



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



**PEDECIBA**

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
Universidad de la República - Ministerio de Educación y Cultura

# Estudio de la sensibilización al daño oxidativo en células humanas que expresan las oncoproteínas E6 y E7 del HPV 16

Lic. Silvina Acosta

Agosto 2019

# **Estudio de la sensibilización al daño oxidativo en células humanas que expresan las oncoproteínas E6 y E7 del HPV 16.**

Autor: Silvina Acosta Deccia ([sacosta@fcien.edu.uy](mailto:sacosta@fcien.edu.uy))

Orientador: Wilner Martínez ([wilner\\_martinez@yahoo.com](mailto:wilner_martinez@yahoo.com))

Co-orientador: Enrique Boccardo ([eboccardo@usp.br](mailto:eboccardo@usp.br))

Palabras clave: Antioxidante, Daño en el ADN, Estrés oxidativo, Virus del Papiloma Humano



## **Resumen**

En Uruguay el cáncer de cuello uterino es el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres, llegando a una frecuencia de aproximadamente 318 casos y 137 muertes anuales. Este tumor está etiológicamente asociado a la infección por algunos tipos de virus del papiloma humano (HPV), conocidos como HPV de alto riesgo oncogénico. La infección persistente por estos tipos virales, principalmente por los tipos 16 y 18, está asociada al desarrollo de displasias cervicales severas y carcinomas.

Las células que se encuentran en las lesiones cervicales acumulan daño genético y esto está vinculado a su progresión a la malignidad. Las oncoproteínas E6 y E7 codificadas por estos virus inducen la degradación de p53 y miembros de la familia de la proteína del retinoblastoma (Rb). La inactivación de estos factores celulares provoca supresión de apoptosis, evasión del sistema inmune e inmortalización celular. Sin embargo, la sostenida expresión de estas oncoproteínas no es suficiente para el desarrollo del cáncer, por lo que se ha propuesto que diversos cofactores como, la inflamación crónica por la persistencia de la infección viral, el acúmulo de alteraciones genéticas y de alteraciones en los sistemas reguladores del estrés oxidativo, estarían involucrados en la progresión de esta patología.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el grado de sensibilización al daño oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno en queratinocitos humanos transducidos con los genes E6 y E7 del HPV 16. Mediante el ensayo de resazurina logramos determinar que las células que expresan las oncoproteínas virales E6 y E7 mantienen una mayor resistencia tras el tratamiento con diferentes dosis de peróxido de hidrógeno. Además, mediante el ensayo cometa determinamos que la expresión de las oncoproteínas establecen una lenta reparación del daño primario en el ADN generado por el tratamiento con el agente oxidante y esto promueve una mayor acumulación de daño evidenciado por ensayo de micronúcleos. Esto indicaría que el estado redox de las células que expresan las oncoproteínas virales contribuiría con el proceso de transformación celular.

La incorporación de un agente antioxidante como el ácido ascórbico, nos permitió determinar que la disminución del daño oxidativo en las células que expresan las oncoproteínas virales lleva a una disminución de la acumulación del daño genético, lo que puede sugerir una posible terapia paliativa del efecto perjudicial que tendría el desequilibrio redox intracelular durante la infección por HPV.

## **Abstract**

In Uruguay cervical cancer is the third type of cancer with the highest incidence in women, reaching a frequency of approximately 318 cases and 137 deaths per year. This tumor is associated etiologically with infection by some types of human papillomavirus (HPV), known as HPV of high oncogenic risk. Persistent infection by these types of viruses, mainly types 16 and 18, is associated with the development of severe cervical diseases and carcinomas.

The cells found in cervical lesions accumulate genetic damage and this is linked to their progression to malignancy. The E6 and E7 oncoproteins encoded by these viruses induce the degradation of p53 and members of the retinoblastoma (Rb) protein family. The inactivation of these cellular factors causes suppression of apoptosis, evasion of the immune system and cellular immortalization. However the sustained expression of these oncoproteins is not sufficient for the development of cancer, so it has been proposed that chronic inflammation due to the persistence of viral infection, the accumulation of genetic alterations and alterations in the regulatory systems of oxidative stress, would be involved in the progression of this pathology.

The objective of the present work is to study the degree of sensitization to oxidative damage generated by reactive oxygen species in human keratinocytes transduced with the E6 and E7 genes of HPV 16. Viability assays showed that the cells expressing the viral oncoproteins E6 and E7 maintain a greater survival after the treatment with different doses of hydrogen peroxide. In addition, through the comet assay we determined that the expression of the oncoproteins establish a slow repair of the primary damage in the DNA generated by the treatment with the oxidizing agent and this promotes a greater accumulation of damage evidenced by the micronucleus assay. This would indicate that the redox state of the cells expressing the viral oncoproteins would contribute to the cell transformation process.

The incorporation of an antioxidant agent in assays such as the ascorbic acid, allowed us to determine that the reduction of oxidative damage in cells expressing the viral oncoproteins leads to a decrease in the accumulation of genetic damage, which may suggest a possible palliative therapy of the detrimental effect that the intracellular redox imbalance would have during HPV infection.

## Lista de abreviaturas

8-OHdG	---	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
AA	---	Ácido ascórbico
ADN	---	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	---	Proteína activadora 1
APOBEC	---	Enzima editora de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante al polipéptido catalítico
ARNm	---	Ácido ribonucleico mensajero
ATR	---	Quinasa ataxia-telangiectasia relacionada con Rad3
BARD 1	---	Dominio ring asociado a BRCA1
BRCA 1	---	Cáncer de mama 1
CBMN	---	Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis
CBP	---	Proteínas de unión a CREB
CDK 2	---	Quinasa 2 dependiente de ciclina
CHK 1	---	Enzima serina/treonina proteína quinasa no específica
CIN 1	---	Neoplasia intraepitelial cervical grado 1
CIN 2	---	Neoplasia intraepitelial cervical grado 2
CIN 3	---	Neoplasia intraepitelial cervical grado 3
CO <sub>2</sub>	---	Dióxido de carbono
DCF	---	2,7-diclorofluoresceína
DCFH	---	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	---	2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DDR	---	Respuesta celular al daño del ADN
DMEM	---	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
EGCG	---	Epigallocatequingalato
EGFR	---	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERO	---	Especies reactivas de oxígeno

°C	---	Grados Celsius
GNER	---	Reparación por escisión de nucleótidos global
h	---	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	---	Peróxido de hidrógeno
HCl	---	Ácido clorhídrico
HPV	---	Virus del Papiloma Humano
HPV 16	---	Virus del Papiloma Humano tipo 16
HPV 18	---	Virus del Papiloma Humano tipo 18
HR-HPV	---	Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico
HSIL	---	Lesión intraepitelial escamosa de alto grado
hTERT	---	Telomerasa transcriptasa inversa humana
IDN	---	Índice de división nuclear
i-NOS	---	Isoforma inducible de óxido nítrico sintasa
KCl	---	Cloruro de potasio
$\lambda_{em}$	---	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	---	Longitud de onda de excitación
LR-HPV	---	Virus del Papiloma Humano de bajo riesgo oncogénico
LSIL	---	Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado
LTR	---	Repetición terminal larga
$\mu$ g	---	Microgramos
$\mu$ L	---	Microlitros
$\mu$ M	---	Micromolar
M	---	Molar
mA	---	Miliamperes
mg	---	Miligramos
MHC I	---	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
min	---	Minutos

miRNA	---	Micro ácido ribonucleico
mL	---	Mililitros
mm	---	Milímetros
mM	---	Milimolar
MN	---	Micronúcleos
Na <sub>2</sub> EDTA	---	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetraacético
NaCl	---	Cloruro de sodio
NaOH	---	Hidróxido de sodio
NCR	---	Región no codificante
NF-κB	---	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nm	---	Nanómetros
PBS	---	Buffer fosfato salino
pRb	---	Proteína del retinoblastoma
rpm	---	Revoluciones por minuto
SFB	---	Suero fetal bovino
TCNER	---	Reparación por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción
TLR 9	---	Receptor tipo Toll 9
TNFR	---	Receptor del factor de necrosis tumoral
U	---	Unidades
UV	---	Radiación ultravioleta
V	---	Volts
XRCC 1	---	Proteína de complemento cruzado de reparación de rayos X

## Tabla de contenido

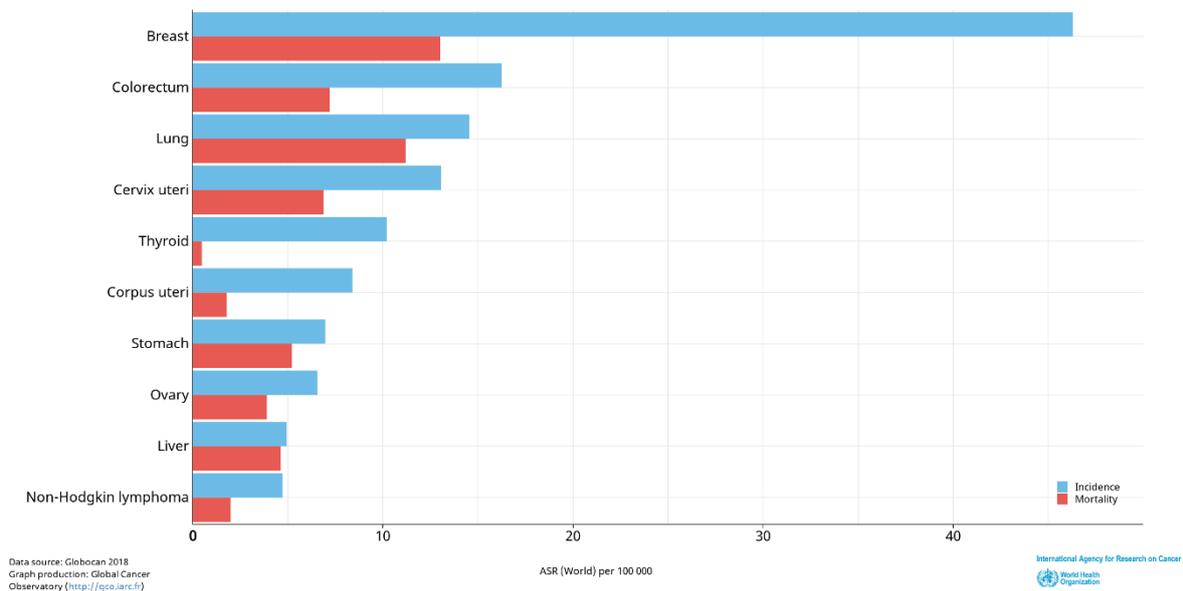
<b>Introducción</b> .....	1
Epidemiología del cáncer de cuello uterino .....	1
Etiología y curso de la enfermedad .....	3
Virus del Papiloma Humano .....	4
Mecanismos carcinogénicos de HPV .....	7
Oncoproteína E6.....	8
Oncoproteína E7.....	10
Inestabilidad genómica.....	12
Rol del estrés oxidativo en cáncer cervical .....	14
Inflamación crónica y HPV .....	15
Antioxidantes en cáncer cervical.....	16
Control redox como abordaje terapéutico .....	18
<b>Hipótesis</b> .....	21
<b>Objetivo general</b> .....	21
Objetivos específicos.....	21
<b>Materiales y métodos</b> .....	22
Líneas celulares .....	22
Transducción con vectores retrovirales .....	22
Cultivos celulares .....	23
Análisis citogenético de las líneas celulares.....	23
Tratamiento con peróxido de hidrógeno.....	23
Determinación de la viabilidad celular mediante el método de resazurina .....	23
Estudio de especies reactivas del oxígeno (ERO) intracelular .....	24
Evaluación del daño en el ADN .....	24
Ensayo de micronúcleos (MN).....	24
Ensayo cometa.....	25
Ácido ascórbico como scavenger .....	26
Ensayo de toxicidad.....	26
Ensayo de micronúcleos .....	26
Análisis estadístico .....	27
<b>Resultados</b> .....	28
Análisis citogenético de las líneas celulares.....	28

Determinación de la viabilidad de las líneas celulares al ser tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	28
Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares .....	30
Ensayo de micronúcleos .....	32
Ensayo cometa.....	33
Ensayo de citotoxicidad del ácido ascórbico (AA) .....	34
Ensayo de micronúcleos con pre-tratamiento con ácido ascórbico.....	35
<b>Discusión</b> .....	<b>37</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>42</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>43</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>44</b>

# Introducción

## Epidemiología del cáncer de cuello uterino

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es el cuarto tipo de cáncer con mayor incidencia en mujeres, registrándose un promedio anual de 13,1 casos por 100.000 en el año 2018 y el nivel de mortalidad que produce esta enfermedad también la sitúa en la misma posición con 6,9 casos cada 100.000 (**Fig. 1**) (WHO, 2018). Es un problema de salud que incide fundamentalmente en regiones menos desarrolladas, donde la tasa de incidencia alcanza hasta 43,1 casos por 100.000 (región sur de África), en comparación a países del primer mundo donde la tasa desciende a 6,0 casos cada 100.000 (Australia y Nueva Zelanda)(Globocan, 2018).



**Figura 1.** Gráfico de incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial. Fuente: International Agency for Research of Cancer (World Health Organization).

En Uruguay, el Registro Nacional de Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer ha reportado en el periodo de 2011-2015 que el cáncer de cuello de útero se ubica en la tercera posición de cáncer de mayor incidencia en mujeres, con una tasa de 14,7 por 100.000, mayor que la media mundial, teniendo en este periodo de 5 años un promedio anual de 318 casos, casi un caso nuevo por día, acompañado de un promedio de 137 casos de muerte anuales (CHLCC, 2015).

De acuerdo a los datos recabados en el periodo 2010-2014 por el Registro Nacional de Cáncer, el pico de mayor incidencia de esta enfermedad se da en mujeres de 45-49 años extendiéndose

el número de casos elevados hasta los 69 años de edad (Registro Nacional de Cáncer, 2018), estos datos concuerdan con aquellos registrados por la Globocan 2018 que ubica al cáncer de cuello uterino en la segunda posición de mayor incidencia de cáncer en mujeres entre 30 y 69 años (IARC, 2018).

Si bien no hay registro nacional de incidencia y mortalidad generada por este tipo de cáncer en el pasado año, la Globocan reporta que las cifras en Uruguay no son mejores a aquellas registradas a nivel mundial, sino que la incidencia en nuestra población aumenta a 14,6 por 100.000 ubicando al cáncer de cuello uterino en la tercera posición de incidencia de cánceres en mujeres y en cuanto a la mortalidad generada en el año 2018 se registraron 7,1 casos por 100.000 (Globocan, 2018).

En las últimas décadas, tanto la incidencia como la mortalidad por cáncer de cuello uterino han disminuido gracias al desarrollo de varias estrategias que se han puesto en práctica. La que ha demostrado mayor efectividad es la prevención secundaria (detección de estadios precoces para evitar la progresión de la enfermedad) a través del cribado regular de este cáncer y lesiones precursoras, mediante la citología de Papanicolaou, estableciéndose como una estrategia capaz de reducir la mortalidad poblacional por cáncer de cuello de útero al aplicarse como programa de tamizaje obligatorio en mujeres desde los 21 a los 69 años (Richardson et al., 2003; Arbyn et al., 2004).

Por otro lado, como prevención primaria (evitar la adquisición de la enfermedad), en Uruguay se realizan diversas campañas de difusión y concientización, además de la incorporación desde el año 2013 de la vacuna Gardasil contra el HPV (tipos 6,11, 16 y 18) para todas aquellas adolescentes al cumplir los 12 años en esquema de dos dosis. Tanto la vacuna Gardasil como la Cevaxix (tipos 16 y 18), han demostrado la disminución en la prevalencia del virus y lesiones (Brotherton et al., 2011; Mesher et al., 2016).

Si bien estas estrategias planteadas a nivel nacional han sido satisfactorias, las cifras que presenta Uruguay en la actualidad no alcanzan para posicionarnos en el grupo de los países desarrollados y hacen que el cáncer de cuello uterino, enfermedad de progresión lenta y prevenible, continúe siendo un problema sanitario que requiere alta inversión en prevención primaria, secundaria y tratamientos.

## **Etiología y curso de la enfermedad**

Las etapas de la carcinogénesis asociada al HPV incluyen fundamentalmente la infección viral, su persistencia, generación de lesiones precancerosas y finalmente la adquisición de la capacidad de invasión por parte de las células tumorales.

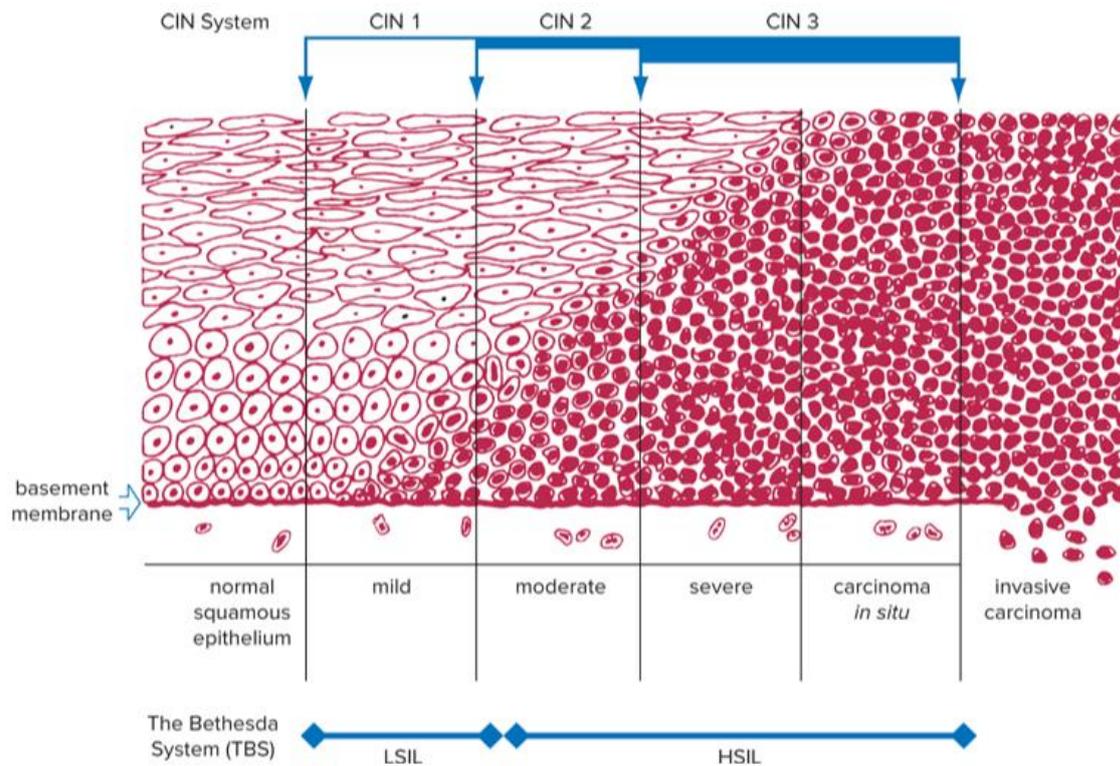
El 99,7% de los casos de cáncer de cuello uterino son causados por el Virus del Papiloma Humano (HPV), virus que se transmite principalmente a través del contacto sexual aunque la transmisión madre-hijo también es posible (WHO, 2019). Además, este virus se ha relacionado con porcentajes relevantes de otros tipos de cáncer: anal, vaginal, de vulva y pene, así como también de cabeza y cuello (Trottier & Burchell, 2009). Otras afecciones también se relacionan con ciertos tipos de virus pertenecientes a esta familia como por ejemplo, las verrugas genitales y la papilomatosis respiratoria, enfermedad que genera lesiones benignas exofíticas en el tracto respiratorio, que, sin tratamiento pueden obstruir completamente las vías aéreas (WHO, 2019).

La mayoría de las infecciones por HPV son transitorias (80% desaparece) ya que el virus es eliminado espontáneamente por el sistema inmune en aproximadamente 12 meses (Rodríguez et al., 2008). Para la persistencia de la infección se han establecido factores de riesgo como el tipo del virus infeccioso, el estado inmunitario, la co-infección con otros patógenos transmitidos sexualmente y ser tabaquista (WHO, 2019).

Clínicamente los HPV pueden clasificarse como de bajo riesgo (LR-HPV) o de alto riesgo (HR-HPV) oncogénico de acuerdo a su asociación con el cáncer de cuello uterino. Los LR-HPV son capaces de generar principalmente condilomas (verrugas genitales) y displasias moderadas con baja tendencia a la transformación maligna. Por otro lado, los HR-HPV pueden causar displasias cervicales severas que pueden evolucionar a carcinomas. Dentro de los HPV de alto riesgo el más importante es el HPV tipo 16. Este virus es detectado en el 40% de las displasias cervicales y el en más de 50% de los cánceres cervicales. Además, el HPV 18 es responsable por el 12-20% de los cánceres de cuello uterino (Cogliano et al., 2005; Schiffman et al., 2005; Turcu & Ventii, 2010; Schiffman & Wentzensen, 2013).

Es así como se describen diferentes estadios en la historia natural de la neoplasia cervical (**Fig. 2**). Las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado de transformación (LSIL) representan infecciones agudas y se han observado tanto para tipos de HPV de alto y bajo riesgo oncológico constituyendo lesiones que pueden revertir a la normalidad en el 57% de los casos y que histológicamente representan neoplasias intraepiteliales cervicales 1 (CIN 1), displasias leves.

Por otro lado, las lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL) incluyen a las CIN 2 (displasias moderadas) y CIN 3 (displasias severas y carcinoma *in situ*), pudiendo revertir en un 30% de los casos pero más del 12% progresan a carcinoma invasivo (den Boon et al., 2015; Murtagh et al., 2018).



**Figura 2.** Representación esquemática de la progresión de lesiones epiteliales provocadas por HPV hacia la malignidad. El proceso de transformación celular avanza desde el epitelio escamoso normal hasta carcinoma invasivo, pasando por diferentes etapas intermedias que citológicamente se clasifican como: LSIL (lesión intraepitelial de bajo grado) y HSIL (lesión intraepitelial de alto grado) e histológicamente como CIN (neoplasia intraepitelial cervical). Fuente: Murtagh et al., 2018.

### Virus del Papiloma Humano

En la actualidad son más de 200 tipos de HPV los que se conocen y se clasifican filogenéticamente en los géneros Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu. Los miembros del género Alfa son capaces de infectar la superficie mucocutánea anogenital y la mucosa del tracto superior aero-digestivo; son capaces de producir infecciones asintomáticas, generar verrugas y entre ellos se encuentran los de alto riesgo oncogénico previamente descritos (Doorbar et al., 2012; Schiffman et al., 2016).

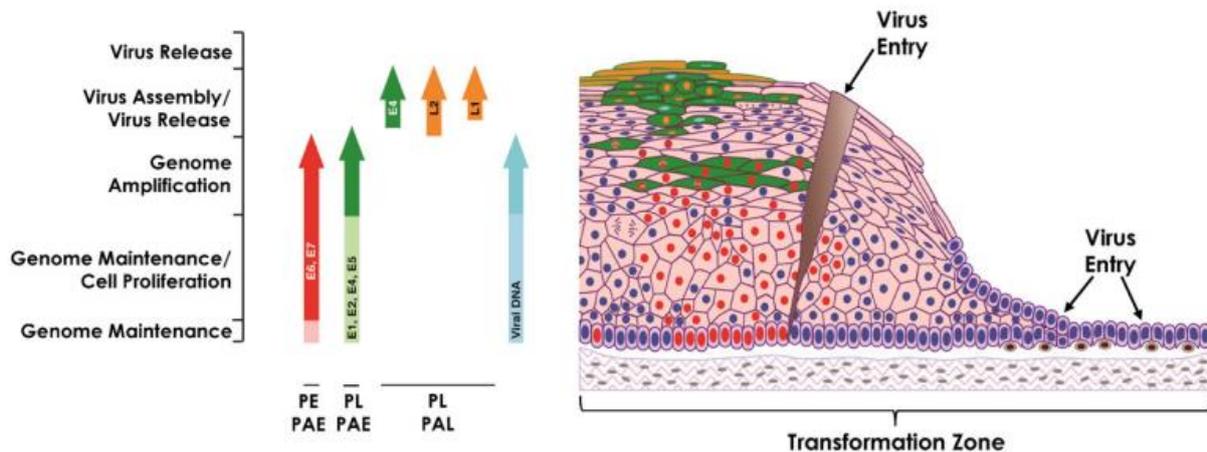
Biológicamente, todos los HPV comparten una organización genómica común y requieren de diferenciación epitelial para completar su ciclo viral. Son virus de pequeño tamaño, sin envoltura, con cápside icosaédrica y genoma de ADN doble cadena circular (Schiffman et al., 2016).

El genoma de HPV se divide en tres regiones: una no codificante (NCR) que contiene elementos genéticos para la replicación y transcripción del genoma viral y es responsable del rango de huésped y tropismo tisular de cada tipo de HPV, una región de transcripción temprana (E de *early*) y otra tardía (L de *late*). La región de transcripción temprana codifica proteínas altamente conservadas entre los diferentes tipos de virus como E1 y E2 (encargadas de la replicación del genoma viral) (Modis et al., 2002) y proteínas con alta variabilidad como E4, E5, E6 y E7, que en general se encargan de facilitar la replicación viral, son responsables de la patogenicidad del virus y regulan las fases vegetativa y productiva del ciclo (Doorbar et al., 2012; Schiffman et al., 2016). Por su parte, la región de transcripción tardía codifica proteínas altamente conservadas que son L1, L2 (encargadas del ensamblaje) (Modis et al., 2002).

El proceso infeccioso de este virus inicia con la entrada de la partícula viral mediante la unión de la proteína L1 a proteoglicanos de la superficie de queratinocitos estimulando su endocitosis (Sapp & Bienkowska-Haba, 2009). Dentro de la célula se desensambla del endosoma y como episoma, aun unido a L2, va al aparato de Golgi, retículo endoplasmático y finalmente al núcleo donde se producen bajos niveles de las proteínas tempranas. Las proteínas E1 y E2 inician la replicación y gracias a la maquinaria celular se generan bajas copias del episoma (de 50 a 100 por célula). E6 y E7 evitan que el ciclo celular se detenga, así como también que la célula entre en apoptosis o inicie el programa de diferenciación. A medida que las células infectadas proliferan hacia las capas superiores del epitelio, la expresión de todos los genes virales potencia la replicación del episoma aumentando significativamente el número de copias por célula. En las capas superficiales se induce la producción de L1 y L2 y el ensamblaje del virión para su posterior liberación. En algunas ocasiones y de manera accidental, el genoma de virus HR-HPV puede integrarse en el genoma de la célula, conduciendo a la desregulación de la expresión de las proteínas E6 y E7 lo que desencadena una serie de consecuencias que se discutirán más adelante (Doorbar, 2006).

Estos virus presentan un tropismo específico por células epiteliales, y su ciclo viral se encuentra altamente asociado al programa de diferenciación del epitelio hospedero (Pyeon et al., 2009). Como muestra la **Figura 3**, en una primera instancia, las partículas virales deben acceder a la

capa basal del epitelio una vez que la barrera epitelial esté comprometida o a sitios donde los queratinocitos basales se encuentren expuestos (ej.: en la unión escamocolumnar del tracto genital femenino), al infectar células en división generan un bajo número de episomas nucleares. A medida que estas células se dividen y entran a la capa parabasal, van cursando el proceso de diferenciación, durante el mismo la expresión viral es baja. Es en las capas medias del epitelio donde se da la amplificación del genoma viral, mientras que el ensamblaje de las partículas y su consiguiente liberación se da desde células de las capas más superficiales del epitelio diferenciado para buscar nuevas células hospederas.



**Figura 3.** Representación esquemática del ciclo viral. La infección se da en las células epiteliales expuestas de la capa basal, luego, a medida que las células avanzan en las diferentes capas del epitelio se da la expresión diferencial de las proteínas virales que le permiten avanzar en las diferentes etapas del ciclo viral hasta alcanzar su liberación. Fuente: Doorbar et al., 2012.

Al comparar un epitelio normal, uno infectado con LR-HPV y uno con HR-HPV se establecen algunas diferencias. Las células de un epitelio normal entran en su ciclo y proliferan en las capas: basal y parabasal, siendo estimuladas por factores de crecimiento. En el caso de una infección por LR-HPV, en las capas superiores, las proteínas E6 y E7 estimulan la entrada al ciclo de la célula pero no su proliferación (la cual es levemente mantenida por factores de crecimiento), permitiendo la amplificación del genoma. Finalmente la infección por HR-HPV, provoca que la expresión de E6 y E7 estimulen la entrada al ciclo y proliferación de las células en todas las capas del epitelio conduciendo, de manera accidental, a una posible neoplasia (Doorbar et al., 2012).

En el proceso de carcinogénesis participan diferentes factores, por un lado la progresión de LSIL a HSIL han sido vinculadas a la integración del genoma viral en el del hospedero, la

inactivación de genes supresores de tumores y desregulación del ciclo celular (Jayshree et al., 2009). La persistencia del virus en las células aumenta la probabilidad de su integración, y esta persistencia está dada fundamentalmente porque el ciclo viral es exclusivamente intraepitelial por lo que no se genera viremia ni induce la lisis celular una vez liberado, de esta forma, la infección por HPV logra la evasión del sistema inmune (Stanley, 2012). A pesar de que los queratinocitos son centinelas inmunitarios pudiendo iniciar estados antivirales en respuesta a patógenos, el HPV logra interferir con la cascada de producción y liberación de interferones y citoquinas. Si bien estas tácticas contribuyen a su persistencia, en la mayoría de los casos el sistema inmune logra resolver la infección (Tummers & van der Burg, 2015).

### **Mecanismos carcinogénicos de HPV**

En la evolución de las lesiones hacia la carcinogénesis, los genes virales E6 y E7 se sobre-expresan, conduciendo a la inactivación de puntos de control del ciclo celular, aumentando la inestabilidad genómica y siendo capaces de promover la transformación celular (Shukla et al., 2014).

La sobre-expresión está dada por la desregulación de los oncogenes virales (E6 y E7) ya sea por cambios genéticos y epigenéticos del genoma del virus o por la integración del genoma de HPV de alto riesgo en el genoma de la célula huésped.

En condiciones normales, las células infectadas contienen al virus como episoma y la proteína viral E2 regula directamente la transcripción del resto de los genes de expresión temprana, provocando una represión de los mismos. En tumores que tienen ADN viral extracromosómico exclusivamente, la desregulación puede estar dada por la metilación de los sitios de unión de la proteína E2 (Bhattacharjee & Sengupta, 2006). Sin embargo, lo más frecuente es que en los tumores el ADN viral se encuentre integrado al genoma del huésped. Si bien la integración ocurre aleatoriamente en el genoma de la célula huésped la interrupción del genoma viral ocurre principalmente en el gen de E2 lo cual interrumpe la expresión de esta proteína. Cuando alguno de estos dos mecanismos suceden se conduce a una desregulación de la expresión de los genes tempranos así como también a la adquisición de ventajas de crecimiento celular (Bailly et al., 1989; Jeon et al., 1995). La integración también provoca que el ciclo viral se detenga ya que deja de ser capaz de generar su genoma circular, que sea empaquetado y transmitido a una nueva célula (McBride & Warburton, 2017).

Aunque las oncoproteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo son las principales proteínas responsables de la transformación, se ha demostrado que la proteína E5 tiene un rol cooperativo contribuyendo a la progresión tumoral (Bouvard et al., 1994; DiMaio & Mattoon, 2001). Si bien E5 tiene menor actividad transformante *per se*, es capaz de promover la actividad de E6 y E7 actuando principalmente en las etapas tempranas de la infección viral y la transformación (Moody & Laimins, 2010).

La proteína E5 se localiza principalmente en las membranas del retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Se ha relacionado a esta proteína con los receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR). En células que expresan la proteína E5 se ha determinado una disminución en la degradación de EGFR y el mecanismo implicado sería que E5 podría unirse a la subunidad proteica de las vacuolas de degradación retrasando la acidificación de las mismas, de esta forma el receptor puede continuar hacia la vía de reciclaje y ubicarse nuevamente en la membrana celular, promoviendo un estado de proliferación continuo (Pim et al., 1992; Straight et al., 1995; Wasson et al., 2017). Otro rol fundamental de E5 es la retención del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) en el aparato de Golgi, evitando su expresión en la membrana celular y la presentación de antígenos virales a las células T, modulando así el sistema inmune (Ashrafi et al., 2006).

El objetivo del virus no es promover la carcinogénesis, sino generar más partículas virales que serán liberadas para amplificar la infección. Para esto requiere perpetuar la vida de su célula hospedera ya que necesita de su maquinaria de replicación, además de mantenerse desapercibido frente al sistema inmune. De este modo, las oncoproteínas E6 y E7 de HPV interactúan con diversas moléculas blanco para conseguirlo. La sobre-expresión y la integración del genoma promueven que estas interacciones a diferentes niveles contribuyan al proceso de carcinogénesis. A continuación se mencionarán los principales mecanismos de acción.

### Oncoproteína E6

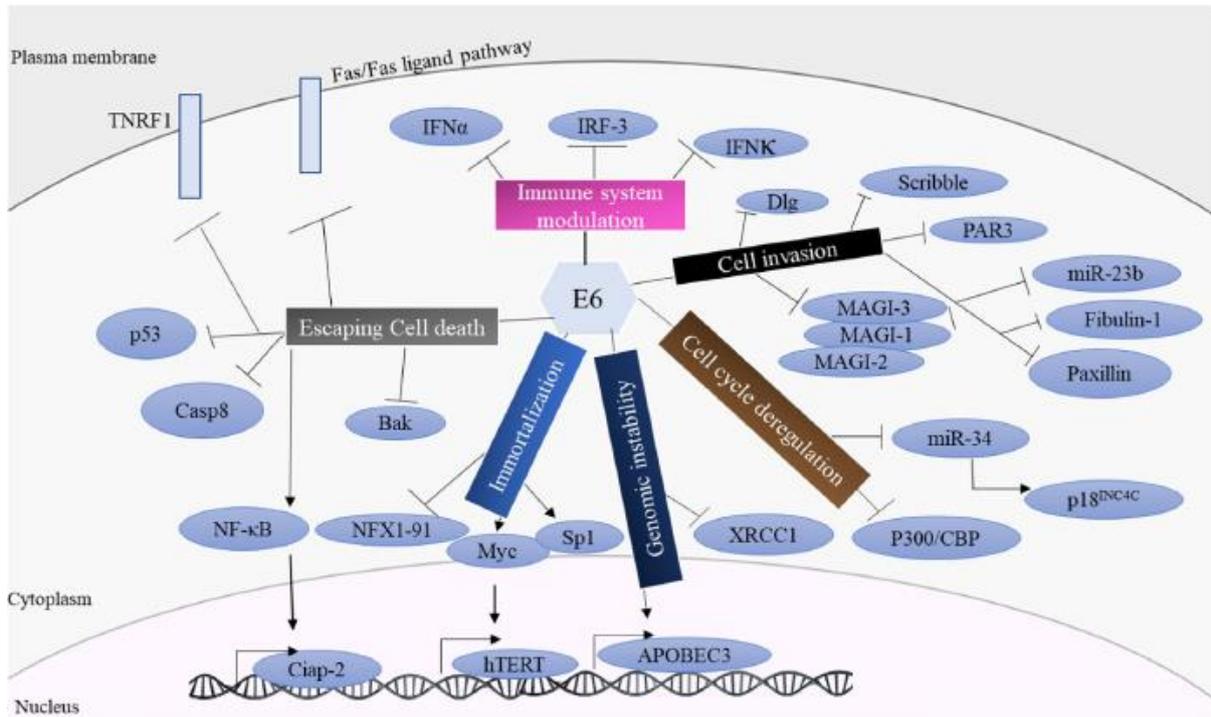
En la célula, la oncoproteína E6 se localiza fundamentalmente en el núcleo celular e interactúa con un amplio rango de moléculas involucradas en la modulación del sistema inmune, invasión, desregulación del ciclo celular, inestabilidad genómica, inmortalización celular y muerte celular (**Fig. 4**).

- Evitar la muerte celular. Con el fin de completar el ciclo, E6 impide que la célula hospedera muera mediante diferentes mecanismos, permitiendo que células con defectos genómicos

sobrevivan y continúen proliferando. El mecanismo más reconocido es el de su interacción con la proteína ubiquitin-ligasa E6AP para promover la ubiquitinación de p53 para su degradación proteosómica, resultando en la supresión de apoptosis (Martinez-Zapien et al., 2016).

Además, E6 es capaz de acelerar la degradación de la proteína pro-apoptótica procaspasa 8 (Filippova et al., 2007), así como también unirse al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) inhibiendo la entrada a apoptosis en fibroblastos de ratón sensibles a TNF (Filippova et al., 2002).

- Desregulación del ciclo celular. Aún en presencia de inestabilidad genómica, E6 permite evadir puntos de control del ciclo de las células. Es capaz de inactivar el complejo p300/CBP (Patel et al., 1999) y regular miRNAs que controlan la progresión del ciclo y así entrar en fase S (Wang et al., 2011).
- Modulación del sistema inmune. Para permanecer desapercibido, actúa sobre el factor de transcripción de interferón  $\beta$  e impide la unión de interferón  $\alpha$  a su receptor disminuyendo la respuesta inmune contra los antígenos de HPV (Li et al., 1999; Howie et al., 2009).
- Inmortalización celular. La proliferación sin límites está promovida por E6 que induce la expresión de subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) mediante dos mecanismos: la degradación de su represor y la estimulación de su promotor (Pańczyszyn et al., 2018).
- Invasión celular. E6 estimula la degradación proteolítica de proteínas que regulan las interacciones intercelulares, que participan en la polarización y diferenciación celular y de adhesión a la matriz extracelular (Howie et al., 2009), de esta forma regula la polaridad y motilidad celular, procesos involucrados en la metástasis



**Figura 4.** Representación esquemática de la capacidad de la proteína E6 de HPV de modular diversos procesos celulares mediante la interacción con múltiples moléculas blancas. Fuente: Estêvão et al., 2019.

### Oncoproteína E7

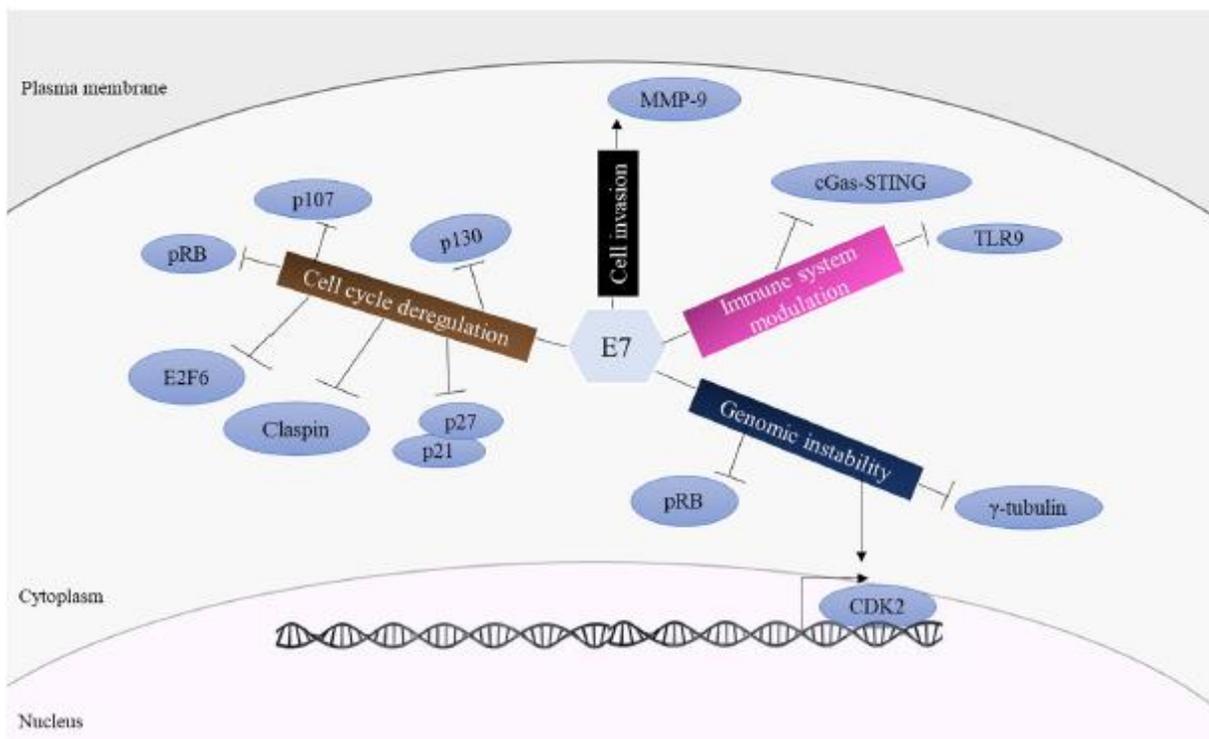
La pequeña proteína E7 ha sido localizada tanto en núcleo como en fracciones citoplasmáticas, dado que presenta secuencias de localización nuclear y de exportación nuclear que le permiten pasar de un compartimiento a otro (Knapp et al., 2009). La expresión de esta proteína tiene un rol central en ciclo viral ya que participa en la reprogramación del ambiente celular para conseguir la replicación del virus (**Fig. 5**). Se ha determinado que E7 de HPV de alto riesgo oncogénico es suficiente para alcanzar la immortalización celular, pero que la actividad junto a E6 potenciaría su acción.

- Desregulación del ciclo celular. El principal mecanismo oncogénico de la proteína E7 es la unión a los miembros de la familia supresora de tumores retinoblastoma (Rb) al inducir su ubiquitinación para la degradación proteosómica. De esta manera el factor E2F queda libre y activo para permitir la expresión de los genes de fase S ciclina A y E, y la acumulación de p16INK4a (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina) (Hwang et al., 2002).

Por otro lado, se ha determinado otro mecanismo para E7 que consiste en la capacidad de esta proteína de evitar la formación del complejo DREAM el cual responde a p53 y se recluta hacia promotores de genes del ciclo celular para su represión. De esta forma la

función de p53 puede verse afectada por E7 independientemente de E6. (Fischer et al., 2017), además de inhibir al represor transcripcional de fase S E2F6 (McLaughlin-Drubin et al., 2008).

- Modulación del sistema inmune. E7 interfiere en la vía de señalización de interferón, inhibe el *Toll-like receptor-9* (TLR9) y bloquea el inicio de una de las vías de detección de ADN citoplasmático del sistema inmune innato (Estêvão et al., 2019).
- Invasión celular. En la progresión del cáncer cervical, E7 estimula la expresión de la metaloproteinasas 9 capaz de degradar componentes de la matriz extracelular, favoreciendo la invasión (Cardeal et al., 2012).



**Figura 5.** Representación esquemática de los procesos celulares afectados por la interacción de la proteína E7 de HPV con diversas moléculas blanco. Fuente: Estêvão et al., 2019.

Aunque ambas proteínas tienen blancos moleculares específicos, también presentan blancos en común y de esta forma alcanzan una acción cooperativa de mayor eficiencia para lograr la desestabilización de la regulación celular y provocar la transformación maligna. Son capaces de aumentar la glicólisis aeróbica característica de las células malignas para crecer en condiciones anormales. Mantienen la progresión tumoral estimulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y así la expresión de factores pro-angiogénicos y quimioquinas pro-tumorales. También participan en el desarrollo de inestabilidad genómica, evento temprano

y fundamental de la carcinogénesis ya que las lesiones cervicales deben acumular daño genético para poder progresar a la malignidad e invasión (Estêvão et al., 2019).

### Inestabilidad genómica

La aceleración de la proliferación celular promovida por ambas oncoproteínas facilita la acumulación de defectos genéticos, tales como deleciones, amplificaciones, translocaciones y reordenamientos cromosómicos en general, constituyendo eventos que se observan en etapas tempranas de la infección viral y han sido detectados en lesiones pre-malignas asociadas a HPV de alto riesgo.

En relación al desbalance cromosómico, en lesiones precursoras de cáncer cervical se ha identificado un patrón complejo de cambios cromosómicos, que incluyen la tetrasomía que puede ser promovida únicamente por E7 y la poliploidía inducida tanto por E6 como por E7 al anular el punto de control post-mitótico (Liu et al., 2007). La ganancia por duplicación o amplificación de los cromosomas 1, 3q, 5p, 6p, 7, 8q, 9q, 16q y 20, y la pérdida por deleción de 2q, 3p, 4q, 6q, 11q, 13q, 16, 17 y 19, son eventos frecuentemente encontrados en células de cáncer cervical y de lesiones precursoras (Boccardo, 2010).

La expresión de E7 induce errores en la duplicación primaria del centrosoma, generando un aumento del número de centrosomas, formación de husos mitóticos multipolares, mala segregación de cromosomas y aneuploidía (Duensing & Munger, 2004). Esto es producto de la síntesis anormal de centrosomas y de la generación de aberraciones al degradar la  $\gamma$ -tubulina y aumentar la actividad de CDK2 que aumenta la desestabilización del genoma (Nguyen et al., 2007).

Por otro lado, alteraciones en los sistemas de reparación del ADN han sido relacionadas a la expresión de las oncoproteínas de HPV de alto riesgo. Determinando la modulación de la respuesta de las células al daño en el ADN que, junto a la capacidad de reentrada a fase S que otorgan las oncoproteínas, las células continúan proliferando aun estando dañadas.

La oncoproteína E6 puede conducir a la acumulación de mutaciones, por ejemplo, al regular a miembros de la familia de APOBEC que se encarga de reemplazar citosina por uracilo (Vieira et al., 2014). La expresión de esta oncoproteína con la consecuente inactivación de p53 se ha asociado a un aumento de mutagénesis espontánea (Havre et al., 1995).

También se ha relacionado a E6 con defectos en la vía genómica global del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (GNER), siendo deficiente en la reparación de dímeros de pirimidina ciclobutano y 6-4 fotoproductos inducidos por UV (Ford et al., 1998). Así como también se asocia a defectos en la sub-vía de reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción (TCNER) que se encarga de remover el daño específicamente de la hebra transcripta de genes activos (Therrien et al., 1999).

Además de interactuar con las proteínas XRCC1 y la O<sup>6</sup>- metil guanina metil transferasa involucradas en la reparación de roturas de simple hebra de ADN (Iftner et al., 2002; Srivenugopal & Ali-Osman, 2002), E6 interactúa con dos proteínas BARD1 y BRCA1 implicadas en la reparación de roturas de doble hebra por homología (Wallace & Galloway, 2014).

Se ha demostrado la colaboración de la oncoproteína E7 en la evasión de la reparación del ADN. En células que expresan E7 se ha determinado una acelerada degradación de claspina, regulador de la cascada ATR/CHK1, de esta forma se atenúa el punto de control de daño en el ADN (Spardy et al., 2009).

En forma conjunta ambas oncoproteínas promueven modificaciones epigenéticas, actúan sobre los patrones de metilación genómica al regular las enzimas metiltransferasas. Los eventos de hipermetilación conducen al silenciamiento de genes supresores de tumores con actividad en la adhesión, inflamación y regulación del ciclo celular, estimulando la progresión del cáncer, invasión y metástasis. Las oncoproteínas son capaces de interactuar con histonas acetiltransferasas (inhibición del complejo p300/CBP) y E7 en particular es capaz de unirse a histonas deacetilasas de clase I (HDACs 1, 2, 3 y 8). Estas HDACs regulan la transcripción de genes E2F, cuya expresión se ha visto aumentada en células que expresan E7. Así son capaces de modular la actividad transcripcional y estimular la progresión del ciclo celular de G1 a S (Longworth et al., 2005; Wallace & Galloway, 2014).

La infección persistente por HPV de alto riesgo, la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera y la sobre-expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, son factores que contribuyen la acumulación de daño y proliferación celular descontrolada que conduce a la conversión a la malignidad. Sin embargo, se ha propuesto a la inflamación crónica como un cofactor en la carcinogénesis, ya que varios estudios han demostrado la correlación positiva entre el infiltrado de células inflamatorias y las lesiones de alto grado.

## **Rol del estrés oxidativo en cáncer cervical**

A pesar del rol central de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV en la inducción de la inestabilidad genómica, varios estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado que la infección por HPV y la sostenida expresión de sus oncoproteínas no son suficientes para el desarrollo del cáncer. Así, eventos adicionales del virus y del hospedero son requeridos para inducir la transformación celular. En este sentido, se ha propuesto que el microambiente oxidativo durante la inflamación crónica contribuye a la carcinogénesis cervical y a la progresión tumoral (Mangino et al., 2016).

En el organismo se producen especies oxidantes continuamente como productos secundarios de la respiración aerobia y en procesos como inflamación, infecciones, estrés mecánico y químico, exposición a UV y a radiación ionizante. Las principales especies reactivas de oxígeno (ERO) son el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, y las de nitrógeno: óxido nítrico (formado por acción de la enzima óxido nítrico sintasa), que al reaccionar con superóxido forma peroxinitrito (Ye et al., 2015).

En condiciones normales el daño a biomoléculas se evita por la presencia de antioxidantes, en el organismo los principales antioxidantes son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas y las moléculas tocoferol, glutatión, carotenos y ácido ascórbico. Cuando los oxidantes desbordan la capacidad antioxidante y provocan daño a biomoléculas se habla de estrés oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Uno de los procesos donde se da un desbalance redox es durante la inflamación, el primer paso en la defensa inmunológica frente a estímulos dañinos, e implica la activación de células del sistema inmune que migran al sitio de inflamación donde liberan citoquinas y ERO. Las principales células implicadas son neutrófilos, eosinófilos, monocitos y fibroblastos, y los linfocitos son reclutados por las citoquinas liberadas (Charo & Ransohoff, 2006). La persistencia de ciertas citoquinas puede promover la inflamación crónica, constituyendo finalmente un proceso dañino para el hospedero. Este estado de inflamación persistente ha sido establecido en varias enfermedades incluyendo al proceso de carcinogénesis donde participa en la transformación, proliferación e invasión celular así como también en la angiogénesis (Coussens & Werb, 2002; Aggarwal et al., 2006).

Los altos niveles de ERO liberados durante la inflamación inducen daño a los componentes de la célula, sus proteínas, lípidos y daño genotóxico, incluyendo rupturas de cadena simple y

doble, *crosslinks* (o uniones cruzadas) entre ADN y proteínas, así como la generación de bases modificadas, creando condiciones favorables para la transformación maligna (Federico et al., 2007).

### Inflamación crónica y HPV

La persistencia de la infección viral por HPV favorece el desarrollo de inflamación crónica y de esta forma la generación de estrés oxidativo (Williams et al., 2011). Este hecho ha sido evidenciado por el aumento de citoquinas pro-inflamatorias en mujeres con infecciones persistentes (Kemp et al., 2010), elevados niveles de nitrito/nitrato en plasma sanguíneo de mujeres con HSIL (Sowjanya et al., 2016), el análisis histopatológico de lesiones severas provocadas por HPV con grandes infiltrados inflamatorios (Hammes et al., 2007; Boccardo et al., 2010) y la disminución de antioxidantes en pacientes con cáncer cervical (Lee et al., 2005).

A pesar del rol de E5, E6 y E7 en la proliferación celular y la inestabilidad genómica previamente descrito, estas oncoproteínas promueven directamente el proceso inflamatorio. Son capaces de aumentar la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 la cual aumenta la generación de prostaglandinas involucradas en la proliferación celular, inhibición de apoptosis y angiogénesis en el tejido cervical (Subbaramaiah & Dannenberg, 2007).

En los procesos tumorales, el elevado ambiente oxidativo se acompaña de una disminución del estado antioxidante. Varios estudios han evidenciado en mujeres con cáncer de cuello uterino bajos niveles de las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa, principales enzimas antioxidantes, así como también disminución de ácido ascórbico (Manju et al., 2002; Naidu et al., 2007). Esto podría ser consecuencia de su alta demanda en el proceso oxidativo como *scavenger* así como también por su secuestro por las células tumorales.

La generación de lesiones oxidativas características en el desarrollo de la carcinogénesis de cuello uterino han sido identificadas tras la exposición de las células infectadas a ERO, entre ellas se destacan:

- La presencia de 8-nitroguanina en lesiones CIN 1, 2 y 3, ha sido determinada mediante estudios histológicos e inmunohistoquímicos, constituyendo un marcador inflamatorio predictivo de riesgo de carcinogénesis en pacientes infectadas con HPV (Hiraku et al., 2007).

- Incremento progresivo de la base modificada 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) desde células normales a SIL y a carcinomas invasivos. Esta base modificada es una lesión mutagénica *in vivo* e *in vitro* que se ha sugerido como un biomarcador para estudios moleculares epidemiológicos de riesgo de cáncer ocasionado por estrés oxidativo (Romano et al., 2000).
- Incremento de rupturas de doble hebra de ADN en células infectadas expuestas a dosis fisiológicas de óxido nítrico junto con el aumento de la transcripción de los genes E6 y E7 de HPV16 comparado con las células HPV-negativas. Esto podría constituir otro origen de las alteraciones cromosómicas estructurales encontradas en células infectadas con HPV de alto riesgo, alteraciones que se encuentran en la base del desarrollo de tumores (Wei et al., 2009).
- Aumento del malondialdehído, derivado de peroxidación lipídica y capaz de dañar el ADN, siendo esta elevación proporcional al aumento de la severidad de las lesiones (Naidu et al., 2007).

El estrés oxidativo tiene un rol muy relevante en la carcinogénesis actuando tanto en la iniciación neoplásica como en su progresión. En varios tipos de cáncer se ha determinado que las especies reactivas de oxígeno, que pueden actuar como segundos mensajeros, participan en la proliferación celular por ejemplo mediante la activación de Erk1/2 y de NF- $\kappa$ B y en la inactivación de proteínas pro-apoptóticas al activar Akt. (Liou, GY. & Storz, P. 2010; Di Domenico et al., 2012). A su vez, estas células presentan mayor resistencia al estrés oxidativo que células normales (Reuter et al., 2010).

Así como los oncogenes de HPV permiten que las células infectadas sobrevivan a pesar de la inestabilidad genómica, también les confieren la capacidad de sobrevivir en un ambiente oxidativo. Su principal mecanismo es la regulación de la actividad antioxidante y la supresión de apoptosis inducida por estrés oxidativo.

#### Antioxidantes en cáncer cervical

Durante el proceso infeccioso de HPV se ha determinado que frente a la alta producción de especies reactivas de oxígeno se aumentan los niveles antioxidantes intracelulares (Foppoli et al., 2015).

Un gran número de trabajos han demostrado la disminución de los niveles de antioxidantes o la disminución de la actividad enzimática de los antioxidantes, principalmente en la circulación

sistémica de los pacientes. Sin embargo, las células tumorales se caracterizan por tener un eficiente control de las ERO. Los oncogenes virales le confieren a las células infectadas la capacidad de sobrevivir en el microambiente oxidativo mediante diferentes mecanismos:

1. Regulación de los sistemas antioxidantes. Varios trabajos han demostrado *in vitro* que la expresión de las oncoproteínas virales acompañada de la inducción de estrés oxidativo aumentan los niveles de enzimas y compuestos antioxidantes como la catalasa (Shim et al., 2005), superóxido dismutasa, NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (De Marco et al., 2007) y las isoformas 1 y 2 de peroxirredoxinas (Lee, K.A. et al., 2005).
2. Protección contra oxidación. Enzimas detoxificantes como las pertenecientes a la familia glutatión S-transferasa (glutatión S-transferasa P1-1) son protegidas por E7, la cual mediante su unión a la enzima estabiliza la forma reducida y evita su inactivación por oxidación (Mileo et al., 2009). Esta protección contra la oxidación también se ha observado para factores de transcripción redox-sensibles como el AP-1 el cual también forma complejos con E7 (Antinore et al., 1996; Nair et al., 2007).
3. Modulación de miRNAs (miR-34a) regulando genes asociados con la defensa antioxidante. miR-34a es un supresor de tumores cuya transcripción está directamente estimulada por p53 y su efecto contribuye a la inducción de apoptosis mediada por p53. La proteína E6 suprime a p53 y consecuentemente se suprime miR-34a, evitando, por ejemplo, la inhibición de la tioredoxin-reductasa 2 (Li et al., 2010).
4. Supresión de apoptosis mediada por estrés oxidativo. La resistencia a la muerte celular inducida por condiciones oxidantes se da por la regulación de ciertos inhibidores. Por ejemplo, la proteína survivina tiene la capacidad de inhibir la apoptosis y aumentar la actividad antioxidante celular. Esta proteína suele inhibirse por p53 pero la expresión de E6, que suprime a p53, permite entonces la expresión de la survivina (Borbely et al., 2006). También, en la progresión de las lesiones cervicales se ha observado una disminución de la expresión de la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (i-NOS), provocando disminución de los niveles de óxido nítrico y la apoptosis mediada por éste (De Marco et al., 2012).

Esta ajustada modulación oxidativa del metabolismo celular resulta ser refractaria, ya que el ambiente oxidativo se convierte en un factor de selección positiva para las células cancerígenas que mejor se adapten.

## Control redox como abordaje terapéutico

En las últimas décadas se han propuesto varias estrategias preventivas y terapéuticas para el tratamiento del cáncer, entre ellas la incorporación en la dieta de compuestos antioxidantes que han demostrado tener una relación inversa a la persistencia de HPV y al desarrollo tumoral.

Dado que los procedimientos actuales de tratamiento del cáncer de cuello uterino: quimioterapia y radioterapia son grandes inductores de estrés oxidativo y toxicidad, se podría pensar en un tratamiento antioxidante como adyuvante.

Los polifenoles son antioxidantes que se han evaluado en diversos estudios obteniendo resultados prometedores. Entre ellos la curcumina derivado de la planta *Curcuma longa* ha mostrado su capacidad de interferir en la carcinogénesis por HPV al inhibir la expresión de sus oncoproteínas y estimular la apoptosis (Maher et al., 2011). Este compuesto ha mostrado efecto sensibilizador de células derivadas de cáncer cervical a cisplatino (Venkatraman et al., 2005), y de células tumorales HPV-positivas a paclitaxel, mediante la inhibición de la actividad del factor NF- $\kappa$ B y aumento de la muerte celular (Bava et al., 2011).

El compuesto epigallocatequingalato (EGCG) también pertenece a los polifenoles, está presente en el té verde y presenta propiedades anticancerígenas. En células aisladas de biopsias de cáncer cervical ha disminuido el nivel de ERO y la proliferación celular y ha aumentado la actividad de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Hussain, 2017). En relación a la terapia del cáncer cervical, tiene efecto sinérgico con el cisplatino, potenciando su efecto y estimula la muerte de las células cancerígenas (Kilic et al., 2014).

El resveratrol, compuesto presente en diferentes alimentos como uvas y arándanos, tiene efecto antiproliferativo en líneas celulares derivadas de cáncer cervical, determinando la acumulación de las células en fase S (Zoberi et al., 2002), además mejora la efectividad del cisplatino aumentando su actividad anti-cáncer (Rezk et al., 2006).

Otros antioxidantes naturales han sido evaluados, como el licopeno (pigmento de frutas y verduras rojas) y la luteína (perteneciente al grupo de xantofilas, pigmento amarillo) los cuales mostraron reducir la incidencia de cáncer cervical (Sedjo et al., 2002).

Las vitaminas antioxidantes tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres, de tal forma se han propuesto como terapias paliativas en diferentes ensayos, pudiendo disminuir el riesgo de cáncer cervical. Es así como la vitamina B12, vitamina E y los  $\beta$ -carotenos mostraron tener

efecto preventivo, y altos niveles en plasma de vitamina E, ácido ascórbico y  $\beta$ -carotenos se asocian a disminución del riesgo de neoplasma (Myung et al., 2011; Guo et al., 2015).

El ácido ascórbico (o vitamina C) podría ser un tratamiento valorado en pacientes en etapas tempranas de cáncer. La suplementación dietética de esta vitamina podría reducir el riesgo de CIN en mujeres con infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico (Hwang et al., 2010).

Si bien los tratamientos actuales de cáncer inducen altos niveles de ERO que las células tumorales no pueden eliminar y así contribuyen a la muerte celular, actualmente se proponen alternativas para asociar como adyuvantes al tratamiento de la radio- y quimioterapia con moléculas antioxidantes (Bonetta, 2018). De tal forma se ha evaluado el efecto del ácido ascórbico en relación a diferentes agentes quimioterapéuticos. En células derivadas de cáncer cervical, SiHa, la combinación de ácido ascórbico con cisplatino aumentó la inducción de apoptosis (Leekha et al., 2016). Por su parte, en células HeLa modula la expresión del factor de transcripción AP-1 que responde al estado redox además de disminuir la expresión de E6 reestableciendo la respuesta apoptótica mediada por p53 al cisplatino y etopósido (Reddy et al., 2001).

Como hemos descrito hasta el momento, varias condiciones son entonces requeridas para el desarrollo del cáncer cervical: la infección por HPV de alto riesgo oncogénico, la sobre-expresión de sus oncoproteínas E6 y E7 y la persistencia de la infección viral generando un estado de inflamación crónica donde el microambiente es fundamentalmente oxidativo. Un mayor entendimiento de la relación existente entre la expresión de las proteínas E6 y E7 de HPV y la sensibilización de las células huésped al daño inducido en el ADN por agentes oxidantes que puedan derivar en carcinogénesis, permitiría desarrollar nuevas estrategias para la prevención o el tratamiento del cáncer de cuello de útero.

En el presente trabajo se plantea estudiar la relación entre la inducción de estrés oxidativo y la generación de daño en el ADN de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente transducidos con los oncogenes virales E6 y E7 de HPV 16, con el fin de confirmar que la acumulación del daño genético producido por el estrés oxidativo está en la base de la transformación celular. De encontrarse un efecto sensibilizador al agente oxidativo en dichas células, se adicionará ácido ascórbico en los cultivos celulares para disminuir el efecto producido por el estrés oxidativo con el fin de observar si es posible disminuir el daño genético,

lo que pudiera sugerir una posible terapia paliativa del efecto perjudicial que tendría el estado redox de las células en las infecciones por HPV de alto riesgo.

## **Hipótesis**

Se propone que la sostenida expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del virus de alto riesgo oncogénico HPV 16, no es suficiente para el desarrollo del cáncer, siendo el ambiente oxidativo por la persistencia de la infección viral, un cofactor determinante en la transformación a la malignidad.

## **Objetivo general**

Estudiar si la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7 del HPV 16 sensibiliza a queratinocitos humanos (HaCaT) al daño oxidativo generado por peróxido de hidrógeno.

## **Objetivos específicos**

En células HaCaT transducidas con un vector retroviral para expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16:

- Evaluar el efecto del agente oxidante, peróxido de hidrógeno, sobre la viabilidad celular.
- Determinar la formación de especies reactivas de oxígeno después del tratamiento con el agente oxidante.
- Cuantificar el efecto del daño oxidativo a nivel cromosómico tras la exposición a peróxido de hidrógeno.
- Evaluar el daño oxidativo primario inducido en el ADN por el peróxido de hidrógeno.
- Estudiar el efecto *scavenger* del ácido ascórbico sobre el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno.

## **Materiales y métodos**

### **Líneas celulares**

Las líneas celulares fueron proporcionadas por el Dr. Enrique Boccardo del Laboratorio de Oncovirología, Departamento de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de San Pablo, Brasil.

Una de las líneas utilizadas fue HaCaT que es una línea de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente obtenida de piel de adulto cultivada por un largo período a bajas concentraciones de calcio y elevada temperatura (40°C) (Boukamp et al., 1988). La línea HaCaT presenta mutaciones en los dos alelos de p53 (Lehmann et al., 1993) y un aumento en la actividad de la enzima telomerasa que mantiene la longitud de los telómeros, características que han sido asociadas a la inmortalización de la línea (Härle-Bachor & Boukamp, 1996). Esta línea celular se mantiene no tumorigénica y su crecimiento y potencial de diferenciación se mantiene similar al de queratinocitos humanos normales (Boukamp et al., 1988; Breitkreutz et al., 1998; Schoop, Fusenig, & Mirancea, 1999), por lo que resulta ser un buen modelo para estudiar el rol de oncogenes y otros factores en el proceso de malignización (Fusenig & Boukamp, 1998).

A partir de esta línea celular fueron obtenidas las células HaCaT pLXSN y HaCaT pLXSN16 E6E7 por transducción con los vectores retrovirales correspondientes.

### Transducción con vectores retrovirales

La transducción de las células HaCaT fue realizada en el laboratorio del Dr. Boccardo.

Los vectores retrovirales pLXSN (No. de acceso M28248, GenBank) con los genes E6 y E7 de HPV 16 fueron brindados por la Dra. Denise Galloway (Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA). Las secuencias de los genes fueron insertas en el vector bajo control del promotor presente en el LTR retroviral. Posteriormente los vectores se introdujeron por electroporación a células de la línea ecotrópica de células epiteliales de riñón embrionarias Bosc23 (derivada de HEK-293), utilizándose luego el sobrenadante para infectar la línea anfitrión de fibroblastos de ratón Am12 (derivada de NIH 3T3). Finalmente, el sobrenadante del cultivo de células Am12 se utilizó para infectar la línea celular HaCaT cultivada en placas de Petri de 60 mm a una confluencia de 20-30%.

## **Cultivos celulares**

Todas las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin. Las células se cultivaron en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. La siembra celular para la realización de los diferentes ensayos se llevó a cabo empleando cultivos con una confluencia de 80%.

## **Análisis citogenético de las líneas celulares**

Para evaluar los efectos de la transducción celular sobre la estabilidad genómica de la línea HaCaT, se realizó el estudio del cariotipo. Con este fin, se sembraron en placas de 100 mm la línea celular HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 y se mantuvieron en cultivo por 24 h hasta alcanzar un 70% de confluencia. Posteriormente se agregó a cada cultivo celular 0.2 mg/mL de Colcemid durante 3 h en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Se recolectaron las células en su totalidad y se centrifugaron a 1.000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con pipeta Pasteur. Se agregó 5 mL de KCl 75 mM a 37°C y se incubó por 6 min a temperatura ambiente, seguido de tres fijaciones con metanol-ácido acético (3:1). Tras la última fijación se realizaron los extendidos metafásicos sobre portaobjetos previamente enfriados y se dejaron secar al aire. Finalmente, las preparaciones fueron teñidas con yoduro de propidio (1 mg/mL) durante 15 min, lavadas con agua destilada y montadas con 50 µL de *antifade* (Vectashield, Vector). Los bordes de los cubreobjetos fueron sellados con esmalte de uña. Las metafases (20 por línea celular) fueron capturadas mediante cámara digital y analizadas por el programa ISIS (MestaSystems, GmbH) empleando un set de filtros de fluorescencia para el yoduro de propidio.

## **Tratamiento con peróxido de hidrógeno**

Con el fin de inducir estrés oxidativo en las líneas celulares previamente descritas, se utilizó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que difunde libremente a través de la membrana celular. Las diferentes diluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina y 100 U/mL de estreptomycin.

## **Determinación de la viabilidad celular mediante el método de resazurina**

El método de resazurina permite evaluar la viabilidad celular de forma indirecta a través de su reducción a resorufina (fluorescente) por la acción de una enzima citoplasmática celular. De

esta forma, el aumento de intensidad de fluorescencia en el cultivo indicará una mayor viabilidad celular. Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además seis réplicas por punto. Se establecieron los cultivos de las líneas celulares HaCaT, HaCaT pLXSN y HaCaT pLXSN16 E6E7, colocando en placa de 96 pocillos, 6.000 células cada 100  $\mu$ L de medio DMEM con 10% de SFB, se colocaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Se evaluaron diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250, 500, 750 y 1.000  $\mu$ M) durante 3 h de tratamiento a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para el ensayo de reducción de la resazurina, se descartó el medio de cultivo 4 h antes de la medición y se adicionó 100  $\mu$ L de 0,025 mg/mL de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) en PBS. Se midió la fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión a 590 nm en espectrofotómetro de placa (Varioskan Flash Microplate spectrophotometer; Thermo Fisher, Vantaa, Finland).

### **Estudio de especies reactivas del oxígeno (ERO) intracelular**

Se utilizó el ensayo fluorimétrico con 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), compuesto hidrofóbico no fluorescente que atraviesa las membranas biológicas llegando al interior de las células donde es desacetilado a 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) el cual reacciona rápidamente con las ERO formando el compuesto fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF). La intensidad de la fluorescencia presente en el cultivo se relaciona directamente con la cantidad de ERO generada. Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además seis réplicas por punto. Se sembraron 8.000 células de la línea control o de la línea celular transducida con los oncogenes E6 y E7 en placas de 96 pocillos. Luego se les agregó DCFH-DA 50  $\mu$ M en medio sin SFB y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en oscuridad por 30 min. Posteriormente se removió el medio, se lavó con PBS y se midió la fluorescencia en PBS del control a tiempo inicial ( $\lambda_{ex}$  490 nm y  $\lambda_{em}$  570 nm) en Varioskan. Finalmente se lavó el resto de los pocillos adicionándose al cultivo 0, 500 y 750  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las medidas de fluorescencia se realizaron a tiempos de 15, 30, 60, 120 y 180 min en PBS.

### **Evaluación del daño en el ADN**

#### Ensayo de micronúcleos (MN)

Los micronúcleos son fragmentos del material genético o cromosomas enteros que, debido a su rezago durante la anafase por el daño sufrido, quedan separados del núcleo original (Luzhna et al., 2013). El ensayo se realizó según la técnica descrita por Fenech (2007) con algunas

modificaciones. Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además dos réplicas por punto. Se sembraron 100.000 células de cada línea celular en placas de 60 mm. El tratamiento se realizó en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las concentraciones de 0, 500 y 750 µM por 3 h y se incubó durante 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 6 h de tratamiento, se añadió citocalasina B a una concentración final de 3 µg/mL con el fin de evitar la primera división celular, y se continuó la incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se levantaron con tripsina y se trataron con KCl 75 mM, seguido de dos fijaciones con metanol-ácido acético (3:1) y una última fijación con metanol al 1%. Las células fueron adheridas al portaobjetos mediante citocentrifugación a 2000 rpm por 10 min a temperatura ambiente utilizando una citocentrífuga (Cellspin I, Tharmac, Waldsolms, Germany). Luego se tiñeron con naranja de acridina 10 µg/mL y los micronúcleos se evaluaron en 1.000 células binucleadas de acuerdo con los criterios de Fenech (2007) utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss (modelo Axioplan II motorizado) a 40x. Además, se evaluó el índice de división nuclear (IDN) que es una medida del nivel de proliferación celular. El IDN fue calculado de acuerdo al método de Eastmond y Tucker (1989), determinando en 1.000 células la frecuencia de células con 1, 2, 3 o 4 núcleos mediante la siguiente ecuación, donde M<sub>1</sub>-M<sub>4</sub> son las células con 1-4 núcleos y N es el número total de células contadas:

$$IDN = \frac{(M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4)}{N}$$

### Ensayo cometa

Para determinar la capacidad de reparación del daño primario inducido en las líneas celulares se realizó el ensayo de electroforesis en gel de células aisladas (Singh et al., 1988; Gleib et al., 2016). Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además dos réplicas por punto. Para esto se establecieron los cultivos de las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7, colocando en placa de 96 pocillos, 8.000 células por pocillos en 100 µL de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó el tratamiento con 750 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 min. Posteriormente se retiró el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se agregó medio completo para permitir la recuperación de las células por 0, 15, 30, 60 y 120 min. También se realizó un control sin tratamiento y analizado a tiempo 0. Una vez transcurridos estos tiempos de recuperación, se decoloraron las células con tripsina, se neutralizaron y se generó un pool con las siete réplicas de cada punto, se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 40 µL de PBS, colocando cada tubo en hielo. A los portaobjetos previamente

preparados en agarosa con punto de fusión normal (1%), se les adicionó la mezcla de 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular + 80  $\mu\text{L}$  de 0.5% agarosa de bajo punto de fusión, y se colocaron cubreobjetos. Para la solidificación de los geles se colocaron los portaobjetos durante 10 min a 4°C. Luego, los cubreobjetos fueron removidos y se colocó cada portaobjeto en la solución de lisis previamente enfriada (pH 10; 2,5 M NaCl; 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM Trizma-HCl y 1% Triton X-100) durante 1 h a 4°C. Los portaobjetos fueron luego lavados con PBS y colocados en una cuba de electroforesis horizontal, donde se cubrieron con la solución alcalina de electroforesis (pH 13; 300 mM; NaOH y 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA), por 15 min en oscuridad permitiendo la desnaturalización del ADN para luego realizar la corrida electroforética a 25 V (300 mA) y 4°C durante 15 min. Los portaobjetos se removieron de la cuba y se lavaron por 5 min con el buffer de neutralización (pH 7,5; 0,4 M Tris-HCl). Cada portaobjeto fue teñido con 50  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y analizado utilizando el programa Comet Imager (MetaSystems), con el cual se analizaron como mínimo 50 nucleoides por portaobjeto. El daño fue cuantificado como el *Olive Tail Moment*, que representa la extensión del daño en el ADN de células individuales (el producto de la fracción del ADN migrado y la distancia entre la mediana de la cabeza y la mediana de la cola del cometa).

### **Ácido ascórbico como *scavenger***

#### Ensayo de toxicidad

Se realizó una curva de citotoxicidad mediante el método de resazurina para determinar la viabilidad celular tras el agregado del ácido ascórbico a diferentes concentraciones. Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además seis réplicas por punto. Se estableció el cultivo celular HaCaT, colocando en placa de 96 pocillos, 8.000 células por pocillo en 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido ascórbico (1, 10, 100, 500, 1000 y 10.000  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h de tratamiento (Reddy et al., 2001; Shang et al., 2002; Terashima et al., 2013). Para el ensayo de reducción de la resazurina, 4 h antes de la medida se descartó el medio de cultivo, y se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de 0,025 mg/mL de resazurina en PBS. Se midió la fluorescencia usando una  $\lambda_{\text{ex}} = 530$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 590$  nm en Varioskan.

#### Ensayo de micronúcleos

Para determinar si el ácido ascórbico contribuye a contrarrestar la acumulación de daño en las líneas celulares control y transducida, se realizó nuevamente el ensayo de micronúcleos de

acuerdo a la técnica descrita previamente. Los ensayos se realizaron por duplicado, teniendo además dos réplicas por punto. Se sembraron 50.000 células de cada línea celular en placas de 35 mm y se cultivaron por 24 horas. Luego, se realizó el tratamiento con ácido ascórbico 1 mM por 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se removió el medio de cultivo y se realizó el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM y se incubó en las mismas condiciones por 3 h, luego fue removido y se agregó medio completo fresco. A las 6 h luego del tratamiento, se añadió citocalasina B a una concentración final de 3 µg/mL, y se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó el mismo procedimiento de decolamiento y fijación ya descrito en la Sección 1.7.1. Luego las muestras fueron teñidas con naranja de acridina 10 µg/mL y los micronúcleos se evaluaron en 1.000 células binucleadas de acuerdo con los criterios de Fenech (2007).

### **Análisis estadístico**

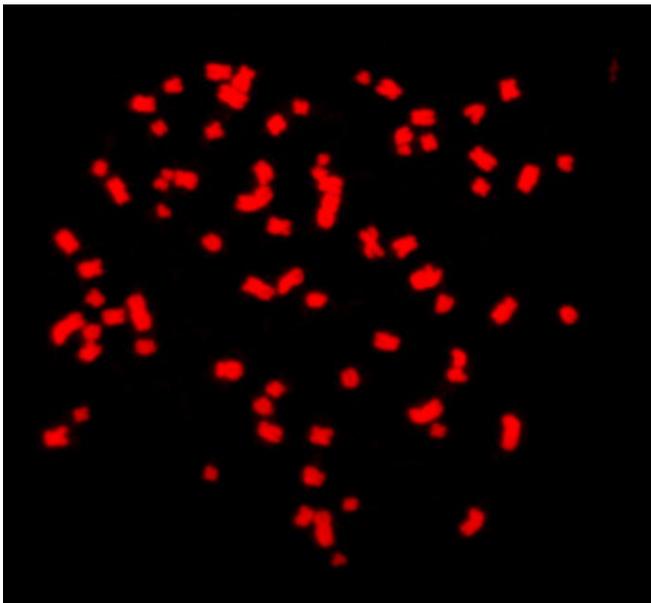
Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 6 y los valores fueron expresados como el promedio ± desvío estándar. Las diferencias entre las líneas celulares se analizaron con el test estadístico *Two-way* ANOVA, test de Bonferroni con los valores de p correspondientes a: no significativo (ns),  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  y \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ . En el caso de la valoración del ensayo con una sola variable se utilizó el test *One-way* ANOVA, test de Bonferroni, con los mismos valores significativos.

## Resultados

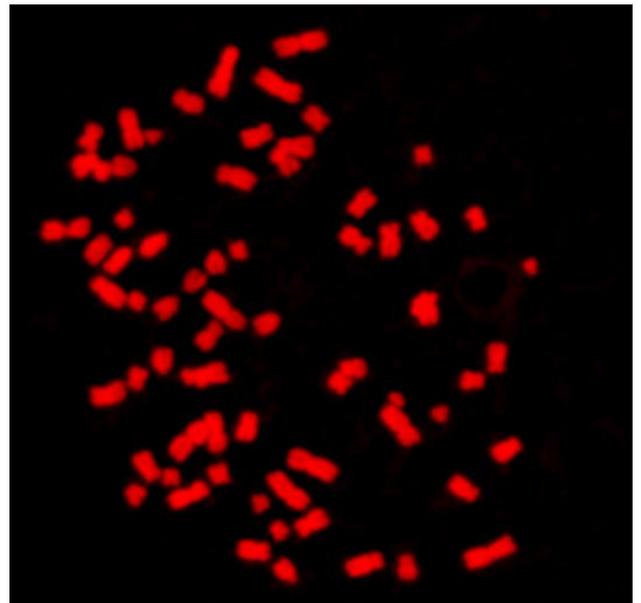
### Análisis citogenético de las líneas celulares

Con el fin de determinar si las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 presentan reordenamientos y fragmentos cromosómicos se analizaron 20 metafases de cada línea celular. A partir de los resultados obtenidos se observó que tanto las células HaCaT (**Fig. 6a**) como las células HaCaT pLXSN16 E6E7 (**Fig. 6b**) no presentaron reordenamientos cromosómicos ni fragmentos que pudieran interferir con los resultados del resto de los ensayos realizados. En ambos casos se observó un cariotipo de tipo hipo-tetraploide, con un rango de 67 a 74 cromosomas, acorde con la descrito previamente por Boukamp et al. (1988) para el cariotipo de células HaCaT con un número de pasaje elevado.

**a**



**b**

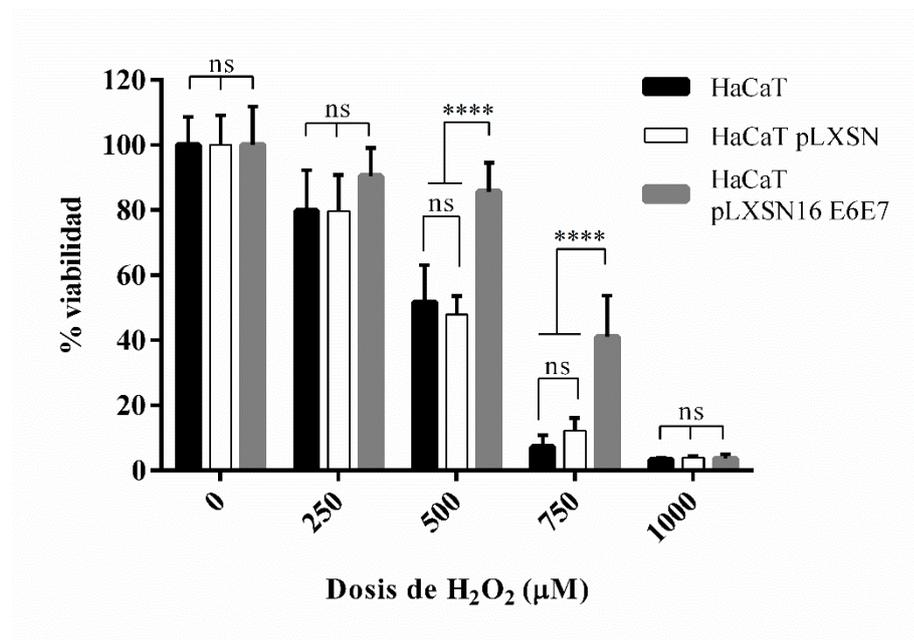


**Figura 6.** **a)** Metafase de una célula HaCaT (72 cromosomas). **b)** Metafase de una célula HaCaT transducida con las proteínas E6 y E7 de HPV 16 (69 cromosomas). Ambas fueron teñidas con ioduro de propidio y capturadas utilizando microscopio de fluorescencia a 63x.

### Determinación de la viabilidad de las líneas celulares al ser tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se evaluó el efecto que produce la expresión de las oncoproteínas virales de HPV 16 sobre la viabilidad celular de los queratinocitos humanos frente a su exposición a diferentes

concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 7**). Los resultados muestran el descenso en la viabilidad celular de forma proporcional al aumento de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si bien este efecto se observa en todas las líneas celulares evaluadas, la que expresa las proteínas E6 y E7 de HPV16 resulta ser más resistente al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> logrando mantener la viabilidad a concentraciones mayores de este compuesto en comparación a las líneas sin las oncoproteínas. La evaluación estadística mostró una diferencia significativa en la sobrevivencia celular para las dosis de 500 y 750 µM, mientras que la dosis de 1000 µM provocó la muerte celular en todas las líneas evaluadas. Estos resultados fueron concordantes a lo evidenciado al microscopio, donde se observó la pérdida de la morfología característica de estas células cuando las mismas se expusieron al agente oxidante.



**Figura 7.** Ensayo de reducción del porcentaje de viabilidad celular de las líneas celulares HaCaT, HaCaT pLXSNØ y HaCaT pLXSN16 E6E7 expuestas a concentraciones crecientes (250-1000 µM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 h. Ensayos realizados por duplicado, teniendo seis réplicas por punto. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular \*\*\*\*; Dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> \*\*\*\* y efectos de interacción \*\*\*\*. Test de Bonferroni, ns: no significativo, \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ .

Al observar que la línea celular control (HaCaT) y la línea con el vector vacío (HaCaT pLXSNØ) presentaron igual comportamiento frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno a las dosis previamente mencionadas, se decidió realizar el resto de los experimentos con la línea celular control y la que expresa las oncoproteínas virales.

## **Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares**

Dado que un aumento de las ERO inducido por componentes del ambiente inflamatorio podría estar implicado en el mecanismo de transformación a la malignidad de las células con E6 y E7 de HPV de alto riesgo, se realizó el seguimiento de los niveles de ERO intracelulares tras el tratamiento con 500 y 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dosis elegidas a partir del ensayo previo donde las líneas celulares mostraban diferencias significativas.

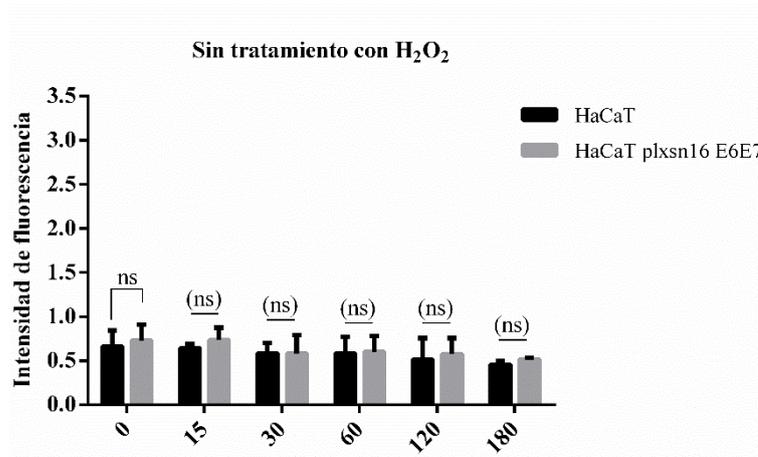
Para determinar si los niveles basales de ERO variaban a lo largo del tiempo en cada línea celular evaluamos la fluorescencia del DCF en las células HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 sin tratamiento con peróxido de hidrógeno. Como se observa en la **Figura 8a** ninguna de las líneas celulares presenta cambios significativos en los niveles de ERO a lo largo del tiempo y tampoco tienen diferencia significativa entre ellas.

Entonces, considerando como control al nivel de fluorescencia a tiempo 0 sin tratamiento, comparamos cómo variaba este nivel para los tratamientos con 500 y 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cada línea celular (**Fig. 8b y c**).

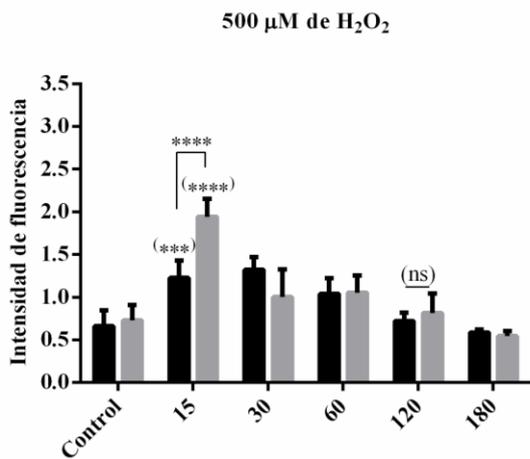
Para el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  ambas líneas aumentan los niveles de ERO en los primeros 15 minutos de tratamiento y vuelven a su nivel basal a los 120 minutos donde, de acuerdo a la evaluación estadística, dejan de tener diferencia significativa con el control. Lo mismo se puede observar para el tratamiento con 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin embargo, en esta condición la línea HaCaT pLXSN16 E6E7 vuelve a su nivel basal recién a los 180 minutos.

Por otro lado, en los dos tratamientos realizados con peróxido de hidrógeno, la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno se da de forma más significativa en la línea HaCaT pLXSN16 E6E7 en comparación a la línea HaCaT.

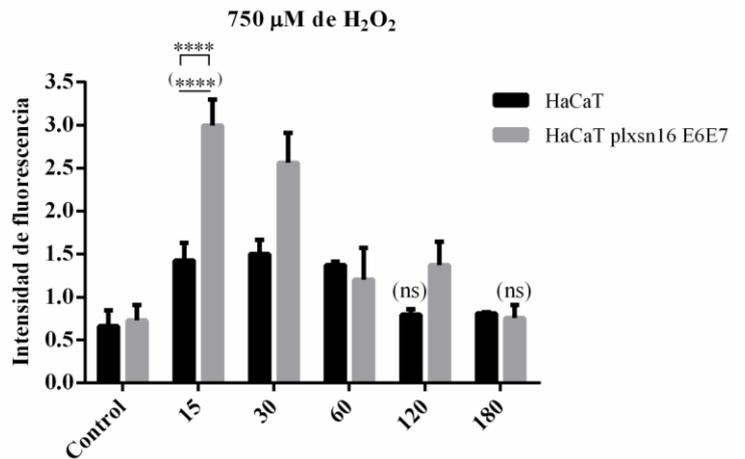
a



b



c



**Figura 8. a)** Gráfico de Intensidad de fluorescencia para las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 a lo largo del tiempo sin tratamiento con peróxido de hidrógeno. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, ns; Tiempo, ns y efectos de interacción, ns. **b)** Gráfico de Intensidad de fluorescencia para ambas líneas celulares tratadas con 500 μM de peróxido de hidrógeno a lo largo del tiempo, el control corresponde a la fluorescencia de cada línea a tiempo 0 sin tratamiento. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, ns; Tiempo, \*\*\*\* y efectos de interacción, \*\*\*\*. **c)** Gráfico de Intensidad de fluorescencia para ambas líneas celulares tratadas con 750 μM de peróxido de hidrógeno a lo largo del tiempo, el control corresponde a la fluorescencia de cada línea a tiempo 0 sin tratamiento. Ensayos realizados por duplicado, teniendo seis réplicas por punto. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, \*\*\*\*, Tiempo, \*\*\*\* y efectos de

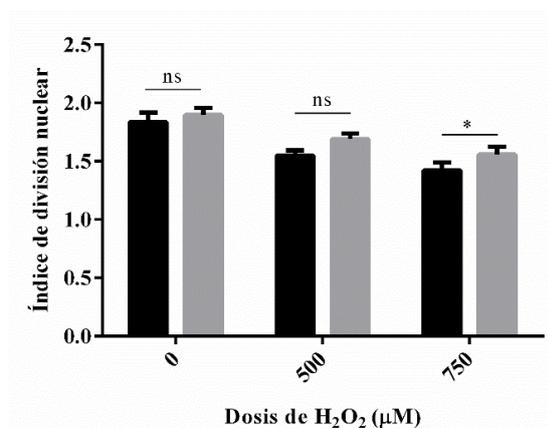
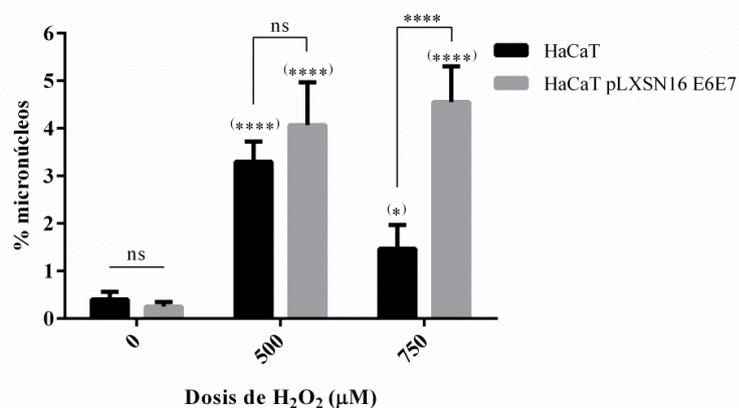
interacción, \*\*\*\*. Test de Bonferroni, ns: no significativo, \*\*\*,  $p \leq 0.001$  y \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ , los valores “entre paréntesis” indican la significancia de cada punto respecto a su control.

### **Ensayo de micronúcleos**

Para evaluar la acumulación de daño de las células expuestas a un agente genotóxico como el  $H_2O_2$ , se realizó el ensayo de micronúcleos (MN) con bloqueo de la citocinesis (CBMN). Los micronúcleos son productos de ADN originados a partir de la fragmentación de cromosomas o cromosomas enteros que no se incorporan en el núcleo luego de la división celular. Los mismos pueden originarse por defectos en la maquinaria de reparación y acumulación de daño conduciendo a la inestabilidad genómica que puede llevar a la muerte celular, o desarrollo de cáncer.

Se evaluó la cantidad de células mono-,bi-,tri- y tetra-nucleadas en un total de 1.000 células y se calculó el Índice de División Nuclear (IDN), que permitió evaluar el estado proliferativo de cada línea celular post-tratamiento. La **Figura 9a** muestra que ambas líneas continúan proliferando a pesar del tratamiento, si bien se observa una leve disminución del índice de división para la línea HaCaT a  $750 \mu M$  de  $H_2O_2$ , se puede que las líneas no tendrían afectado su ciclo celular.

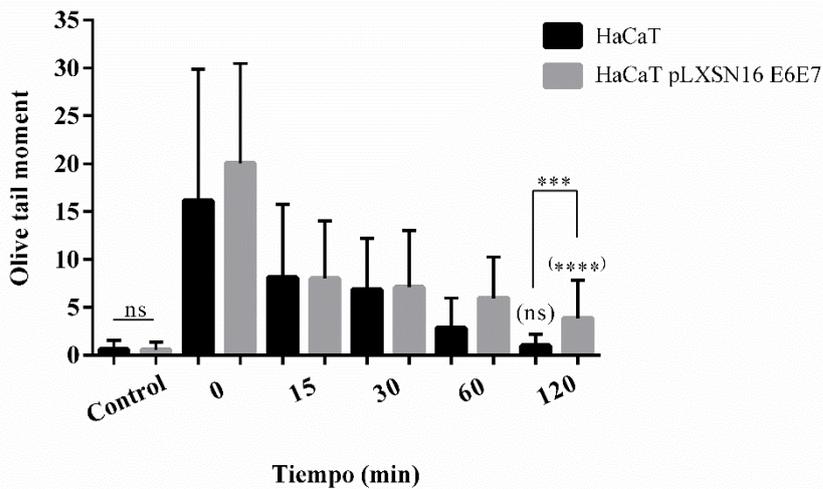
El bloqueo de la citocinesis provocado mediante el agregado de citocalasina B permite realizar el recuento de MN en las células binucleadas, identificando únicamente aquellos MN formados por tratamientos clastogénicos o aneugénicos los cuales desaparecerían al completar la división celular (Fenech, 2007; Luzhna et al., 2013). La **Figura 9b** muestra el aumento del porcentaje de MN con el tratamiento de  $H_2O_2$  en ambas líneas celulares. En el caso de la dosis de  $750 \mu M$  se observa que la línea HaCaT pLXSN16 E6E7 continúa acumulando daño en el ADN mientras que el porcentaje de micronúcleos disminuye para la línea HaCaT probablemente por la disminución de su viabilidad observada en ensayos anteriores.

**a****b**

**Figura 9.** a) Índice de división nuclear calculado en las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 luego de su tratamiento con 500 y 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 3 h, que muestra el comportamiento celular frente al efecto citotóxico. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, \*\*; Dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , \*\*\*\* y efectos de interacción, ns. b) Porcentaje de micronúcleos en células binucleadas que evidencia la acumulación de daño genético. Ensayos realizados por duplicado, teniendo dos réplicas por punto. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, \*\*\*; Dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , \*\*\*\* y efectos de interacción, \*\*\*. Test de Bonferroni, ns: no significativo, \*\*,  $p \leq 0.01$ , \*\*\*,  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ , los valores “entre paréntesis” indican la significancia de cada punto respecto a su control.

### Ensayo cometa

A partir de la diferencia significativa entre las dos líneas celulares en la acumulación de daño genético observada en el ensayo de micronúcleos, se evaluó la formación del daño primario producido en los queratinocitos tratados con 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su reparación en el tiempo. Como muestra la **Figura 10** se observa un aumento significativo de daño genético inmediatamente luego de la exposición al agente durante 5 minutos con el agente ( $t_0$ ). Luego de este tiempo inicial, ambas líneas comienzan con la reparación del ADN de forma similar hasta que a los 30 minutos se observa una reparación más lenta de la línea HaCaT pLXSN16 E6E7 en comparación a la línea control HaCaT la cual logra, a los 120 minutos post-tratamiento, revertir el daño genético generado.

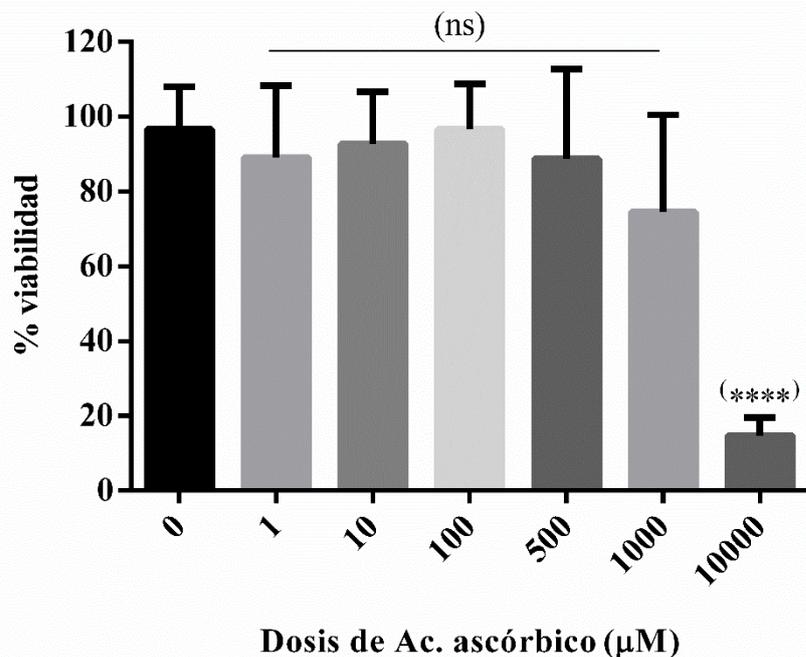


**Figura 10.** Gráfico de *Olive Tail Moment* de las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 luego de su tratamiento con 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 5 minutos a lo largo del tiempo, que muestra la respuesta de reparación del daño genético generado. Ensayos realizados por duplicado, teniendo dos réplicas por punto. Test estadístico *Two-way ANOVA*: efectos principales: Línea celular, \*\*\*\*; Tiempo, \*\*\*\* y efectos de interacción, \*\*\*\*. Test de Bonferroni, ns: no significativo, \*\*\*,  $p \leq 0.001$  y \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ , los valores “entre paréntesis” indican la significancia de cada punto respecto a su control.

### Ensayo de citotoxicidad del ácido ascórbico (AA)

Para evaluar el efecto antioxidante sobre la acumulación de daño genómico en el ADN ya determinado, se propuso trabajar con un *scavenger* bien conocido como el ácido ascórbico.

Mediante el ensayo de resazurina se realizó una curva de viabilidad de las células control, HaCaT, al ser expuestas a dosis crecientes del ácido ascórbico por 24 horas (**Fig. 11**). Como puede observarse las células tratadas presentan porcentajes de viabilidad superiores al 75% en el rango de 1-1.000  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico. La viabilidad cae bruscamente a la concentración de 10 mM del compuesto la cual ha sido considerada como dosis citotóxica (Terashima, Hosokawa, Yoshino, Yamaguchi, & Nakamura, 2013). A partir de este resultado se decidió continuar trabajando con la mayor dosis no tóxica de ácido ascórbico (1 mM), para asegurar la visualización del efecto antioxidante.

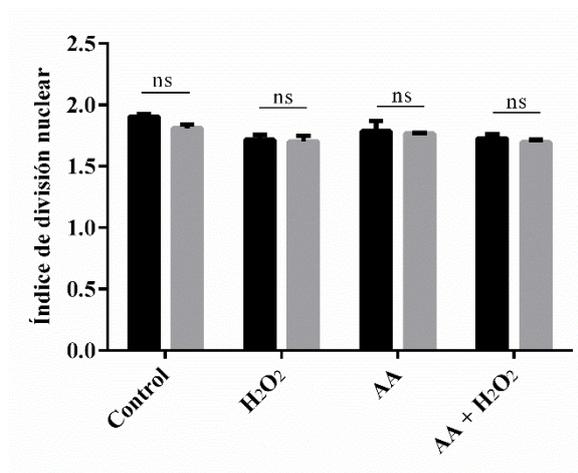
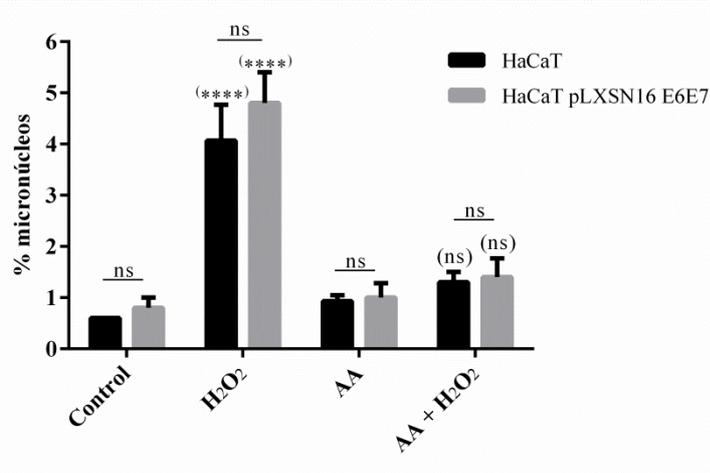


**Figura 11.** Gráfico del porcentaje de viabilidad celular de la línea celular HaCaT frente al agregado de concentraciones crecientes (0-10.000 µM) de ácido ascórbico. Ensayos realizados por duplicado, teniendo seis réplicas por punto. Test estadístico *One-way* ANOVA, test de Bonferroni, ns: no significativo, \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ .

### Ensayo de micronúcleos con pre-tratamiento con ácido ascórbico

Al observar que el ácido ascórbico (AA) no resultaba tóxico para la línea celular control (excepto a la dosis más extrema utilizada) se decidió continuar evaluando su efecto *scavenger* sobre la acumulación de daño en el ADN ya observado previamente. De esta forma se eligió la mayor dosis evaluada de ácido ascórbico que no resultó ser perjudicial (1 mM) con el fin de asegurarnos observar su efecto antioxidante. Luego de realizar el pre-tratamiento de las células con este compuesto por 24 horas, se realizó el tratamiento con 500 µM de peróxido de hidrógeno por 3 horas, esta dosis fue elegida ya que en el ensayo de micronúcleos previamente realizado mostro diferencia en el porcentaje de MN para ambas líneas celulares respecto al control. De esta forma, en caso de que el AA tenga efecto en la acumulación de daño sería fácilmente detectable.

A partir de los resultados obtenidos se realizó el cálculo del Índice de división nuclear para evaluar el estado proliferativo de cada línea celular y se realizó el recuento de MN en las células binucleadas (**Fig. 12**).

**a****b**

**Figura 12. a)** Índice de división nuclear calculado en las líneas celulares HaCaT y HaCaT pLXSN16 E6E7 luego de su tratamiento con 500  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 horas, con pre-tratamiento de 1 mM de AA por 24 horas, y la combinación de los tratamientos. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, \*; Tratamiento, \*\*\*\* y efectos de interacción, ns. **b)** Porcentaje de micronúcleos en células binucleadas en las mismas condiciones mencionadas. Test estadístico *Two-way* ANOVA: efectos principales: Línea celular, ns; Tratamiento, \*\*\*\* y efectos de interacción, ns. Test de Bonferroni, ns: no significativo, \*,  $p \leq 0.05$ , \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ , los valores “entre paréntesis” indican la significancia de cada punto respecto a su control.

El IDN no se ve afectado para ninguna de las condiciones evaluadas, particularmente en el caso de las células sin tratar y aquellas tratadas únicamente con peróxido de hidrógeno se observa el mismo comportamiento previamente observado.

Por otro lado, en cuanto a la formación y acumulación de daño en el ADN, se observa una alta tasa de micronúcleos en el tratamiento con peróxido, mientras que el ácido ascórbico por sí solo no genera genotoxicidad. Cuando se realiza pre-tratamiento de las células con antioxidante y luego el tratamiento con peróxido se observa que el *scavenger* efectivamente revierte el daño generado para ambas líneas celulares.

## Discusión

Existe fuerte evidencia de que en la evolución hacia la carcinogénesis de cuello uterino, las células epiteliales infectadas por HPV de alto riesgo oncogénico sobre-expresan los genes virales de E6 y E7 promoviendo la proliferación celular descontrolada. La persistencia viral conduce a un estado de inflamación crónica estableciendo un microambiente oxidativo en el entorno de las células infectadas. Es así que, en el presente trabajo proponemos que la presencia de las oncoproteínas virales de HPV 16 sensibilizan a los queratinocitos humanos al daño producido por estrés oxidativo, inducido por peróxido de hidrógeno, y que mediante la incorporación de un antioxidante como el ácido ascórbico es posible prevenir la acumulación de daño en el ADN.

La evaluación de la viabilidad de las células fue evaluada de forma indirecta mediante el ensayo de resazurina tras la exposición de las células a dosis crecientes de peróxido de hidrógeno. Los resultados obtenidos mostraron que aunque la viabilidad de las células transducidas con E6 y E7 disminuye, tienen una mayor resistencia que las células control. Es importante determinar que el método de resazurina seleccionado para evaluar la viabilidad celular no fue el más acertado dado que, al consistir en un ensayo basado en la reducción de resazurina a resorufina, y evaluar la incorporación de un agente oxidante al medio, esto podría subestimar el resultado obtenido. Por otro lado, si bien el ensayo de resazurina no muestra directamente la muerte celular, este evento fue evidenciado al microscopio acompañado de la pérdida de la morfología característica de estas células. Estos resultados son concordantes a lo obtenido por el grupo de investigación de Shim et al., 2005, donde observan que células que expresan la oncoproteína E7 de HPV 16 y son expuestas a peróxido de hidrógeno tienen menor tasa de apoptosis. Este hecho se puede adjudicar a que la expresión de las oncoproteínas virales de HPV de alto riesgo oncogénico tiene un rol central en el ciclo celular. Son capaces de inactivar puntos de control claves del ciclo, fundamentalmente E6 promueve la ubiquitinación de p53 para su degradación proteosómica (Martinez-Zapien et al., 2016) suprimiendo la apoptosis, mientras que E7 une a pRb para su ubiquitinación y degradación promoviendo la liberación del factor E2F que permite la expresión de los genes de fase S, induciendo la proliferación (Hwang et al., 2002).

Por otro lado, las oncoproteínas además de proporcionar la inactivación de la apoptosis y el estímulo de proliferación celular, son capaces de participar en la reprogramación del ambiente celular preservando la viabilidad de las células. Por esto, frente a estímulos oxidativos E6 y E7 regulan la actividad antioxidante, por ejemplo mediante el aumento de la enzima catalasa (Shim

et al., 2005) y suprimen la apoptosis inducida por estrés oxidativo con el fin de mantener la homeostasis celular.

Al evaluar el estado redox intracelular de las líneas celulares tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno, observamos que tanto las células transducidas con las oncoproteínas virales E6 y E7 como las células control presentaban una elevación en la formación de especies reactivas de oxígeno en los primeros 15 minutos de tratamiento, pasado este tiempo ambas líneas celulares comienzan la remoción alcanzando nuevamente su estado basal. Para la dosis de 750  $\mu\text{M}$  la línea transducida con las oncoproteínas virales, en comparación a la línea HaCaT, eleva sus niveles de ERO respecto a su control a tiempo 0, de forma más significativa y alcanza su estado basal recién a los 180 minutos. Este resultado nos hace pensar en el paradigma redox que se ha establecido para la infección por HPV, donde se considera que las células infectadas por el virus logran adaptar su metabolismo y mantener la homeostasis celular frente a un ambiente oxidativo asociado a la propia infección (Foppoli et al., 2015). Considerando, que si bien las células infectadas por HPV generan un ambiente propicio para mantener la viabilidad celular frente a estímulos deletéreos como es el estrés oxidativo mediante el aumento de las defensas antioxidantes (como podría ocurrir para la dosis de 500  $\mu\text{M}$ ), estas defensas podrían no ser suficientes para modular el control redox en dosis elevadas del agente oxidativo (750  $\mu\text{M}$ ). De esta forma, nuestro resultado no concuerda con el obtenido por Shim et al., 2005, que determina el aumento de antioxidantes en la línea con E6 y E7, que en nuestro caso se tendría que haber evidenciado como una mejor modulación del estrés oxidativo inducido.

La respuesta coordinada que posee la célula para hacer frente al daño inducido en el ADN se denomina respuesta celular al daño (o del inglés, *DNA Damage Response* o DDR). La DDR es capaz de detectar el ADN dañado, inducir la cascada de señalización, reclutar las nucleasas, helicasas, ligasas y polimerasas necesarias para pausar la progresión del ciclo celular y reparar las lesiones. Los Virus del Papiloma Humano pueden activar e inhibir diferentes aspectos de las vías de la DDR, por un lado permiten que las proteínas de esta maquinaria faciliten la replicación del genoma viral y por otro evitan el arresto del ciclo celular (Bristol et al., 2017). Las proteínas E1 y E2 de HPV son capaces de estimular la respuesta de la DDR en los sitios de replicación viral, permitiendo así el acceso de la maquinaria celular de replicación en estos sitios. También, al estimular esta respuesta se da el arresto del ciclo celular en fase S que beneficia la replicación del virus al tener mayor disponibilidad de la maquinaria de replicación. Sin embargo, a pesar de las señales de detención del ciclo inducidas por la respuesta de DDR,

la proteína E7 de HPV impulsa a las células a mantener el estado proliferativo ya que el HPV requiere células activas ciclando para poder replicarse. Esto resulta en efectos perjudiciales para las células tales como la inestabilidad genómica y daño en el ADN, que normalmente conducirían a la apoptosis de las células afectadas, sin embargo la expresión de E6 aumenta la tolerancia a estos efectos al inhibir directamente a proteínas de la maquinaria de DDR y promover la degradación de p53 (Wallace et al., 2014).

Es por esto que la transformación celular a la malignidad está relacionada a la sobre-expresión de los genes virales E6 y E7 que conducen a la inactivación de puntos de control del ciclo celular y son capaces de aumentar la inestabilidad genómica *per se* (Shukla et al., 2014). De esta forma, para determinar la posible inestabilidad genómica que podrían presentar las células HaCaT transducidas con los oncogenes virales, realizamos el análisis citogenético de esta línea y su control pudiendo determinar la ausencia de reordenamientos cromosómicos que pudieran incrementar el daño en el ADN posteriormente evaluado.

Si bien la sobre-expresión de los oncogenes virales es el factor más importante en la carcinogénesis, se cree que el proceso inflamatorio por la infección viral persistente tiene un rol relevante en este proceso. Una de las principales especies reactivas de oxígeno generados durante la inflamación crónica es el peróxido de hidrógeno y como es característico de estos compuestos, altos niveles pueden inducir daño genotóxico. Por esto, en este trabajo evaluamos la acumulación de daño en el ADN a través del recuento de micronúcleos y la formación de daño primario mediante ensayo cometa tras el tratamiento con el agente oxidativo.

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis permite valorar el daño en el ADN provocado por tratamientos clastogénicos o aneugénicos previo a la primera división celular post-tratamiento. A las 48 horas luego del tratamiento se determinó para la línea celular control un aumento en la formación de micronúcleos tanto para la dosis de 500  $\mu\text{M}$  como para la de 750  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno, sin embargo en esta última dosis el aumento no fue tan significativo lo que podría corresponder a una disminución de la viabilidad celular ya observada en el ensayo de resazurina (a 24 horas). Para la línea transducida con las oncoproteínas virales se observó el aumento significativo de la formación de micronúcleos en ambas dosis. Esto determina que la línea celular con E6 y E7 de HPV 16 no sólo resulta ser más resistente al agente oxidativo sino que puede sobrevivir acumulando más daño en el ADN, eventos fundamentales para la progresión de las células a la malignidad. Acorde a nuestros resultados, el trabajo de Wei et al., 2009, determinó una relación proporcional entre la expresión de los

oncogenes virales de HPV16 y el incremento de daño en el ADN frente a la exposición de las células a óxido nítrico, una potente especie reactiva de nitrógeno. Estas alteraciones podrían ser la base para el desarrollo de las alteraciones cromosómicas presentes en las infecciones por HPV de alto riesgo que contribuyen al desarrollo tumoral.

El daño primario inducido por el agente oxidativo en las células fue evaluado mediante el ensayo cometa. Este ensayo no solo detecta la ruptura del ADN inducida en este caso con estrés oxidativo, sino que permite realizar el seguimiento de procesos celulares como la reparación del ADN. Como ya hemos mencionado, la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo oncogénico también produce alteraciones en los sistemas de reparación del ADN. Los resultados obtenidos muestran que las células transducidas con las oncoproteínas no logran revertir en su totalidad el daño generado a los 120 minutos post-tratamiento, mientras que las células control vuelven a su estado basal. Esta escasa actividad de los sistemas de reparación observada en la línea que expresa E6 y E7 podría ser la causa de la acumulación de daño observado en el ensayo de micronúcleos.

Por tanto, podemos sugerir que la alteración de la cinética de remoción del daño del ADN, la acumulación de daño genético y la capacidad de mantener la viabilidad celular que otorgan las oncoproteínas virales a las células infectadas expuestas a estrés oxidativo, provocan que las células continúen proliferando aun estando dañadas.

Con el fin de evitar el daño de los componentes celulares por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en condiciones normales, actúan las enzimas y moléculas antioxidantes, como por ejemplo el ácido ascórbico. Sin embargo en condiciones de estrés oxidativo estas defensas pueden verse sobrepasadas y no conseguir el efecto deseado. Varios ensayos han demostrado la deficiencia de los sistemas antioxidantes en mujeres con cáncer de cuello uterino, mientras que la suplementación dietética de ácido ascórbico podría reducir el riesgo de lesiones de alto grado en mujeres con infecciones por HPV de alto riesgo oncogénico (Hwang et al., 2010). Propusimos trabajar con el ácido ascórbico, un reconocido antioxidante, y previo a determinar su acción determinamos si tenía efecto citotóxico en nuestra línea control HaCaT. Para esto utilizamos el método de resazurina para determinar la dosis óptima de trabajo. Nuevamente destacamos que no fue el mejor método para aplicar ya que evalúa el efecto redox intracelular en un cultivo al que le fue incorporado un antioxidante, de esta forma nuestro resultado podría verse sobre-estimado. La debilidad de este tipo de métodos en estas condiciones ya ha sido determinada por otros grupos de investigación, por su parte Chakrabarti et al., 2000 demostró

que el ácido ascórbico es capaz de reducir MTT a formazan de forma dosis dependiente y Natto et al., 2012 determinó que la presencia de ácido ascórbico a altas concentraciones (0,2-1 g/L) en medios de cultivo pueden reducir rápidamente la resazurina a resorufina.

Para determinar si el ácido ascórbico era capaz de revertir el efecto dañino del peróxido de hidrógeno, realizamos un pre-tratamiento de las líneas celulares con esta vitamina y luego el tratamiento oxidativo, evaluando el efecto en la formación de micronúcleos. Determinamos que el ácido ascórbico tiene una alta eficiencia en la remoción del peróxido de hidrógeno y del estrés oxidativo generado por éste. De esta forma se evitó la acumulación de daño tanto en la línea celular HaCaT como en HaCaT transducida con E6 y E7 y ambas se comportaron como sus respectivos controles sin tratamiento.

Considerando el papel de la inflamación crónica en esta enfermedad, la incorporación de compuestos antioxidantes en la dieta de mujeres con infecciones persistentes por HPV de alto riesgo y con lesiones establecidas, pudieran constituir estrategias preventivas y terapéuticas para el cáncer de cuello uterino. Si bien habría que realizar más ensayos en cuanto a la remoción de daño mediante el uso de antioxidantes nuestros resultados pueden sugerir una posible terapia paliativa del efecto perjudicial que tendría la respuesta inflamatoria del huésped en la infección por Virus del Papiloma Humano de alto riesgo oncogénico.

## **Conclusión**

Los estudios realizados en las últimas décadas han permitido una mayor comprensión de las funciones de los oncogenes virales, y un conocimiento más detallado del desarrollo de la infección del HPV. Actualmente se propone que la expresión de las proteínas virales no sería suficiente para el desarrollo del cáncer, siendo la infección persistente por HPV de alto riesgo oncogénico el factor más significativo y la inflamación crónica establecida un cofactor importante para la carcinogénesis.

Un mayor entendimiento de la relación existente entre la expresión de las proteínas E6 y E7 de HPV y la sensibilización de las células huésped al daño inducido en el ADN por agentes oxidantes que puedan derivar en carcinogénesis, permitiría desarrollar nuevas estrategias para la prevención del cáncer de cuello uterino.

Teniendo en cuenta los efectos de las proteínas E6 y E7 de HPV de alto riesgo sobre los procesos celulares y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede determinar una correlación entre la inducción de lesiones oxidativas a nivel molecular, con el incremento de acumulación de daño y mayor resistencia en líneas celulares de queratinocitos humanos que expresan las proteínas E6 y E7 de HPV16, eventos que se asocian con el desarrollo tumoral.

El evidente incremento y acumulación de daño genético en dichas líneas celulares, llevó a la búsqueda de una dosis del reconocido antioxidante ácido ascórbico, para contrarrestar el daño a nivel genético producido por la acumulación de las lesiones oxidativas inducidas en células portadoras de las proteínas E6 y E7 de HPV16.

De esta manera los resultados obtenidos podrían sugerir una posible terapia paliativa del efecto perjudicial que tendría la respuesta inflamatoria del huésped en las infecciones por HPV de alto riesgo, lo cual permitiría establecer una estrategia de tratamiento antioxidante en pacientes portadoras de HPV asociados con el carcinoma de cuello uterino para disminuir la probabilidad de transformación celular.

## **Perspectivas**

Con el fin de complementar los ensayos realizados en el presente trabajo hemos propuesto la validación del ensayo de viabilidad celular mediante otros estudios como la cuantificación celular utilizando azul de tripano, o determinar específicamente la proliferación celular por métodos que incluyan nucleótidos análogos modificados que se intercalan en el ADN como el método de bromodesoxiuridina. Sería interesante también poder estudiar si existe efectivamente una inhibición de la apoptosis en queratinocitos que expresan las oncoproteínas virales mediante técnicas de citometría de flujo utilizando Anexina V.

Por otro lado, como observamos una disminución de la reparación de daño primario en el ADN mediante el ensayo cometa que conduce a la acumulación del mismo (observado con el ensayo de micronúcleos) cuando las células con E6 y E7 de HPV fueron expuestas al peróxido de hidrógeno, es de nuestro interés determinar la expresión de genes de enzimas de reparación mediante la técnica Real Time PCR.

Finalmente como hemos observado, la incorporación del ácido ascórbico en los cultivos celulares previo a la inducción de estrés oxidativo disminuye la acumulación de daño en ambas líneas celulares. Sin embargo para determinar que este antioxidante influye en la sensibilización que otorga la presencia de E6 y E7 en las células, es necesario evaluar el efecto del ácido ascórbico sobre el tratamiento con la dosis de 750  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno y determinar si revierte la acumulación de daño en estas condiciones.

Con estos ensayos determinaríamos que la expresión de las oncoproteínas de HPV de alto riesgo oncogénicos sensibilizan a las células frente a la inducción de lesiones oxidativas, modulan los sistemas de reparación conduciendo a la acumulación de daño y otorgan la capacidad de continuar proliferando contribuyendo de esta forma a la transformación celular y desarrollo tumoral.

## Bibliografia

- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., & Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1605–1621. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.06.029>
- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L., & McCance, D. J. (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *The EMBO Journal*, 15(8), 1950–1960. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617242>
- Arbyn, M., Buntinx, F., Van Ranst, M., Paraskevaïdis, E., Martin-Hirsch, P., & Dillner, J. (2004). Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 280–293.
- Ashrafi, G., Haghshenas, M., Marchetti, B., & Campo, M. (2006). E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International Journal of Cancer*, 119(9), 2105–2112.
- Bailly, C., Lenoir, M., Darmon, M., Thierry, F. O., Yaniv, M., Roux, R., & Al, B. E. T. (1989). *The Human Papillomavirus Type 18 ( HPV18 ) E2 Gene Product Is a Repressor of the HPV18 Regulatory Region in Human Keratinocytes*. 63(10), 4317–4324.
- Bava, S. V., Sreekanth, C. N., Thulasidasan, A. K. T., Anto, N. P., Cheriyan, V. T., Puliappadamba, V. T., ... Anto, R. J. (2011). Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF-κB in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(3), 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.011>
- Bhattacharjee, B., & Sengupta, S. (2006). CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*, 354(2), 280–285. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2006.06.018>
- Boccardo, E. (2010). *HPV-Mediated Genome Instability: At the Roots of Cervical Carcinogenesis*. 57–65. <https://doi.org/10.1159/000290657>
- Boccardo, E., Lepique, A. P., & Villa, L. L. (2010). The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 31(11), 1905–1912. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq176>
- Bonetta, R. (2018). Potential therapeutic applications of MnSODs and SOD-mimetics. *Chemistry*. 24(20), 5032-5034. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201704561>.
- Borbely, A. A., Murvai, M., Kónya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F., & Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *Journal of General Virology*, 87(2), 287–294. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81067-0>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771. <https://doi.org/10.1083/JCB.106.3.761>
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.-M., Storey, A., & Banks, L. (1994). The Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene Cooperates with the E7 Gene to Stimulate Proliferation of Primary Cells and Increases Viral Gene Expression. *Virology*, 203(1), 73–80. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1994.1456>
- Breitkreutz, D., Schoop, V. M., Mirancea, N., Baur, M., Stark, H.-J., & Fusenig, N. E. (1998).

Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *European Journal of Cell Biology*, 75(3), 273–286. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80123-4)

Bristol, M. L., Das D., Morgan I. M. (2017). Why Human Papillomaviruses activate the DNA damage response (DDR) and how cellular and viral replication persists in the presence of DDR signaling. *Viruses*, 9, 268. doi: 10.3390/v9100268

Brotherton, J. M. L., Fridman, M., May, C. L., Chappell, G., Saville, A. M., & Gertig, D. M. (2011). Early effect of the HPV vaccination programme on cervical abnormalities in Victoria, Australia: an ecological study. *Lancet (London, England)*, 377(9783), 2085–2092. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60551-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60551-5)

Cardeal, L. B. da S., Boccardo, E., Termini, L., Rabachini, T., Andreoli, M. A., di Loreto, C., ... Maria-Engler, S. S. (2012). HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE*, 7(3), e33585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033585>

Chakrabarti, R., Kundu, S., Kumar, S., Chakrabarti, R. (2000). Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80:133-138.

Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 610–621. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052723>

CHCCL. (2015). *CANCER EN URUGUAY 2011-2015 PRINCIPALES SITIOS ( ordenados por Incidencia )* *CANCER EN URUGUAY 2011-2015 PRINCIPALES SITIOS ( ordenados por Incidencia )*.

Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., & El, G. (2005). Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncology*.

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>

De Marco, F., Bucaj, E., Foppoli, C., Fiorini, A., Blarzino, C., Filipi, K., ... Perluigi, M. (2012). Oxidative Stress in HPV-Driven Viral Carcinogenesis: Redox Proteomics Analysis of HPV-16 Dysplastic and Neoplastic Tissues. *PLoS ONE*, 7(3), e34366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034366>

De Marco, F., Perluigi, M., Foppoli, C., Blarzino, C., Cini, C., Coccia, R., & Venuti, A. (2007). UVB irradiation down-regulates HPV-16 RNA expression: implications for malignant progression of transformed cells. *Virus Research*, 130(1–2), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.06.018>

den Boon, J. A., Pyeon, D., Wang, S. S., Horswill, M., Schiffman, M., Sherman, M., ... Ahlquist, P. (2015). Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), E3255–E3264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509322112>

Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R., & Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005>

DiMaio, D., & Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*, 20(54 REV. ISS. 7), 7866–7873. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1204915>

- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, *110*(5), 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, *30*, F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Duensing, S., & Munger, K. (2004). Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *International Journal of Cancer*, *109*, 157–162. <https://doi.org/10.1002/ijc.11691>
- Eastmond, D. A., & Tucker, J. D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *13*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1002/em.2850130104>
- Estêvão, D., Costa, N. R., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2019). Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.01.001>
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, *121*(11), 2381–2386. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, *2*(5), 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
- Filippova, M., Johnson, M. M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S. S., ... 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. *Journal of Virology*, *81*(8), 4116–4129. <https://doi.org/10.1128/JVI.01924-06>
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S., & Duerksen-Hughes, P. J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21730–21739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200113200>
- Fischer, M., Uxa, S., Stanko, C., Magin, T. M., & Engeland, K. (2017). Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. *Scientific Reports*, *7*(1), 2603. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02831-9>
- Foppoli, C., De Marco, F., Cini, C., & Perluigi, M. (2015). Redox control of viral carcinogenesis: The human papillomavirus paradigm. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1850*(8), 1622–1632. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.12.016>
- Ford, J., Baron, E., & Hanawalt, P. (1998). Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Research*, *58*(4), 599–603.
- Fusenig, N. E., & Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Molecular Carcinogenesis*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199811\)23:3<144::AID-MC3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199811)23:3<144::AID-MC3>3.0.CO;2-U)
- Glei, M., Schneider, T., & Schlörmann, W. (2016). Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Archives of Toxicology*, *90*(10), 2315–2336. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y>

- Globocan. (2018). Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, females, ages 20-54. *Cancer.Com*, p. 2018. Retrieved from <http://gco.iarc.fr>
- GLOBOCAN (2018). *Age standardized (World) mortality rates, cervix uteri, all ages*. 876, 2018–2019. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today>
- Guo, L., Zhu, H., Lin, C., Che, J., Tian, X., Han, S., ... Mao, D. (2015). Associations between antioxidant vitamins and the risk of invasive cervical cancer in Chinese women: A case-control study. *Scientific Reports*, 5(1), 13607. <https://doi.org/10.1038/srep13607>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Hammes, L. S., Tekmal, R. R., Naud, P., Edelweiss, M. I., Kirma, N., Valente, P. T., ... Cunha-Filho, J. S. (2007). Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression-Clinicopathological correlation. *Gynecologic Oncology*, 105(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.11.023>
- Härle-Bachor, C., & Boukamp, P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6476–6481. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.13.6476>
- Havre, P., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K., & Glazer, P. (1995). p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Research*, 55(19), 4420–4424.
- Hiraku, Y., Tabata, T., Ma, N., Murata, M., Ding, X., & Kawanishi, S. (2007). Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Science*, 98(7), 964–972. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00497.x>
- Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A., & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.017>
- Hussain, S. (2017). Comparative efficacy of epigallocatechin-3-gallate against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS in cervical cancer biopsies and HeLa cell lines. *Współczesna Onkologia*, 3(3), 209–212. <https://doi.org/10.5114/wo.2017.70110>
- Hwang, J. H., Kim, M. K., & Lee, J. K. (2010). Dietary Supplements Reduce the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*, 20(3), 398–403. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181d02ff2>
- Hwang, S. G., Lee, D., Kim, J., Seo, T., & Choe, J. (2002). Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2923–2930. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109113200>
- IARC. (2018). Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, Africa, Tanzania, United Republic of, males, all ages. *Cancer Today*, p. 2018. Retrieved from <http://gco.iarc.fr/today/>
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J. I., Caldecott, K. W., & Stubenrauch, F. (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *The EMBO Journal*, 21(17), 4741–4748. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF443>
- Jayshree, R., Sreenivas, A., Tessy, M., & Krishna, S. (2009). Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*, 130, 286–295.

- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L., & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*, *69*(5), 2989–2997. Retrieved from <https://jvi.asm.org/content/69/5/2989>
- Kemp, T. J., Hildesheim, A., Garcia-Pineros, A., Williams, M. C., Shearer, G. M., Rodriguez, A. C., ... Pinto, L. A. (2010). Elevated Systemic Levels of Inflammatory Cytokines in Older Women with Persistent Cervical Human Papillomavirus Infection. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *19*(8), 1954–1959. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0184>
- Kilic, U., Sahin, K., Tuzcu, M., Basak, N., Orhan, C., Elibol-Can, B., ... Kucuk, O. (2014). Enhancement of Cisplatin sensitivity in human cervical cancer: epigallocatechin-3-gallate. *Frontiers in Nutrition*, *1*, 28. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00028>
- Knapp, A., McManus, P., Bockstall, K., & Moroianu, J. (2009). Identification of the nuclear localization and export signals of high risk HPV16 E7 oncoprotein. *Virology*, *383*(1), 60–68.
- Lee, G. J., Chung, H. W., Lee, K. H., & Ahn, H. S. (2005). Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Korean Medical Science*, *20*(2), 267–272. <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.2.267>
- Lee, K.-A., Kang, J.-W., Shim, J.-H., Won Kho, C., Goo Park, S., Gu Lee, H., ... Yoon, D.-Y. (2005). Protein profiling and identification of modulators regulated by human papillomavirus 16 E7 oncogene in HaCaT keratinocytes by proteomics. *Gynecologic Oncology*, *99*(1), 142–152. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2005.05.039>
- Leekha, A., Gurjar, B. S., Tyagi, A., Rizvi, M. A., & Verma, A. K. (2016). Vitamin C in synergism with cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling and p53 upregulation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *142*(12), 2503–2514. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2235-z>
- Lehmann, T., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W., Welsh, J., ... Harriss, C. (1993). p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, *14*, 833–839.
- Li, B., Hu, Y., Ye, F., Li, Y., Lv, W., & Xie, X. (2010). Reduced miR-34a Expression in Normal Cervical Tissues and Cervical Lesions With High-Risk Human Papillomavirus Infection. *International Journal of Gynecological Cancer*, *20*(4), 597–604. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181d63170>
- Li, S., Labrecque, S., Gauzzi, M. C., Cuddihy, A. R., Wong, A. H., Pellegrini, S., ... Koromilas, A. E. (1999). The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- $\alpha$ . *Oncogene*, *18*(42), 5727–5737. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202960>
- Liou, GY., Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, *44*(5): 479-496.
- Liu, Y., Heilman, S., Illanes, D., Sluder, G., & Chen, J. (2007). p53-independent abrogation of a postmitotic checkpoint contributes to human papillomavirus E6-induced polyploidy. *Cancer Research*, *67*(6), 2603–2610.
- Longworth, M. S., Wilson, R., Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO Journal*, *24*: 1821-1830.
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, *4*(JUL), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>

- Maher, D. M., Bell, M. C., O'Donnell, E. A., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2011). Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. *Molecular Carcinogenesis*, *50*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1002/mc.20695>
- Mangino, G., Chiantore, M. V., Iuliano, M., Fiorucci, G., & Romeo, G. (2016). Inflammatory microenvironment and human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *30*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.03.007>
- Manju, V., Kalaivani Sailaja, J., & Nalini, N. (2002). Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer patients: a case-control study. *Clinical Biochemistry*, *35*(8), 621–625. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498996>
- Martinez-Zapien, D., Ruiz, F., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez-Ramos, J., Forster, A., ... Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*, *529*(7587), 541–545.
- McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathogens*, *13*(4), e1006211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>
- McLaughlin-Drubin, M. E., Huh, K.-W., & Münger, K. (2008). Journal of Virology. *J. Virol.*, *61*(4), 962–971. <https://doi.org/10.1128/jvi.00579-08>
- Meshar, D., Panwar, K., Thomas, S. L., Beddows, S., & Soldan, K. (2016). Continuing reductions in HPV 16/18 in a population with high coverage of bivalent HPV vaccination in England: An ongoing cross-sectional study. *BMJ Open*, *6*(2), 1–8. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-009915>
- Mileo, A. M., Abbruzzese, C., Mattarocci, S., Bellacchio, E., Pisano, P., Federico, A., ... Paggi, M. G. (2009). Human Papillomavirus-16 E7 Interacts with Glutathione S-Transferase P1 and Enhances Its Role in Cell Survival. *PLoS ONE*, *4*(10), e7254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007254>
- Modis, Y., Trus, B. L., & Harrison, S. C. (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal*, *21*(18), 4754–4762. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF494>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Publishing Group*, *10*(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Murtagh, J., Rosenblatt, J., Coleman, J., & Murtagh, C. (2018). Cervical cancer screening. In *Murtagh's General Practice* (7th ed.).
- Myung, S.-K., Ju, W., Kim, S., Kim, H., & Korean Meta-analysis (KORMA) Study Group. (2011). Vitamin or antioxidant intake (or serum level) and risk of cervical neoplasm: a meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *118*(11), 1285–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.03032.x>
- Naidu, M. S. K., Suryakar, A. N., Swami, S. C., Katkam, R. V., & Kumbar, K. M. (2007). Oxidative stress and antioxidant status in cervical cancer patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *22*(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/BF02913333>
- Nair, S., Li, W., & Kong, A.-N. T. (2007). Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, *28*(4), 459–472. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00549.x>
- Natto, M. J., Savioli, F., Quashie, N.B., Dardonville, C., Rodenko, B., Koning, H. P. (2012).

Validation of novel fluorescence assays for the routine screening of drug susceptibilities of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67:933-943.

Nguyen, C., Eichwald, C., Nibert, M., & Münger, M. (2007). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Centrosomal Component  $\gamma$ -Tubulin. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.01669-07>

Pańcyszyn, A., Boniewska-Bernacka, E., & Głąb, G. (2018). Telomeres and Telomerase During Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 22(4), 421–430. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0336-x>

Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A., McCance, D. J., & Lüscher, B. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO Journal*, 18(18), 5061–5072. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.5061>

Pim, D., Collins, M., & Banks, L. (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, 7(1), 27–32.

Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P., & Lambert, P. F. (2009). Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. *PLoS Pathogens*, 5(2), e1000318. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000318>

Reddy, V. G., Khanna, N., & Singh, N. (2001). Vitamin C augments chemotherapeutic response of cervical carcinoma HeLa cells by stabilizing P53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(2), 409–415. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4593>

Registro Nacional de Cáncer. (2018). Situación Epidemiológica Del Uruguay en relación al cáncer. *META*. 1–61.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

Rezk, Y. A., Balulad, S. S., Keller, R. S., & Bennett, J. A. (2006). Use of resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(5), e23-6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.11.030>

Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., ... Franco, E. L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 12(6), 485–490.

Rodríguez, A. C., Schiffman, M., Herrero, R., Wacholder, S., Hildesheim, A., Castle, P. E., ... Burk, R. (2008). Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(7), 513–517. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn044>

Romano, G., Sgambato, A., Mancini, R., Capelli, G., Giovagnoli, M. R., Flamini, G., ... Cittadini, A. (2000). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis*, 21(6), 1143–1147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837002>

Sapp, M., & Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral entry mechanisms: Human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS Journal*, 276(24), 7206–7216. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x>

Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., Monk, B. J., Stanley, M. A., & Franceschi, S. (2016). *Carcinogenic human papillomavirus infection*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>

- Schiffman, M., Herrero, R., DeSalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Cecilia Rodriguez, A., ... Burk, R. D. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, *337*(1), 76–84. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2005.04.002>
- Schiffman, M., & Wentzensen, N. (2013). Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *22*(4), 553–560. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1406>
- Schoop, V. M., Fusenig, N. E., & Miranca, N. (1999). Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, *112*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x>
- Sedjo, R. L., Roe, D. J., Abrahamsen, M., Harris, R. B., Craft, N., Baldwin, S., & Giuliano, A. R. (2002). Vitamin A, carotenoids, and risk of persistent oncogenic human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *11*(9), 876–884. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223432>
- Shang, J., Schwarz, C., Sanchez Ruderisch, H., Hertting, T., Orfanos, C. E., & Tebbe, B. (2002). Effects of UVA and L-ascorbic acid on nuclear factor- $\kappa$ B in melanocytes and in HaCaT keratinocytes. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, *15*(5), 353–359. <https://doi.org/10.1159/000064541>
- 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*(8), 2112–2122. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401106>
- Shukla, Mahata, S., Shishodia, G., Pande, S., Verma, G., Hedau, S., ... Bharti, A. C. (2014). Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. *Indian Journal of Medical Research*, *139*(4), 531. Retrieved from <http://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=0971-5916;year=2014;volume=139;issue=4;spage=531;epage=543;aulast=Shukla#.XOWZZC5t-VY.mendeley>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, *175*(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Sowjanya, A. P., Rao, M., Vedantham, H., Kalpana, B., Poli, U. R., Marks, M. A., & Sujatha, M. (2016). Correlation of plasma nitrite/nitrate levels and inducible nitric oxide gene expression among women with cervical abnormalities and cancer. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, *52*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.09.005>
- Spardy, N., Covella, K., Cha, E., Hoskins, E., Wells, S., Duensing, A., & Duensing, S. (2009). Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein attenuates DNA damage checkpoint control by increasing the proteolytic turnover of claspin. *Cancer Research*, *69*(17), 7022–7029.
- Srivenugopal, K., & Ali-Osman, F. (2002). The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*, *21*(38), 5940–5945.
- Stanley, M. A. (2012). Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
- 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. *Journal of Virology*, 69(5), 3185–3192. Retrieved from <https://jvi.asm.org/content/69/5/3185>
- Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. (2007). Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Research*, 67(8), 3976–3985. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4273>
- Terashima, S., Hosokawa, Y., Yoshino, H., Yamaguchi, M., & Nakamura, T. (2013). Effect of ascorbic acid and X-irradiation on HL-60 human leukemia cells: The kinetics of reactive oxygen species. *Oncology Reports*, 30(6), 2653–2658. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2758>
- Therrien, J., Drouin, R., Baril, C., & Drobetsky, E. (1999). Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15068–15043.
- Trottier, H., & Burchell, A. N. (2009). Epidemiology of mucosal human papillomavirus infection and associated diseases. *Public Health Genomics*, 12(5–6), 291–307. <https://doi.org/10.1159/000214920>
- Tummers, B., & van der Burg, S. (2015). High-Risk Human Papillomavirus Targets Crossroads in Immune Signaling. *Viruses*, 7(5), 2485–2506. <https://doi.org/10.3390/v7052485>
- Turcu Francisca E. Reyes, Ventii Karen H., W. K. D. (2010). NIH Public Access. *Annu Rev Biochem*, 125(9), 363–397. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526.Regulation>
- Venkatraman, M., Anto, R. J., Nair, A., Varghese, M., & Karunakaran, D. (2005). Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 44(1), 51–59. <https://doi.org/10.1002/mc.20116>
- Vieira, V. C., Leonard, B., White, E. A., Starrett, G. J., Temiz, N. A., Lorenz, L. D., ... Harris, R. S. (2014). Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *MBio*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02234-14>
- Wallace, N. A., & Galloway, D. A. (2014). Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.003>
- Wang, X., Meyers, C., Guo, M., & Zheng, Z.-M. (2011). Upregulation of p18Ink4c expression by oncogenic HPV E6 via p53-miR-34a pathway. *International Journal of Cancer*, 129(6), 1362–1372. <https://doi.org/10.1002/ijc.25800>
- Wasson, C., Morgan, E., Muller, M., Ross, R., Hartley, M., Roberts, S., & Macdonald, A. (2017). Human papillomavirus type 18 E5 oncogene supports cell cycle progression and impairs epithelial differentiation by modulating growth factor receptor signalling during the virus life cycle. *Oncotarget*, 8, 103581–103600.
- Wei, L., Gravitt, P. E., Song, H., Maldonado, A. M., & Ozbun, M. A. (2009). Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus-infected cells. *Cancer Research*, 69(11), 4878–4884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4695>
- 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 Virology*, 6(1), 45–57. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.73>

- Ye, Z.-W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(8), 1607–1621. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.010>
- Yen, F.-L., Lin, Z.-C., Lee, C.-W., Tsai, M.-H., Ko, H.-H., Fang, J.-Y., ... Hu, S. C.-S. (2016). Eupafolin nanoparticles protect HaCaT keratinocytes from particulate matter-induced inflammation and oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 3907–3926. <https://doi.org/10.2147/IJN.S109062>
- Zoberi, I., Bradbury, C. M., Curry, H. A., Bisht, K. S., Goswami, P. C., Roti Roti, J. L., & Gius, D. (2002). Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Cancer Letters*, 175(2), 165–173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741744>
- Wallace, N. A, Galloway, D. A. (2014). Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.003>
- WHO (2018). Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2018, Hodgkin lymphoma, males, all ages. *International Agency for Research on Cancer*. Retrieved from <https://gco.iarc.fr/>
- WHO. (2019). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer.