impact of a prophylactic HPV-16/18 vaccine. *Int J Cancer* 2003;106(6):896-904.
- Cullen AP, Reid R, Champion M, et al. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991 Feb; 65(2):606-612.
- Hopman AH, Smedts F, Dignef W, et al. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 2004;202(1):23-33.
- Bernard HU, Apt D. Transcriptional control and cell type specificity of HPV gene expression. *Arch Dermatol* 1994;130(2):210-215.
- Thierry F, Yaniv M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987;6(11):3391-3397.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(17):1325-1330.
- Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, et al. Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 6):1433-1444.
- Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, et al. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 1994;58(6):803-808.
- Chang JL, Tsao YP, Liu DW, et al. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J Biomed Sci* 2001;8(2):206-213.
- Hsieh CH, Tsao YP, Wang CH, et al. Sequence variants and functional analysis of human papillomavirus type 16 E5 gene in clinical specimens. *Arch Virol* 2000;145(11):2273-2284.
- Bravo IG, Alonso A. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J Virol* 2004;78(24):13613-13626.
- Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337(1):76-84.
- Bedell MA, Jones KH, Grossman SR, et al. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J Virol* 1989;63(3):1247-1255.
- Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, et al. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987;1(3):251-256.
- Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* 2001;75(15):7198-7201.
- Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* 2001;75(12):5559-5566.
- Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, et al. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* 2001;75(9):4467-4472.
- Vaziri H, Benchimol S. Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene* 1999;18(53):7676-7680.
- Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, et al. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 1996;15(8):1950-1960.
- Gardioli D, Kühne C, Glaunsinger B, et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 1999;18(40):5487-5496.
- Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, et al. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 2000;19 (46):5270-5280.
- Lee C, Laimins LA. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2004;78(22):12366-12377.
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, et al. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol* 2000;74(20):9680-9693.
- Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(12):3812-3815.

38. Kaur P, McDougall JK. HPV-18 immortalization of human keratinocytes. *Virology* 1989;173(1):302-310.
39. Iftner T, Elbel M, Schopp B, et al. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* 2002;21(17):4741-4748.
40. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690-698.
41. Riou G, Barrois M, Le MG, et al. C-myc proto oncogene expression and prognosis in early carcinoma of the cervix. *Lancet* 1987;1(8536):761-763.
42. Bourhis J, Le MG, Barrois M, et al. Prognostic value of c-myc proto-oncogene overexpression in early invasive carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 1990;8:1789-1796.
43. Dokianakis DN, Sourvinos G, Sakkas S, et al. Detection of HPV and ras gene mutations in cervical smears from female genital lesions. *Oncol Rep* 1998;5:1195-1198.
44. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, et al. Ras p21 immunostaining in early stage squamous cervical carcinoma: relationship with lymph node involvement and 72 kDa- metalloproteinase index. *Anticancer Res* 1998;18:609-613.
45. Krajewski S, Tanaka A, Takayama S, et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993;53:4701-4714.
46. Tjalma W, Weyler J, Goovaerts G, et al. Prognostic value of bcl-2 expression in patients with operable carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 1997;50:33-36.
47. Tjalma W, DeCuyper E, Weyler J, et al. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:113-117.
48. Lakshmi S, Balaraman Nair M, et al. c-erbB-2 oncoprotein and epidermal growth factor receptor in cervical lesions. *Pathobiology* 1997; 65:163-168.
49. Shen L, Shui Y, Wang X, et al. EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy. *BMC Cancer* 2008;8:232.
50. Cho NH, Kim YB, Park TK, et al. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003;91:343-353.
51. Kersemeakers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:577-586.
52. Kim GE, Kim YB, Cho NH, et al. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. *Clin Cancer Res* 2004;10:1366-1374.
53. Cooper RA, Wilks DP, Logue JP, et al. High tumor angiogenesis is associated with poorer survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1998;4:2795-2800.
54. Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Martínez-Tlahuel J, et al. Expression of platelet derived growth factor family members and the potential role of imatinib mesylate for cervical cancer. *Cancer Cell Int* 2006;6:22.