



**Evaluación de la respuesta a UVB en células
inmortales y tumorigénicas de cérvix**

**Universidad Autónoma de Zacatecas
Unidad Académica de Ciencias Nucleares**

Tesis de Doctorado en Ciencia Básica

Presenta

M. en C. Angelica Judith Granados López

Director de Tesis

Dr. Eduardo Manzanares Acuña

Docente-Investigador de la Unidad Académica de Ciencias Nucleares

De la Universidad Autónoma de Zacatecas

RESUMEN

La exposición a radiación Ultravioleta (UV) ha sido ligada a daño y carcinogénesis en la piel, sin embargo, recientemente, la UVB ha sido propuesta como una herramienta terapéutica de cáncer. En el presente trabajo, investigamos los efectos celulares y moleculares de la UVB en líneas celulares inmortales y tumorigénicas-virus de papiloma humano (VPH) negativas (-) y positivas (+). Las células fueron irradiadas con 220.5 a 1102.5 J/m² de UVB y se evaluó la proliferación celular por incorporación de cristal violeta, mientras que los análisis de ciclo celular y apoptosis se llevaron a cabo a través de citometría de flujo. Generalmente, el efecto de la UVB en todas las células se registró a partir de 661.5 J/m² y fue exacerbado a 1102 J/m². Todas las líneas celulares fueron afectadas por inhibición de proliferación celular, detención de ciclo celular e inducción de apoptosis con diferente grado dependiendo del nivel de tumorigénesis o tipo viral. El análisis de la proteína p53, un gen bien establecido de respuesta a UVB; E2F1 y proteínas del sistema de microtúbulos se realizó por medio de inmunodetección en fase sólida en respuesta a UVB en células SiHa. La disminución de la expresión de las proteínas E2F1 y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) correlacionó con la alteración de los procesos celulares estudiados, mientras que el cambio de expresión de las proteínas p53 y proteína asociada a microtúbulos 1S (MAP1S) se observó a partir de 882 J/m², sugiriendo una regulación de estas proteínas en condiciones de daño celular más severas. Sin embargo, la transición en la expresión de α -tubulina3C y β -Tubulina fue abruptamente notoria hasta la dosis de 1102.5 J/m² y particularmente, la expresión de γ -Tubulina permaneció sin alteración significativa. Este estudio generó información útil en el entendimiento del efecto de UVB en líneas celulares cervicales.

Abstract

Ultraviolet (UV) exposure has been linked to skin damage and carcinogenesis, but recently UVB has been proposed as a therapeutic approach for cancer. Herein, we investigated the cellular and molecular effects of UVB in immortal and tumorigenic HPV positive and negative cells. Cells were irradiated with 220.5 to 1102.5 J/m² of UVB and cell proliferation was evaluated by crystal violet, while cell cycle arrest and apoptosis analysis were performed through flow cytometry. UVB effect on cells was recorded at 661.5 J/m² and it was exacerbated at 1102.5 J/m². All cell lines were affected by proliferation inhibition, cell cycle ablation and apoptosis induction, with different degrees depending on tumorigenesis level or HPV type. Analysis of the well-known UV-responsive p53, E2F1 and microtubules system proteins was performed in SiHa cells in response to UVB through Western-blotting assays. E2F1 and the Microtubule-associated protein 2 (MAP2) expression decrease correlated with cellular processes alteration while p53 and Microtubule-associated Protein 1S (MAP1S) expression switch was observed since 882 J/m², suggesting they were required under more severe cellular damage. However, expression transition of α -Tubulin3C and β -Tubulin was abruptly noticed until 1102.5 J/m² and particularly, γ -Tubulin protein expression remained without alteration. This study provides insights into the effect of UVB in cervical cancer cell lines.

Índice

| | |
|---|----|
| CAPITULO 1 | 1 |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Cáncer..... | 4 |
| 2.2 Características del Cáncer | 7 |
| 2.2.1 Proliferación Ilimitada..... | 7 |
| 2.2.2 Evasión de Supresores de Crecimiento | 7 |
| 2.2.3 Resistencia a Muerte Celular..... | 8 |
| 2.2.3 Inmortalización Replicativa..... | 8 |
| 2.2.4 Angiogénesis | 9 |
| 2.2.5 Invasión y Metástasis | 9 |
| 2.2.6 Reprogramación del Metabolismo Energético | 11 |
| 2.2.7 Evasión del sistema inmune | 11 |
| 3. CANCER CERVICAL..... | 12 |
| 3.1 Epidemiología..... | 13 |
| 3.2 El Cérvix..... | 15 |
| 3.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)..... | 15 |
| 3.4 Desarrollo del Cáncer Cervical..... | 16 |
| 3.5 Estadios del Cáncer Cervical..... | 17 |
| 3.6 Tratamiento del cáncer cérvico-uterino..... | 17 |
| 4. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV)..... | 19 |
| 4.1 Efecto de la RUV en Biomoléculas..... | 21 |
| 4.2 Ácidos Desoxirribonucleicos..... | 22 |
| 4.3 Ácidos Ribonucleicos (ARN)..... | 23 |
| 4.4 Proteínas | 23 |
| 4.5 UV y Cáncer | 23 |
| 4.6 UV y Apoptosis | 24 |
| 4.7 Tratamientos Basados en UV | 25 |
| 5. MICROTÚBULOS..... | 26 |
| 5.1 Tubulinas | 27 |
| 5.1.1 α -Tubulina | 27 |
| 5.1.2 β -Tubulina | 27 |
| 5.1.3 ϵ -Tubulina..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.1.4 δ -Tubulina | 28 |
| 5.1.5 γ -Tubulina | 28 |
| 5.2 Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs)..... | 30 |
| 5.2.1 Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (MAP2) | 31 |
| 5.2.2 Proteína Asociada a Microtúbulos 1S (MAP1S)..... | 32 |
| 6. PROTEÍNAS QUE REGULAN EL CICLO CELULAR..... | 34 |
| 6.1 P53 | 34 |
| 6.2 E2F1 | 35 |
| CAPÍTULO 2 | 36 |
| 1. JUSTIFICACIÓN..... | 36 |
| 2. HIPÓTESIS | 37 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 38 |
| 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 38 |
| CAPÍTULO 3 | 38 |
| 1. METODOLOGÍA..... | 38 |
| 1.1 Cultivo Celular | 38 |
| 1.2 Irradiación de Células con Luz UVB | 39 |
| 1.2 Ensayo de Proliferación Celular | 39 |
| 1.3 Extracción de Proteínas de Células HaCaT, C-33A, SiHa y CaLo | 40 |
| 1.4 Detección de Proteínas p53, E2F, Map1s, Map2, α 3C-, β - y γ -Tubulinas..... | 40 |
| 1.5 Evaluación del Ciclo Celular por Citometría de Flujo | 41 |
| 1.6 Ensayo de Apoptosis | 42 |
| 1.7 Análisis Estadístico | 42 |
| 2. RESULTADOS NOVEDOSOS ESPERADOS | 43 |
| CAPÍTULO 4 | 43 |
| 1. RESULTADOS EXPERIMENTALES..... | 43 |
| 1.1 Proliferación de Células SiHa en Respuesta a la Radiación UVB | 43 |
| 1.2 Proliferación de células HaCat en respuesta a la radiación UVB..... | 47 |
| 1.3 UVB inhibe la proliferación de las células Inmortal, tumorigénicas, VPH-Positivas y -Negativas de manera dosis dependiente..... | 48 |
| 2. La Radiación UVB Inhibe el Ciclo Celular de las Células Inmortal, Tumorigénicas, VPH Negativas y VPH positivas | 55 |
| 2.1 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 72 hrs post-IR | 55 |

| | |
|--|----|
| 2.2 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 72 hrs post-IR | 58 |
| 2.3 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A a las 72 hrs post-IR | 59 |
| 2.4 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 72 hrs post-IR | 60 |
| 2.5 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 48 hrs post-IR | 61 |
| 2.6 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A a las 48 hrs post-IR | 62 |
| 2.7 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 48 hrs post-IR | 63 |
| 2.8 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 48 hrs post-IR | 64 |
| 2.9 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 24 hrs post-IR | 65 |
| 2.10 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C-33A a las 24 hrs post-IR | 67 |
| 2.11 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 24 hrs post-IR | 68 |
| 2.12 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 24 horas post-IR | 69 |
| 3. APOPTOSIS | 70 |
| 3.1 La UVB Induce a Apoptosis de Líneas Celulares Inmortal, Tumorigénicas, VPH Negativas y Positivas de Manera Dosis-Dependiente | 70 |
| 3.1.1 Apoptosis de Células HaCaT Irradiadas con UVB | 70 |
| 3.1.2 Apoptosis de Células C-33A Irradiadas con UVB | 72 |
| 3.1.3 Apoptosis de Células SiHa Irradiadas con UVB | 74 |
| 3.1.4 Apoptosis de Células CaLo Irradiadas con UVB | 77 |
| 4. Evaluación de la expresión de proteínas en respuesta a UVB..... | 79 |
| 4.1 P53, E2F y Proteínas del Sistema de Microtúbulos son Reguladas en Células SiHa Tratadas con UVB | 79 |
| 4.2 La Expresión de las Proteína p53, E2F1, α -, β -, y δ -Tubulinas es regulada de manera dosis dependiente de UVB en línea celular C-33A | 81 |
| 4.3 Expresión de la proteína p53 en línea celular CaLo..... | 83 |
| CAPÍTULO 5 | 84 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 84 |
| CAPÍTULO 6 | 87 |

| | |
|----------------------|----|
| 6. CONCLUSIONES..... | 87 |
| CAPITULO 7 | 88 |
| 7. REFERENCIAS | 88 |

CAPITULO 1

1. Introducción

El cáncer cervical (CC) o cáncer de cuello uterino (CaCu) es una enfermedad maligna caracterizada por la multiplicación y desarrollo descontrolado y desordenado de células del epitelio cervical que poseen alta proliferación, migración, invasión e inhibida capacidad de muerte. El CaCu es considerado un problema de salud, principalmente en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, África Oriental y Asia Occidental. También países como Mongolia y China tienen una alta incidencia de esta enfermedad [1]. En México, el CC es la segunda causa de muerte por enfermedad maligna en mujeres con una ocurrencia de 13,960 casos al año y una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. En el año 2015 se registraron 3,771 defunciones con una tasa de 11.3 por 100,000 mujeres. La mortalidad de CC bajó de 28.7 a 14.6 por cada 100,000 mujeres [2, 3], sin embargo, esta enfermedad es considerada un problema de salud debido a su alta mortalidad e incidencia, así como debido a la recurrencia de la enfermedad después del tratamiento convencional [4].

El principal factor etiológico de CC es la infección crónica con el virus de papiloma humano (VPH) principalmente de los tipos de alto riesgo 16 y 18 que contribuyen con el 60 y 10 % de los casos respectivamente [5-7]. La alteración de genes debido a la integración del virus en el genoma humano es uno de los eventos que conduce a transformación celular debido a la eliminación o interrupción de genes celulares [8, 9]. Adicionalmente, dicha integración es responsable de la pérdida de genes virales de regulación que conducen a la sobreexpresión y función de onco-proteínas virales como E6 y E7 que contribuyen activamente en el proceso de transformación y desarrollo de cáncer cervical por medio de la inhibición y estimulación de las proteínas p53 y E2F1 respectivamente [10]. p53 es una proteína que regula transcripcionalmente la expresión positiva de proteínas involucradas con la detención del ciclo celular para el chequeo de daño y reparación al ADN, así como de proteínas que inducen a muerte celular en los casos de daño severo a ADN [11]. E2F1 es un factor transcripcional que conduce a la expresión de proteínas que promueven la progresión de la síntesis de ADN y el progreso del ciclo celular [12].

El tratamiento estándar de este padecimiento en estadios tardíos es basado en la concurrente administración radiación ionizante y compuestos quimioterápicos como el cisplatino. De

manera alarmante, aproximadamente el 50% de las pacientes que reciben este tratamiento desarrollan tumores progresivos o recurrentes, con cinco años de supervivencia del 21-64% después de exenteración pélvica [4]. Por lo tanto, los estudios conducidos a mejorar el tratamiento y respuesta al mismo son de relevancia.

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de radiación electromagnética que en base a su longitud de onda y frecuencia es clasificada en UV A (UVA de 320-400 nm), UV B (UVB, de 280-320 nm) y UV C (UVC, 100-280 nm) (referencia). La exposición a UV tiene importantes efectos biológicos en el ser humano, algunos benéficos como la inducción de producción de vitamina D en las células epidermales [13]; y efectos desfavorables como la formación de eritemas y quemaduras graves en la piel; y la inducción de distintos tipos de cáncer de piel. Debido a su efecto dañino en el ADN, como la formación de rupturas de DNA de una sola hebra, la UV es utilizada en el tratamiento de infecciones de la piel [14] y de algunos tipos de cáncer basados en la muerte celular inducida como respuesta al daño a ADN y activación de proteínas de la membrana celular [15]. De forma interesante, recientemente, se ha sugerido que la exposición a radiación UV puede ser un factor que se correlaciona con la incidencia de CC a diferencia de la relación observada con otros tipos de cánceres invasivos como de cerebro/sistema nervioso central, pecho y colo/rectal [16-23]. Adicionalmente, se ha observado que las proteínas E6 y E7 de VPH pueden impedir la reparación disparada por daño a ADN (RDD) inducido por radiación UV [24-26]. Por otro lado, interesantemente, un estudio reportó que la radiación UVC y no así la radiación gamma conduce a células de teratoma a muerte celular a las 2 horas después de la exposición la radiación, sugiriendo a la UV como método alternativo para el tratamiento de enfermedades malignas [27]. Sin embargo, aún se desconoce la influencia que pueda tener el contenido de diferentes tipos de HPV sobre la inducción de CC en presencia de UV y el que puede tener la radiación UV sobre células malignas de CC con diferente contenido viral. La función de p53 es desencadenada en respuesta al daño a ADN (RDD) por diversos tipos de estrés entre ellos la radiación UV. La inducción de la activación de p53 por radiación UV ha sido ampliamente estudiada en queratinocitos.

Las células tumorales adquieren diversos cambios moleculares y celulares que culminan en ventajas de supervivencia que son reconocidas como “características de cáncer” como, proliferación ilimitada, inhibición de apoptosis, angiogénesis, capacidad de migración e

invasión y evasión de la respuesta inmune [28]. Dichos procesos celulares son desregulados como consecuencia de la expresión inadecuada de genes y proteínas que inducen a la proliferación celular (oncoproteínas) y de proteínas que detienen el ciclo celular o que inducen a muerte celular programada (oncosupresores). Las características de cáncer se acompañan de cambios a nivel de citoesqueleto, el cual es constituido por microtúbulos y filamentos de actina. Los microtúbulos participan en la formación del huso mitótico para llevar a cabo la separación cromosomal que culmina en la generación de células hijas [29]. En la apoptosis, los microtúbulos participan reorganizando el citoesqueleto, contribuyendo a la progresión de la muerte celular ([30]. Los microtúbulos están constituidos a su vez por heterodímeros de proteínas llamadas tubulinas de las cuales existen diferentes subtipos como α -, β -, γ -, δ - y ϵ -tubulinas. Las tubulinas, además de su función estructural poseen funciones de anclaje para proteínas de señalización y de transporte de proteínas y metabolitos. La desregulación de las tubulinas se ha visto relacionada con la generación de diferentes tipos de cáncer. γ -Tubulina es una proteína que en citosol se encarga de la nucleación de las tubulinas α y β que forman los microtúbulos, así como del establecimiento de polaridad de los mismos. Por su parte, γ -Tubulina nuclear regula la progresión de la fase S del ciclo celular por medio de la modulación de E2F1 [31]. Por lo tanto, las tubulinas podrían jugar un papel en la respuesta a estrés celular. En estrecha unión a los microtúbulos se encuentran también las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPS) Por su parte las MAPS participan en el anclaje del centro organizador de microtúbulos a los centrosomas; la agregación de mitocondrias resultando en muerte celular y destrucción genómica y la unión a ADN. Adicionalmente, está involucrada en el proceso de apoptosis [32, 33]. La proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) es asociada a la estabilización de los microtúbulos y a la unión a filamentos de actina, y participa en el reclutamiento de proteínas de señalización y la regulación de transporte mediado por microtúbulos. La sobreexpresión de MAP2 se ha mostrado en enfermedades malignas como el melanoma cutáneo [34], tumor carcinogénico pulmonar y carcinoma de células pequeñas [35]. La proteína asociada a microtúbulos 1S (MAP1S) se ha implicado en la dinámica de los microtúbulos, anormalidades mitóticas y muerte celular mitótica. Adicionalmente, MAP1S se ha observado en la regulación de la expresión de Bcl-2, Bcl-xL y p27. Papeles esenciales de los microtúbulos y sus proteínas asociadas incluyen la segregación de los cromosomas y

el posicionamiento de los microtúbulos durante la mitosis. Por lo tanto, defectos en estas funciones pueden llevar a la inhibición de la proliferación celular y muerte de células tumorales [36].

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta a la exposición a radiación UVB de líneas celulares tumorigénicas, VPH negativas (VPH-) y tumorigénicas, VPH positivas (VPH+) derivadas de cáncer cervical comparadas con células inmortales de queratinocitos HPV- en función de los procesos celulares de cáncer. Adicionalmente, se correlacionó dichos procesos con la expresión de las proteínas reguladoras de ciclo celular p53, E2F1 y las proteínas de microtúbulos, MAP1S, MAP2, Tubulinas- α 3C, β y γ . Se mostró que el estatus carcinogénico, el contenido y tipo de VPH puede proveer susceptibilidad a las células tumorigénicas. La expresión de proteínas en la línea celular SiHa fue dependiente de la dosis de UVB indicando que su modificación es específica a la radiación. Este estudio contribuyó a la comprensión de la respuesta a estrés causado por UVB, un tipo específico de radiación UV en células con distinto contexto tumoral y sugiere potenciales marcadores moleculares que pueden ser útiles en el diseño de herramientas de terapia, diagnóstico y pronóstico de cáncer cervical.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

Se les denomina “Cáncer” al grupo de enfermedades en las que algún tipo específico de células de un tejido en particular se dividen constante y descontroladamente formando una masa celular (tumor) anormal cuyo crecimiento autónomo produce daño al tejido u órgano en el que se encuentra, así como la muerte del organismo, causado por la carencia de nutrientes y energía que es consumida por las células cancerosas. El término cáncer proviene del término griego *carcinos* (cangrejo) debido a las proyecciones de las células cancerosas que asemejan a los dedos de este animal y se le acredita al médico griego Hipócrates, considerado el padre de la medicina de los años 460-370 a. C. El término latino de cáncer fue introducido por el físico Romano, Celsus (28-50 a. C.) y posteriormente Galeno, otro médico griego, usó la palabra *oncos* (hinchazón) para describir a los tumores.

El cáncer suele referirse de forma indistinta como neoplasia o enfermedad maligna. El proceso es multifacético y puede diseminarse a cualquier otra parte del cuerpo (metástasis) debido a las propiedades invasivas de las células [37]. Este tipo de enfermedad, es causa de severa morbilidad y de un alto número de muertes en todo el mundo. En el año 2020 se estimó un total de 9,958,133 de muertes y 19,292,789 nuevos casos de cáncer en todo el mundo. Siendo los cánceres de mama, pulmón, colorectal, próstata, estómago, hígado, esófago y cérvico uterino los tipos con mayor incidencia (Figura 1a y 1b) [1].

En el proceso de carcinogénesis, las células normales adquieren cambios moleculares y celulares que les confieren la exitosa habilidad de supervivencia ilimitada y descontrolada como son la división celular sostenida, inmortalidad, capacidad de migración e invasión, estimulación de angiogénesis, evasión de la respuesta inmune, inducción de inflamación, y utilización de mecanismos de obtención de energía, también llamados de manera general como “marcas de cáncer” (Figura 2) [28]. Cada uno de estos procesos son consecuencia de inestabilidad genómica que conduce a mutaciones en la secuencia nucleotídica del ADN, lo que genera la eliminación o disminución y/o la sobreexpresión de genes o proteínas. Las diferentes mutaciones pueden ser generadas por diferentes mecanismos ya sea por la exposición a factores intrínsecos [38] o factores externos como agentes infecciosos [39, 40], compuestos mutagénicos [41] agentes físicos como la radiación ionizante (rayos X, rayos γ , partículas α , β , neutrones entre otras [42] y radiación no ionizante como la UV [43, 44].

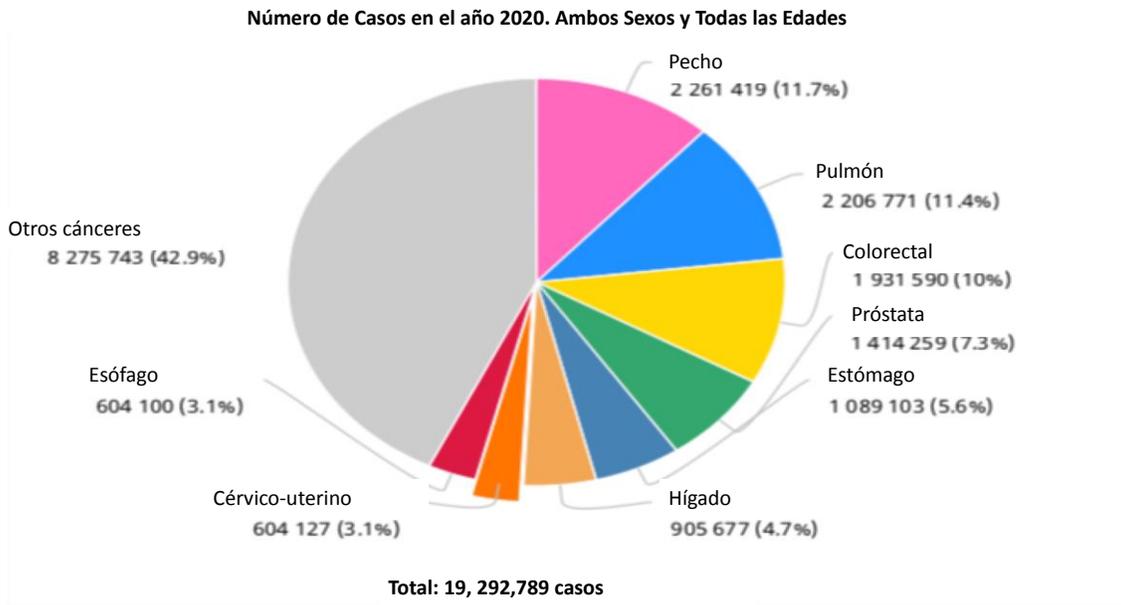


Figura 1a. Número de casos de tumores malignos. Se muestran los casos de tumores malignos en ambos sexos.

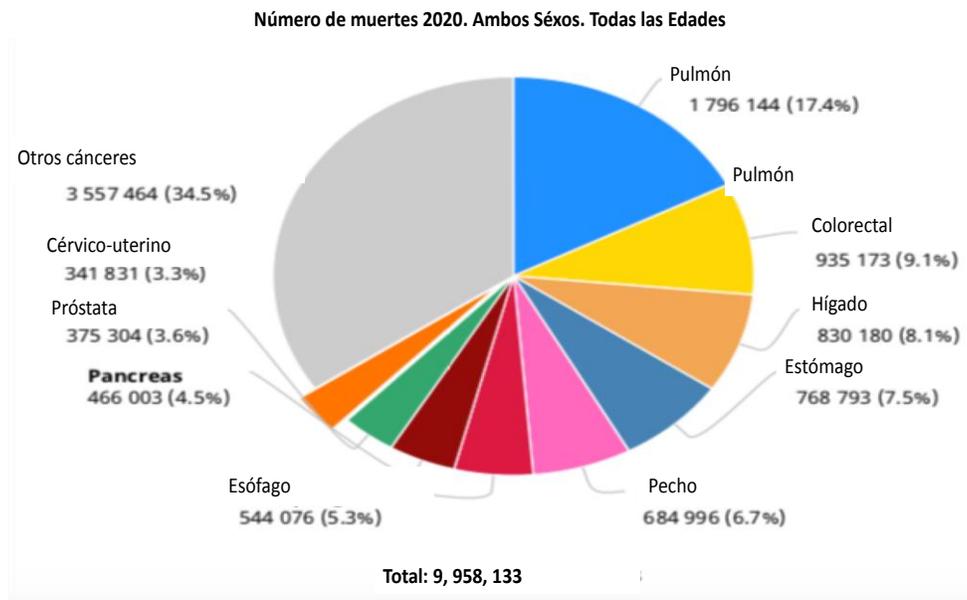


Figura 1b. Número de muertes por tumores malignos. Se muestran los casos y porcentajes de muertes por tumores malignos en ambos sexos.

2.2 Características del Cáncer

2.2.1 Proliferación Ilimitada

Para mantener la arquitectura normal y funcional de órganos y tejidos, la proliferación celular se encuentra regulada por moléculas estimuladoras e inhibidoras de la división celular asegurando de este modo la homeostasis del número de células. En células cancerígenas el equilibrio entre las células que forman un tejido se interrumpe y comienzan a proliferar sin control [28]. Este descontrolado proceso de división celular es disparado por diferentes mecanismos. Uno de ellos es mediado por la sobreexpresión o disminución de la expresión de genes y proteínas encargadas de regular el progreso o detención del ciclo celular normal. Genes o proteínas sobreexpresadas (oncogenes y oncoproteínas) son aquellas que participan en la progresión del ciclo celular como factores transcripcionales que inducen la expresión de proteínas como las ADN polimerasas que se encargan de la síntesis ADN. Otras proteínas implicadas en el progreso del ciclo celular son cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que fosforilan proteínas como E2F1, RB, c-Myc, Fos, Jun, entre otras. Por otro lado, las proteínas supresoras de tumores son aquellas cuya expresión disminuida impide que la célula pueda detenerse a corregir errores en la síntesis de ADN y como consecuencia se induce a la célula a dividirse ilimitadamente. Proteínas como p53, proteínas de chequeo (proteínas *checkpoint*) como GADD45; p21, p16, entre otras se encuentran entre este tipo de proteínas [11]. Otro mecanismo que coadyuva en la división celular continua es la autoestimulación por medio de factores de crecimiento que mantienen a las inducidas a proliferar por ejemplo por medio de la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*) [45].

2.2.2 Evasión de Supresores de Crecimiento

Las células de cáncer deben constantemente contrarrestar programas que regulan la proliferación de forma negativa. Muchos de estos programas dependen de la acción de

genes supresores de tumores. Las proteínas RB y p53 operan como nodos centrales de control las vías de señalización que conducen ya sea a proliferación celular o alternativamente a senescencia o muerte celular. La proteína RB transduce señales inhibitorias de crecimiento que generalmente se originan del exterior de la célula, mientras que p53 recibe señales de sensores de estrés que funcionan dentro de los sistemas que operan intracelularmente. Defectos en estas y otras proteínas supresoras de tumores permiten a la célula cancerosa evadir el control de la proliferación celular [28].

2.2.3 Resistencia a Muerte Celular

La proliferación celular es regulada por procesos de senescencia o muerte celular programada. La apoptosis, es un tipo de muerte celular programada que ha sido extensivamente estudiada en las últimas tres décadas. La apoptosis puede regularse por las vías de inducción intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca es llevada a cabo por medio de proteasas llamadas caspasas que actúan en cascada culminando en la activación de ADNasas que degradan el ADN y consecuentemente conducen a la muerte celular. En la activación de esta vía participa la proteína p53 que en su forma activa regula transcripcionalmente la expresión de proteínas que regulan el progreso del ciclo celular como RB y proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bim y Puma [46]. En la vía extrínseca de muerte celular participa la activación de receptores de membrana por su ligando como es el receptor de FAS para posteriormente converger con la vía intrínseca para desencadenar la apoptosis. Las células cancerígenas evitan los mecanismos de muerte celular por medio de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL; la síntesis de factores de crecimiento y autoestimulación y/o la disminución o completa eliminación de p53, la sobreexpresión de genes de supervivencia como Igf1/2, RAS, c-MYC, c-FOS, c-Jun, entre otros. [28]. La senescencia y apoptosis son dos obstáculos para la proliferación que han sido relacionados como importantes defensas anticancerígenas.

2.2.3 Inmortalización Replicativa

Otro mecanismo desarrollado por las células cancerígenas es la de inhibir el proceso de senescencia, un programa celular que establece el potencial replicativo de la célula y por lo tanto, su tiempo de vida limitado. La senescencia es proceso celular normalmente determinado por la longitud de los telómeros (extremos de las cadenas de ADN). El acortamiento de los telómeros es considerado como un dispositivo de sincronización que determina el potencial replicativo limitado de las células normales y por ende uno que es superado por las células cancerígenas por medio de la sobreexpresión de telomerasas, las cuales se encargan de la síntesis de ADN telomérico después de cada división celular evitando el acortamiento de los telómeros y manteniendo la integridad de genes indispensables para la inmortalización celular [28].

2.2.4 Angiogénesis

Como en tejidos normales, los tumores requieren sustentabilidad en la forma de nutrientes y oxígeno, así como la habilidad de evacuar los desperdicios metabólicos y el dióxido de carbono. La neovascularización asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, dirige estas necesidades [47]. Después de la morfogénesis de un organismo, la vascularización generada se mantiene normalmente quiescente hasta la generación de una herida o durante el proceso menstrual, cuando la angiogénesis se activa nuevamente de forma temporal. En contraste, durante la progresión de un tumor se activa un “switch angiogénico” que se mantiene casi siempre encendido, lo que ayuda a sostener el continuo crecimiento neoplásico [48]. Factores compensatorios que ya sea que induzcan u opongán la angiogénesis regulan este proceso. Los prototipos inductores e inhibidores de la angiogénesis son el Factor Endotelial Vascular-A (VEGF-A *Endothelial Growth Factor-A*) y Trombospondina-1 (TSP-1 *Thrombospondin-a*), respectivamente (Hanahan, 2011).

2.2.5 Invasión y Metástasis

Los procesos de invasión y metástasis han sido esquematizados en una serie de pasos que inician con la invasión local, luego la intravasación a vasos linfáticos y sanguíneos de las células de cáncer, tránsito de células de cáncer por estos sistemas, seguido por el escape de las células de cáncer de la lámina de vasos linfáticos y sanguíneos a parénquima de tejidos distantes (extravasación), formación de pequeños nódulos de células cancerígenas (micrometástasis) y finalmente el crecimiento hacia tumores macroscópicos (colonización). Las células de carcinoma (tumor) típicamente desarrollan alteraciones en su forma, así como en su unión con otras células y la matriz extracelular (MEC) por medio de proteínas de adhesión. Un cambio de los más representativos es la pérdida de E-caderina, molécula clave en la adhesión célula a célula y célula-MEC, manteniendo la quiescencia de las células en láminas celulares. El aumento de la expresión de E-cadherina es reconocido como un antagonista de la invasión y metástasis [28]. Contrariamente, otras moléculas de adhesión normalmente asociadas con la migración celular y que se encuentran sobreexpresadas en muchas células de carcinomas invasivos son las N-caderinas; proteínas normalmente asociadas con la embriogénesis, inflamación, migración de neuronas y células mesenquimales (células multipotenciales originadas de la capa mesodermal germinal con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos celulares). Un programa de regulación de desarrollo, referido como transición epitelial-mesenquimal (TEM) ha sido prominentemente implicado como una vía por la cual las células epiteliales transformadas pueden adquirir la habilidad de invadir, resistir apoptosis y diseminarse. Este programa multifasético puede ser activado transitoriamente o establemente en células de carcinoma durante el curso de invasión y metástasis. Estos cambios moleculares son activados por la expresión de factores transcripcionales, incluyendo Snail, Slug, Twist y Zeb1/2, que orquestan la transición TEM y procesos migratorios. Adicionalmente, la expresión de estos factores transcripcionales es asociado a la expresión de enzimas de degradación de matriz extracelular, movilidad incrementada, y aumentada resistencia a apoptosis. Todas estas características están implicadas en el proceso de invasión y metástasis. Otro mecanismo por el cual las células cancerígenas llevan a cabo la metástasis es la interacción bidireccional entre las células tumorigénicas y su microambiente celular, las células estromales, las cuales adquieren sus características específicas dentro del microambiente celular y aceleran la malignidad celular [47].

2.2.6 Reprogramación del Metabolismo Energético

La proliferación celular incontrolada que representa la esencia de la enfermedad neoplásica involucra no solo el descontrol de los genes y proteínas que regulan la proliferación celular, sino también de los ajustes correspondientes de metabolismo energético con el fin de mantener el crecimiento y división celular. Las células de cáncer pueden reprogramar su metabolismo de glucosa, limitando su metabolismo energético a la glucólisis (metabolismo o efecto Warburg), conduciendo a un estado que ha sido nombrado “glucólisis aeróbica”. El encendido de glucólisis ha sido asociado con la activación de los oncogenes *RAS*, *MYC* y *TP53* [49, 50]. Este apoyo en glucólisis es acentuado por las condiciones de hipoxia que operan en muchos tumores-el sistema de respuesta a hipoxia actúa pleiotrópicamente para regular de forma positiva los transportadores de glucosa principalmente *GLU1* y múltiples enzimas de la vía glucolítica. Por lo tanto, la glucólisis puede ser regulada independientemente tanto por Ras e hipoxia incrementando los niveles de los factores de transcripción *HIF α* y *HIF2 α* [51, 52].

2.2.7 Evasión del sistema inmune

La teoría de vigilancia inmunológica propone que células y tejidos son monitoreados constantemente por un sistema inmune alerta que reconoce y elimina la vasta mayoría de células cancerosas y tumores nacientes. De acuerdo con esta lógica, los tumores sólidos que aparecen han podido de alguna manera evadido las distintas armas del sistema inmune o han sido capaces de limitar la muerte mediada por las células del sistema inmune. El incremento de cáncer en pacientes inmunocomprometidos, ha apoyado en la validación de esta teoría de cáncer. Estudios en ratón en donde se ha mostrado que deficiencias en el desarrollo o función de linfocitos T citotóxicos (CTLs *cytolytic T cells*), células T cooperadoras Th1 *CD4⁺*, o asesinas naturales (NK *natural killers*) conducen a incremento en la incidencia de tumores [53] también apoyan esta teoría. Adicionalmente, células de cáncer altamente inmunogénicas pueden evadir la destrucción inmune por medio del deshabilitamiento de componentes del sistema inmune por medio de la secreción de TGF- y

oros factores inmunosupresores para paralizar la infiltración de células CTL y NK. Otros mecanismos consisten en el reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresoras, incluyendo células T reguladoras (Tregs) y células reguladoras supresoras derivadas de mielocitos (MDSC *myeloid derived suppressive cells*). Ambos pueden suprimir la acción de linfocitos citotóxicos [54].

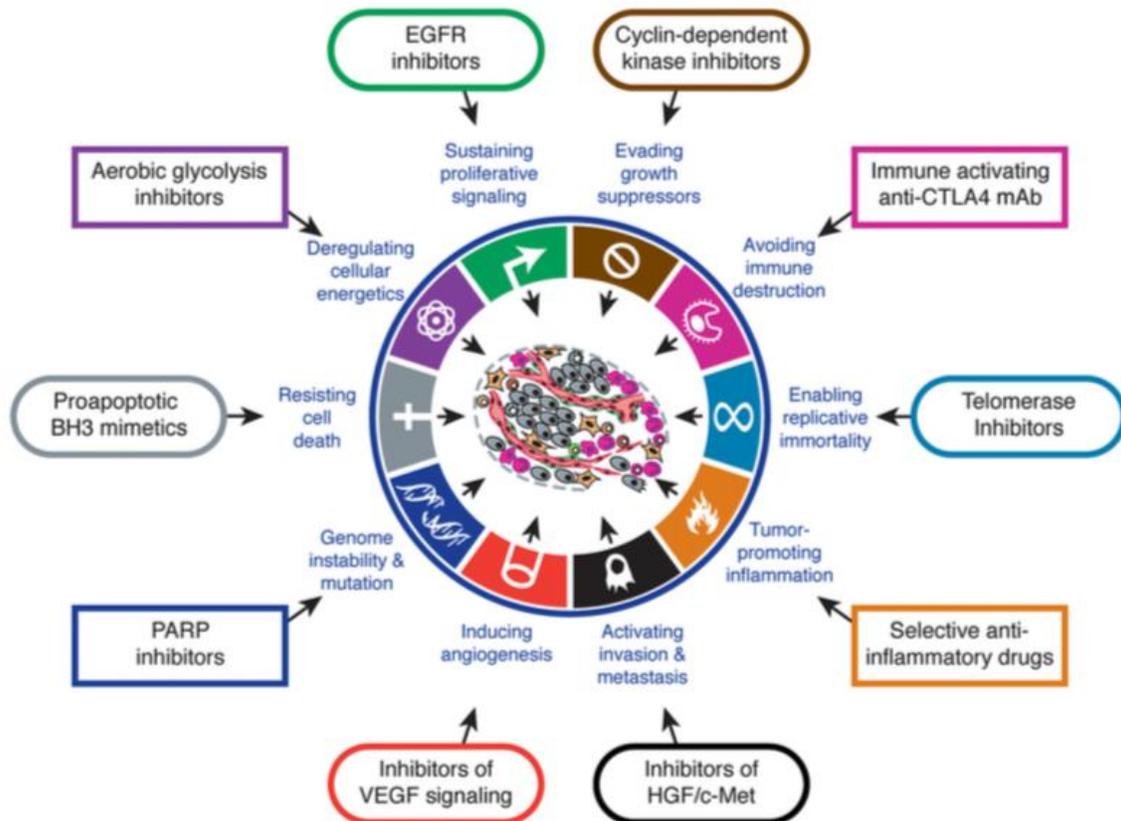


Figura 2. Características y habilidades de las células tumorígenicas. Esta imagen muestra las características necesarias que debe adquirir una célula normal antes de transformarse en tumorígenica. Tomada y modificada de Hanahan y Weinberg 2011 [28].

3. CANCER CERVICAL

El CC es una enfermedad originada en células del cérvix que han adquirido la capacidad división celular indefinida, de migrar e invadir a otros tejidos u órganos (transformación celular), causando daño en el sitio donde se aloja y carencia generalizada de nutrientes y

energía en el resto del organismo y que puede conducir a la muerte en los estados más avanzados de la enfermedad.

3.1 Epidemiología

El cáncer cervical, es una enfermedad altamente prevenible, sin embargo, la cuarta enfermedad maligna entre las mujeres en todo el mundo, después de cáncer de mama y cáncer colorectal con un estimado de 500,000 nuevos casos, Figure 4 y 250,000 muertes, Figura5. En países en desarrollo es uno de los cánceres más comunes en mujeres (80% de los casos). La incidencia de CaCu ha bajado en los últimos 30 años gracias programas de escaneo basados en la citología de Papanicolaou que identifica lesiones pre-cancerosas que pueden ser removidas antes de su progreso a cancer invasivo. Sin embargo, debido al desigual acceso a centros de salud, la incidencia y mortalidad sigue siendo un problema de salud en estos países [55].

La infección con el virus de papiloma humano es una común infección de transmisión sexual que se elimina espontáneamente en el 99% de los casos; mientras que aquellas que persisten, particularmente las infecciones con los virus de alto riesgo 16 y 18 (70% de los casos), pueden progresar a lesiones precursoras, y finalmente a cáncer cervical [6]. Un alto porcentaje de los casos (85%) de CaCu son positivos para el ADN de VPH. Los tipos virales 16, 18 y 45 se encuentran en los diferentes tipos de carcinoma cervical (de células escamosas (61%), adenocarcinoma (10%), y adenoescamoso (6%). Aun cuando se considera la infección con el VPH como el principal factor etiológico, otros eventos son necesarios para el establecimiento de la enfermedad maligna, como son, la respuesta inmune del paciente, la genética, el medio ambiente y factores socioeconómicos [2-4].

Incidencia Mundial de Cáncer Cervical. Todas las Edades

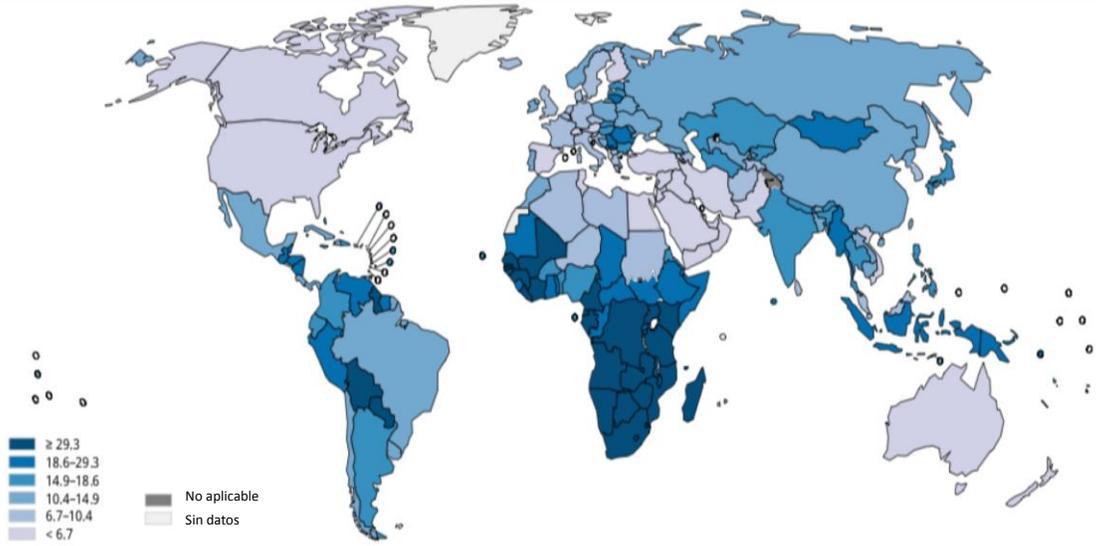


Figura 4. Incidencia mundial de Cáncer Cervical. Se muestra los números de carcinomas por país. GLOBOCAN 2020.

Incidencia Mundial de Muertes por Cáncer Cervical. Todas las Edades

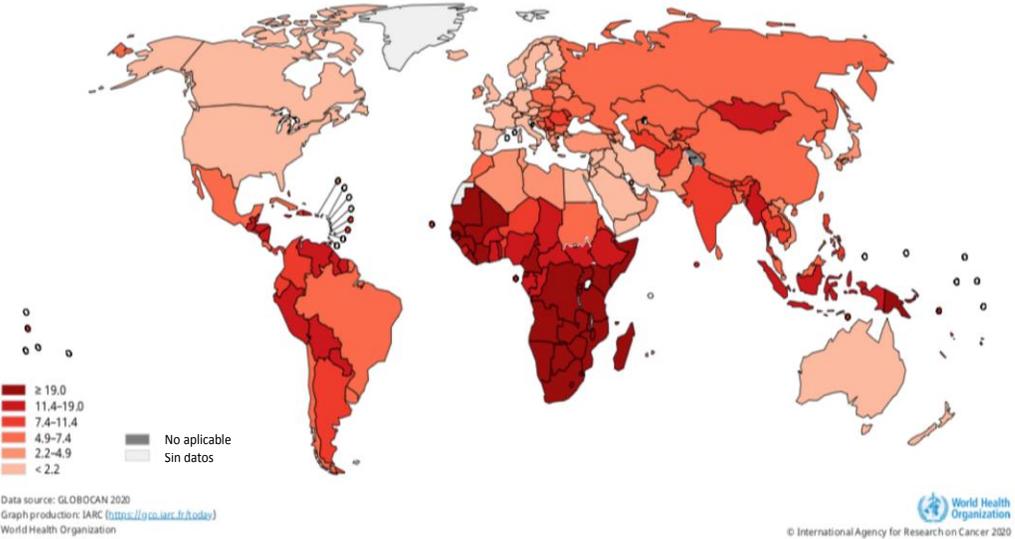


Figura 5. Incidencia de muertes por Cáncer Cervical a nivel mundial. Se muestran las muertes por cáncer cervical, el color intenso muestra mayor mortalidad. GLOBOCAN 2020.

3.2 El Cérvix

El útero, anatómicamente, es un órgano en forma de pera, localizado entre la vejiga urinaria y el recto. En la parte posterior del útero se encuentra el cérvix cuya abertura se encuentra frente a la vagina. La etimología de cérvix proviene del latín, que significa “*cuello*”. El cérvix está cubierto en su superficie por dos tipos de tejidos, el epitelio escamoso y el columnar. La unión de estos dos epitelios se conoce como la unión escamocolumnar (zona de transformación, TZ) que migra desde la periferia del ectocérvix hacia el interior del canal cervical. Normalmente protegido por el epitelio escamoso estratificado de toxinas e infecciones. El VPH primeramente infecta las células escamosas y la persistente infección con los tipos virales de alto riesgo que conducen a las células a metaplasia y displasia, la cual es el estadio pre-canceroso que ocurre en la zona TZ, Figura 6.

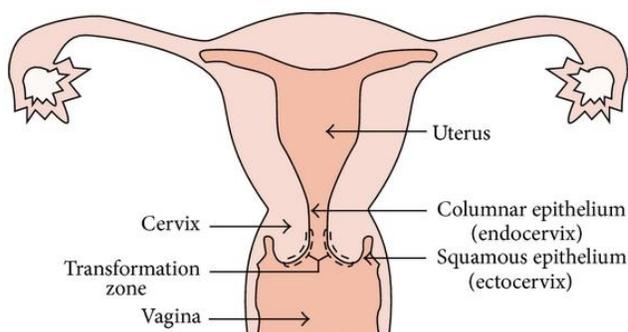


Figura 6. Imagen del cuello uterino o cérvix. Disponible en: <https://www.hindawi.com>

3.3 Virus de Papiloma Humano (VPH)

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae que presenta UN ADN circular de doble cadena formada por 8000 pares de bases (pb). VPH infecta la superficie de tejidos cutáneos y mucosos vía proteoglicanos de heparán sulfato en la membrana celular. La replicación es exclusiva de epitelio escamoso estratificado como la epidermis y membranas mucosas del cérvix. Los genes del VPH se clasifican en tempranos “Early” (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y tardíos “Late” (L1 y L2), Figura 7. Los primeros están implicados en la replicación y transcripción y los últimos constituyen las proteínas estructurales virales[5-7].

La transcripción viral es dependiente de la diferenciación celular y el perfil de proteínas específicas. Después de la infección con VPH, las proteínas virales modifican los procesos celulares normales. Los genes oncogénicos virales responsables de la malignidad celular son E6 y E7. La interacción de E6 con p53 vía E6-AP conduce a un fenotipo p53 nulo que interrumpe el ciclo celular y muerte normal. E7, interacciona con varias proteínas para inducir la transición de la fase G1 a S permitiendo la proliferación celular aumentando las características del cáncer. El principal circuito afectado por E7 es el E2F-Retinoblastoma (E2F-Rb). Esta oncoproteína viral se une a Rb liberando el factor transcripcional E2F, promoviendo la transcripción de C-MYC, ADN polimerasas, ciclinas y CDKs (Ciclinas dependientes de cinasas) entre otras [10].

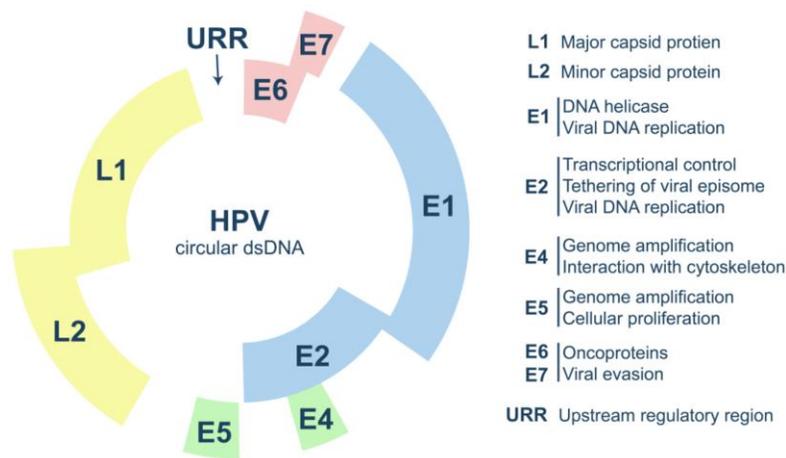


Figura 7. Organización genómica del VPH y principales funciones de sus proteínas.

3.4 Desarrollo del Cáncer Cervical

La infección con el VPH es asociada con CaCu y con lesiones pre-cancerosas o pre-malignas llamadas neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) I, II y III, las cuales constituyen los estadios previos del cáncer de cérvix según la clasificación de Bethesda. La NIC I se caracteriza por la presencia de coilocitos y un desorden mínimo en un tercio de la capa celular basal. La NIC II se caracteriza por un cambio en la razón núcleo citoplasma y presenta células basales en los dos tercios del tejido epitelial estratificado. La mayoría de las células contienen el genoma de VPH integrado. La NIC III se describe con los cambios

mencionados antes y con la mayoría del tejido epitelial invadido con células no diferenciadas encapsuladas por la membrana basal. La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) ha clasificado a las lesiones pre-cancerosas en lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, squamous intraepithelial lesion) lesiones de bajo (LSIL, *Low Squamous Intraepithelial Lesion*) que incluyen a las NIC I y lesiones de alto grado (HSIL, *High Squamous Intraepithelial Lesion*) que incluyen a las NIC II y NIC III. La ruptura de la membrana basal induce a invasión de tejidos adyacentes originando CC y promoviendo metástasis [56], Figura 8.

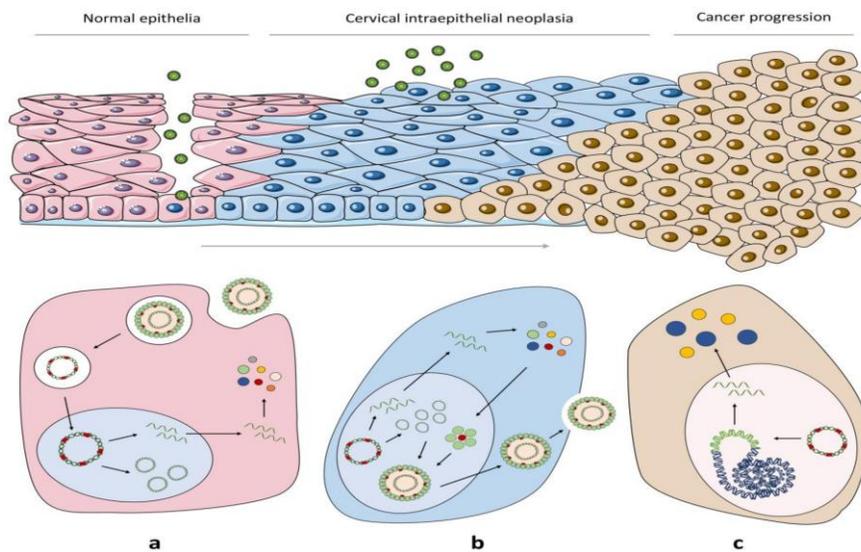


Figura 8. Desarrollo de cáncer cervical. Infección viral, NIC I, II y III. Adaptado de Ana Rita Ferreira y Cols., [57].

3.5 Estadios del Cáncer Cervical

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) ha establecido un sistema para la clasificación de los distintos estadios de progreso del cáncer cervical. En la figura 8 se muestra una breve descripción de estas fases de progresión de la enfermedad [58].

3.6 Tratamiento del cáncer cérvico-uterino

Los estadios pre-cancerosos permiten el monitoreo de lesiones intraepiteliales y el tratamiento oportuno para evitar el progreso a cáncer. El tratamiento de estas lesiones es

basado en la escisión de las lesiones por medio procedimientos de electro escisión de laso (LEEP, *Loop Electro Excision*), conización con laser o cuchillo frío.

El tratamiento de cáncer cervical es basado según el estadio de progresión de la enfermedad. Los estadios tempranos (estadio IAI/II) de cáncer son tratados con histerectomía simple o histerectomía radical y linfadenectomía con o sin radiación o quimiorradiación coadyuvante dependiendo del grado de invasión; en estadios más avanzados donde ocurre invasión a estroma, tejidos u órganos cercanos y órganos distantes, (estadios IBII, III y IV respectivamente) el tratamiento es basado en el quimioterapia (QT) o histerectomía radical acompañado con quimiorradiación (QTRT) o radioterapia (TR); quimiorradioterapia o radioterapia respectivamente [59].

La resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia o la combinación de estas modalidades es el manejo estándar de cáncer cervical local avanzado (LACC, *locally advanced cervical cancer*) que comprende del estadio IBII al estadio IVA y que representa 2/3 de los casos de la presentación del cáncer [58]. El tratamiento incluye principalmente 40-50 mg/m² de cisplatino por semana y 20-25 fracciones de un total de 40 Grays (Gy). Los estadios IVA generalmente consideran quimioterapia neoadyuvante con 2-4 ciclos de paclitaxel/carboplatina). Algunos otros paliativos son 30 Gy/3 fracciones/3 meses de RT [60]. Aun cuando el tratamiento con cisplatino y RT es el estándar para el manejo de LACC, algunos autores afirman la necesidad investigar terapias alternativas para obtener mejores resultados debido a la recurrencia de la enfermedad que cursa con rangos de supervivencia de 5 años de 60-85% para el estadio I, 40-60% para el estadio II, 40% para el estadio III y menos del 15% para el estadio IV, Figura 9.

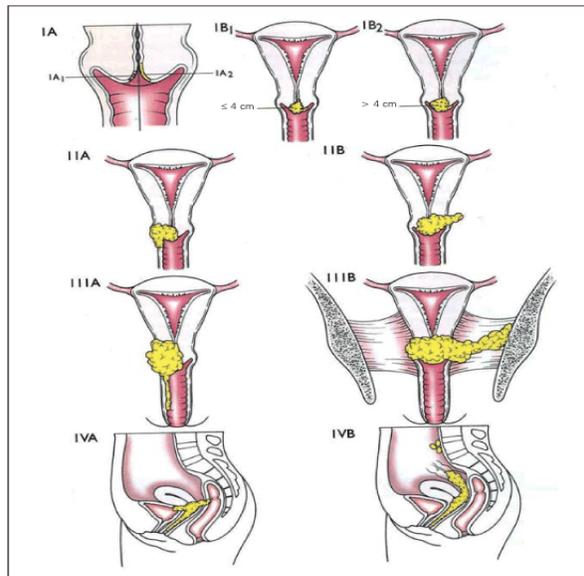


Figure 1. Staging of uterine cervix carcinoma according to FIGO⁽⁹⁾.

Figura 9. Estadíos de Cáncer Cervical de acuerdo a FIGO. Adaptado de Claudia C. Camisão y Cols., Radiol Bras 2007, vol.40 no.3 São Paulo.

4. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV)

La radiación es la emisión de energía a partir de una fuente. Existen muchos tipos de radiación, que pueden ser de alta energía (alta frecuencia) como rayos x y rayos gama (γ) o de baja energía (baja frecuencia) como las ondas de radio. Los rayos UV se encuentran a la mitad de este espectro (IARC, WHO).

La RUV es un tipo de radiación electromagnética (descubierta por Wilhelm Ritter en 1801) cuya fuente natural y principal es el sol, pero también se obtiene de fuentes artificiales como camas de sol, lámparas de desinfección (lámparas de arco de mercurio-xenón y lámparas de xenón de alta presión), lámparas de iluminación, (lámparas de vapor de mercurio) y lámparas de luz negra.

Existen diferentes tipos de rayos UV, basados en la energía contenida en sus fotones. Los rayos UV de alta energía son una forma de radiación ionizante, es decir, que tienen energía suficiente para remover un electrón (ionizar) de un átomo o molécula [61]. La radiación

ionizante puede causar daño al ADN en las células lo cual puede generar mutaciones que conducen a cáncer. Debido a que la energía de la UV de mayor energía no es capaz de penetrar profundamente en el cuerpo de seres vivos, el principal efecto de la UV reside en la piel. En la figura 10 se muestra el espectro electromagnético y la correspondiente longitud de onda y energía en electrón Volts (eV).

La Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Eclairage o(CIE, *International Commission on Illumination*) ha clasificado a la UV en tres regiones en base al rango de su longitud de onda (λ) En base a su longitud de onda y frecuencia ha sido tradicionalmente clasificada en tres regiones:

- UV-A (UVA, de 320-400 nm) que constituye cerca del 6.3% de toda la radiación recibida, sin embargo, el 95% de ésta alcanza la superficie terrestre;
- UV-B (UVB, de 280-320 nm) la cual representa solo el 1.5% del espectro, pero que tiene un alto potencial para interrumpir la integridad de la membrana celular y la función de macromoléculas biológicas (como ADN, proteínas y lípidos), e inhibición del aparato fotosintético afectando el crecimiento y productividad de plantas y por otro lado, conduciendo a procesos de carcinogénesis en células animales. La RUV también es absorbida por moléculas como porfirinas, carotenoides, esteroides y quinonas lo que conduce a consecuencias biológicas. El 5% de la UVB emitida por el sol es recibida en la superficie de la tierra.
- UV-C (UVC, 100-280 nm), la cual no es relevante bajo condiciones normales, pero tiene el mayor efecto dañino en organismos vivos.

La exposición a UV tiene importantes efectos biológicos en el ser humano, algunos benéficos como la inducción de producción de vitamina D en las células epidermales y efectos desfavorables como la formación de eritemas y quemaduras graves en la piel; y la inducción de distintos tipos de cáncer de piel.

La intensidad de los efectos causados por la UV que alcanza la superficie terrestre depende únicamente de la protección conferida por la atmósfera y la capa de ozono la cual filtra la mayoría de la radiación detrimental menor de 280 nm, pero su coeficiente de absorción

disminuye a longitudes de onda mayores a 280 nm y llega a cero a 330 nm. Por lo tanto, los organismos terrestres están expuestos a radiación significativa entre 290 y 315. Sin embargo, debido a la incrementada emisión de químicos halogenados como el clorofluorocarbono a través de fuentes antropogénicas, la probabilidad de ser expuestos a radiación está siendo incrementada. La dosis de UV recibida también es influenciada por factores como hora del día, estación del año, distancia del ecuador (latitud), altitud, nubes, reflexión de superficies y contenido del aire. La exposición de una persona a RUV depende del tiempo de exposición y de filtros utilizados (ropa, bloqueadores solares). Por lo tanto, aunque la RUV es considerada como factor etiológico principal de varios tipos de cáncer de piel, es un factor que puede ser regulado en cierta medida a nivel personal evitando el riesgo de padecer este tipo de cáncer.

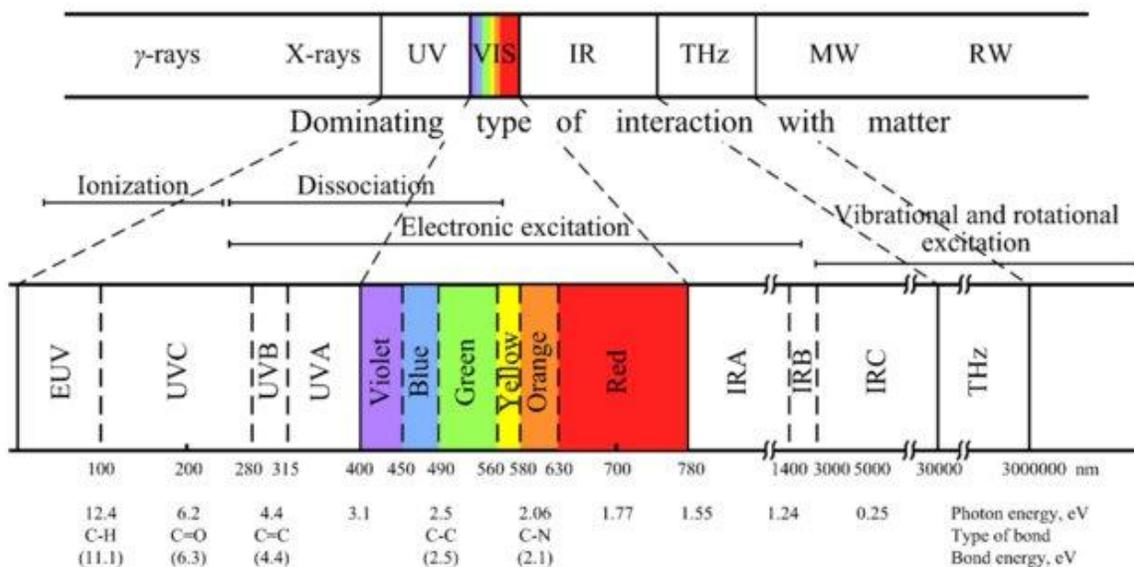


Figura 10. Espectro electromagnético con alargamiento de la región UV. Se muestra la longitud de onda que caracteriza a los diferentes tipos de radiación de la UV. DOI:10.18287/JBPE-2015-1-1-3

4.1 Efecto de la RUV en Biomoléculas

El efecto en las macromoléculas celulares es causado por la capacidad de absorción de la radiación por estas moléculas. En el caso del ADN, es conferida por las bases nitrogenadas,

de purinas (Adenina, A y Guanina, G) y pirimidinas (Citosina, C y Timina, T) que tienen un rango de absorción con picos máximos entre 260 y 265 nm de longitud de onda [62].

Para causar un cambio químico los fotones de UV deben ser absorbidos por las moléculas seguido de la producción de un estado excitado donde un electrón de una molécula alcanza un nivel energético más alto. Estas transiciones son posibles solo si la energía de la radiación es cercana a la diferencia de energía del átomo. Estas reacciones fotoquímicas inmediatamente conducen a la formación de fotoproductos, los cuales están en un estado metastásico o de radical libre. La respuesta biológica originada por estas reacciones fotoquímicas puede durar de microsegundos a horas.

La radiación con UVB también puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) como el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), oxígeno singulete ($^1\text{O}^2$), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$); y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que causan daño a la membrana celular, a la membrana interna mitocondrial por medio de peroxidación de lípidos. Las ROS generadas por UV también generan rompimiento de cadenas de ADN (SSB, *single strand break*), oxidación de purinas como la 8-hidroxi guanina y modificación de los sitios de unión de factores de transcripción [63, 64].

4.2 Ácidos Desoxirribonucleicos

Los blancos más importantes de UVB incluyen el ADN, y la irradiación con UVB y UVC resulta en la formación de fotoproductos. Los fotoproductos más comunes originados por UV incluyen a dímeros de ciclobutano (CPDs, *Cyclobutane Pyrimidine Dymers*) y dímeros (6,4) pirimidina-pirimidona (6,4-PP). La formación de CPDs es originada por de 313 nm entre C-C o T-T mientras que los 6,4-PP son inducidos entre 5'-C y pirimidinas adyacentes. La UVB puede causar también rupturas de la doble cadena de ADN a través de la ruptura de enlaces covalentes entre pirimidinas, conduciendo al bloqueo de la transcripción y replicación [64]. Se ha reportado que la proporción de CPD y 6,4-PP varía con la exposición a UV, dosis bajas produce una proporción 9:1 y dosis altas una proporción 6:4. Sin embargo, los fotoproductos formados pueden ser reparados por el sistema de reparación celular reparación de nucleótidos por escisión, NER (*Nucleotide Excision Repair*) que reconoce y repara aductos de ADN. Se ha reportado que este sistema repara con una eficiencia 10.7 veces mayor a dímeros 6,4-PP que a dímeros CPD. Otra forma de reparación es a través del sistema de reparación de apareamiento incorrecto (MMR,

Missmath Repair). A la fecha otros mecanismos de reparación han sido involucrados con la reparación del ADN como el sistema de fotoliasa en plantas, remodelación de cromatina y acetilación de ADN.

4.3 Ácidos Ribonucleicos (ARN)

La susceptibilidad de modificación del ARN por la UV no ha sido explorada ampliamente. EL ARN expuesto a UV experimenta modificaciones, sin embargo, debido a la alta capacidad de síntesis del ARN su efecto no es crítico. El ARN de transferencia bacteriano con el nucleósido de tiouridina, es susceptible a UV con significancia ecológica [64].

4.4 Proteínas

Gran cantidad de cromóforos como flavina, porfirina, vitaminas y compuestos aromáticos en las células son significativamente susceptibles a UV. Las proteínas son blancos mayores de la UV debido a los cromóforos de las cadenas laterales de aminoácidos como triptófano, T; tirosina, Y e histidina, H. Los cromóforos entran en un estado excitado de singulete al absorber UVB y rápidamente entran a un estado de triplete que puede regresar a su estado de energético basal o puede reaccionar con otras especies como el ADN, causando daño a la proteína y al ADN [62].

4.5 UV y Cáncer

La radiación UVB y RUVa han sido clasificadas como carcinógenos de clase I por la IARC. La inducción de mutagénesis por UVB es atribuida a lesiones pre-mutagénicas de ADN como CPD y 6,4-PP. Las lesiones de UVB no reparadas resultan en mutaciones de transición CC-TT en secuencias de dipirimidinas, lo cual es considerado como marcas de UV en cáncer de piel. La UVA no es directamente absorbida por el ADN, y requiere de fotosensibilizadores endógenos para llevar a cabo el daño al ADN. La UVB induce de esta forma la formación de 8-oxo-deoxiguanina (8-oxo-dG) en una proporción doble a la formación de SSB. La formación de rupturas de doble cadena (DSB, *Double Strand Break*) se encuentra bajo discusión, la formación de DSB es mayormente aceptada por medio de replicación [65]. La formación aductos de ADN como 8-oxo-dG, mutaciones inducidas por

CPD y 6,4-PP, SSB y DSBs son lesiones de ADN significativamente consideradas como inductores de diferentes tipos de cáncer.

Se ha sugerido que la exposición a radiación UV puede ser un factor que se correlaciona con la incidencia de CC a diferencia de la relación observada con otros tipos de cánceres invasivos como de cerebro/sistema nervioso central, pecho y colo/rectal [16-23]. Adicionalmente, se ha observado que las proteínas E6 y E7 de VPH pueden impedir la reparación disparada por daño a ADN (RDD) inducido por radiación UV [24-26]. Por otro lado, interesantemente, un estudio reportó que la radiación UVC y no así la radiación gamma conduce a células de teratoma a muerte celular a las 2 horas después de la exposición la radiación, sugiriendo a la UV como método alternativo para el tratamiento de enfermedades malignas [27]. Sin embargo, aún se desconoce la influencia que pueda tener el contenido de diferentes tipos de VPH sobre la inducción de CC en presencia de UV y el que puede tener la radiación UV sobre células malignas de CC con diferente contenido viral).

4.6 UV y Apoptosis

La apoptosis, ha sido reconocida como un mecanismo complejo en el cual varias vías de señalización están involucradas [63] (Figura 11). La respuesta al daño severo a ADN (RDD) por diversos tipos de estrés entre ellos la radiación UV, es la principal vía de inducción a apoptosis e involucra la activación de la proteína p53 [66]. Rossette y Karin (1996) [67]demostraron que la UVB es capaz de activar directamente los receptores de membrana de muerte celular CD95/Fas induciendo agrupamiento de los receptores “Clustering” [68]. Adicionalmente, ROS, también contribuyen a la inducción de apoptosis vía inducción de liberación mitocondrial de citocromo C por una vía esencial e independiente [63].

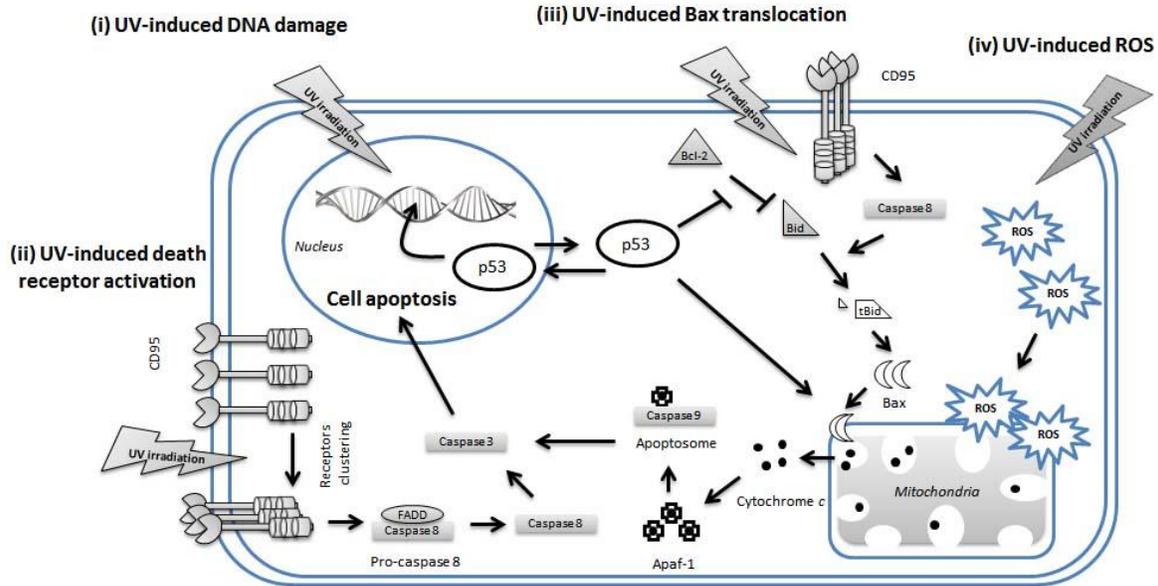


Figura.11 Fototerapia basada en UV. Se muestra los mecanismos moleculares inducidos por UV. La UV daña el DNA e induce la expresión de Bax, generación de ROS y activación de los receptores de muerte induciendo apoptosis. Adaptada de Chih-Hung Lee y cols., 2013 [69].

4.7 Tratamientos Basados en UV

Aun cuando la sobreexposición a la luz solar es bien establecida como un inductor de cáncer de piel, beneficios importantes también han sido documentados. La UVB, es un contribuidor primario de la producción de vitamina D, produciendo un efecto protector en colon, próstata, y cáncer de mama. La exposición en pequeñas dosis, también ha sido ligado en incrementar el pronóstico de vida en cáncer. Debido a su efecto dañino en el ADN, como la formación de rupturas de DNA de una sola hebra, la UV ha sido exitosamente utilizada en el tratamiento de afecciones de la piel como la infección con *rickettsia*, psoriasis, lupus vulgaris, vitíligo, dermatitis atópica, escleroderma localizada e ictericia [70]. También ha sido utilizada en el tratamiento de algunos tipos de cánceres basados en la muerte celular inducida como respuesta al daño a ADN y activación de proteínas de la membrana celular.

5. MICROTÚBULOS

El citoesqueleto es un sistema que otorga orden a la estructura celular, permitiendo la realización de diversos procesos como la división celular, el transporte de sustancias, la locomoción, transporte de organelos, entre otros. Dentro de la gran variedad y complejidad de funciones que realiza el citoesqueleto participan tres componentes proteicos: filamentos intermedios, filamentos de actina y microtúbulos [71]. Los microtúbulos (MT) son elementos esenciales del citoesqueleto que dan forma a la célula, intervienen en el transporte intracelular, el movimiento celular y la segregación de los cromosomas [72]. Los MT poseen una estructura cilíndrica hueca conformados por polímeros formados por 13 protofilamentos constituidos por moléculas de tubulina que se extienden a través del citoplasma. Cada protofilamento está compuesto por un heterodímero de dos subunidades globulares fuertemente unidas entre sí llamadas α -Tubulina y β -Tubulina. Los MT tienen un extremo positivo en el que el crecimiento y a la disociación de subunidades es más rápido por lo que es más dinámico y un extremo negativo de polimerización lenta el cual se encuentra unido al centrosoma que es el centro organizador de microtúbulos (MTOC, *Microtubule Organizing Centre*), Figura 12, dándole una polaridad. Cabe señalar que la mayoría de las células animales solo poseen un solo MTOC, que es replicado junto con el material genético durante la interfase. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la nucleación se realiza en sitios independientes al centrosoma o de manera esporádica en el citoplasma [73-75].

El centrosoma mide cerca de 1 μ m de diámetro y está compuesto por un par de centriolos rodeados por material pericentriolar. La matriz del centrosoma está formada por diversas proteínas específicas como γ -Tubulina que forma parte del complejo llamado anillo de γ -tubulina que interactúa con el dímero α y β -Tubulina colaborando con la nucleación de los microtúbulos [76]. En el ápice sub-distal del centriolo se encuentra ϵ -tubulina, su localización es asimétrica en centrosomas antiguos y nuevos, lo que sugiere que se requiere para duplicar el centriolo y la organización del material pericentriolar [77, 78].

[79]. Por otro lado se ha descrito que δ -tubulina participa en la separación de los centriolos [77]. La participación de las tubulinas es necesaria para llevar a cabo la duplicación de los centriolos y a su vez dan origen a los dos centrosomas que participan en la nucleación de los microtúbulos para formar el huso mitótico para la separación cromosómica. La

formación del huso mitótico permite que los cromosomas que fueron duplicados se alineen formando la placa metafásica y a su vez separarlos mediante el acortamiento de los microtúbulos permitiendo el desplazamiento hacia los polos celulares para dar origen a dos células [80, 81]

5.1 Tubulinas

5.1.1 α -Tubulina

En humanos los MT están compuestos por 8 isotipos (α -tubulina 1a, α -tubulina 1b, α -tubulina 1c, α -tubulina 3c, α -tubulina 3d, α -tubulina 4a, α -tubulina 3c, α -tubulina 8) [82]. Los diferentes isotipos de tubulinas están codificados por diferentes genes en diferentes cromosomas y poseen especificidad de tejido y distribución en el desarrollo [83, 84]. Los isotipos de tubulinas comparten un alto grado de homología estructural, aunque se distinguen unas de otras por sus secuencias altamente divergentes en su carboxilo terminal [85]. Los dominios intermedios y el N-terminal de las proteínas forman el cuerpo globular altamente conservado que se apila para formar los filamentos mientras que el C-terminal que comprende entre 18 a 24 aminoácidos es altamente desordenado. Esta C-terminal contienen sitios para modificaciones post-traduccionales que median la interacción con una variedad muy grande de proteínas que colectivamente le dan una funcionalidad única a los isotipos de tubulina [86].

5.1.2 β -Tubulina

Los isotipos de β -tubulina son 7 (β -tubulina I, β -tubulina II, β -tubulina III, β -tubulina IVa, β -tubulina IVb, β -tubulina VI, β -tubulina V) [87] y se ha observado que β -tubulin II está implicada en desarrollo de varios carcinomas como los epiteliales, de cerebro, colon y próstata [88]. La localización nuclear de la β -tubulin II se ha encontrado en células tumorales [89] mientras que en el citoplasma interactúa con el canal de anión dependiente de voltaje (VDAC), esta interacción juega un papel central bioenergético en las células musculares. Por otro lado, la interacción β -tubulina III con VDAC es considerada el principal componente del sinaptosoma en el cerebro[90].

La sobreexpresión de β -tubulina III ha sido reportada en varios tumores como el de intestino delgado, cáncer gástrico y gliomas posicionándola como posibles biomarcadores [91]. Un incremento en el dinamismo de MT ha sido encontrado en células que expresan β -tubulina III y está relacionado con la resistencia a medicamentos anti-MT [92].

5.1.3 ϵ -Tubulina

La localización de ϵ -tubulina en el centrosoma es independiente de los MT y el patrón de localización es distinto entre las tubulinas que se localizan en el centrosoma. Hasta el momento sólo ha encontrado una isoforma. ϵ -tubulina muestra un patrón de localización específico en el ciclo celular, primero se asocia con los centrosomas antiguos en un par de duplicado nuevo y después su asociación con los dos centrosomas. Lo que sugiere que ϵ -tubulina puede distinguir entre el centrosoma viejo del nuevo a nivel del material perinuclear indicando que puede participar en la maduración del centrosoma mediante su reclutamiento [93].

5.1.4 δ -Tubulina

δ -tubulina es una proteína que pesa aproximadamente 51 KDa de peso molecular y fue reportada por primera vez en *Chlamydomonas*. Se ha demostrado δ -tubulina se encuentra en los centriolos y participa en la nucleación de los MT, siendo parte de su centro organizador y posiblemente participa en la separación centriolar [77, 78, 93].

5.1.5 γ -Tubulina

γ -tubulina fue reportada por primera vez en humanos por Zheng et al en 1991 [94], actualmente se sabe que se expresa en todos los organismos eucariotas y que presenta una similitud en secuencia de 28-35% a las α y β -tubulina. Esta tubulina particularmente sobresale por ser esencial para la realización de la mitosis y para la organización de los MT. Además de esta función se observó que participa en diferentes procesos tumorales. Se ha reportado que coimmunoprecipita con la proteína BRCA1 (proteína supresora de tumores en cáncer de ovario y pecho) [95, 96] lo que sugiere que está involucrada en tumorigénesis. γ -tubulina es necesaria para la nucleación de los MT ya que interactúa

directamente con la subunidad alfa del dímero de tubulinas de acuerdo al modelo templado de nucleación (Figura 12), formando un anillo junto con otras proteínas accesorias denominado complejo “Y-turc” (Figura 13), [97] localizado en el extremo negativo de los MT justo en el centro o núcleo del material pericentriolar, que servirá de andamio o base para la formación de los MT [98]. Varios estudios muestran que Y-tubulina interactúa con otras proteínas denominadas proteínas del complejo gama (GCPs) (Figura 13) colaborando en la formación de los MT [99], Estas GCPs en conjunto con Y-tubulina se han reportado que están desreguladas en procesos tumorales contribuyendo posiblemente con la progresión de la tumorigénesis [100, 101]. La formación y estabilización de los MT está estrechamente regulada por las Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs) brindando complejidad adicional a los procesos celulares y moleculares en los que participan los MT.

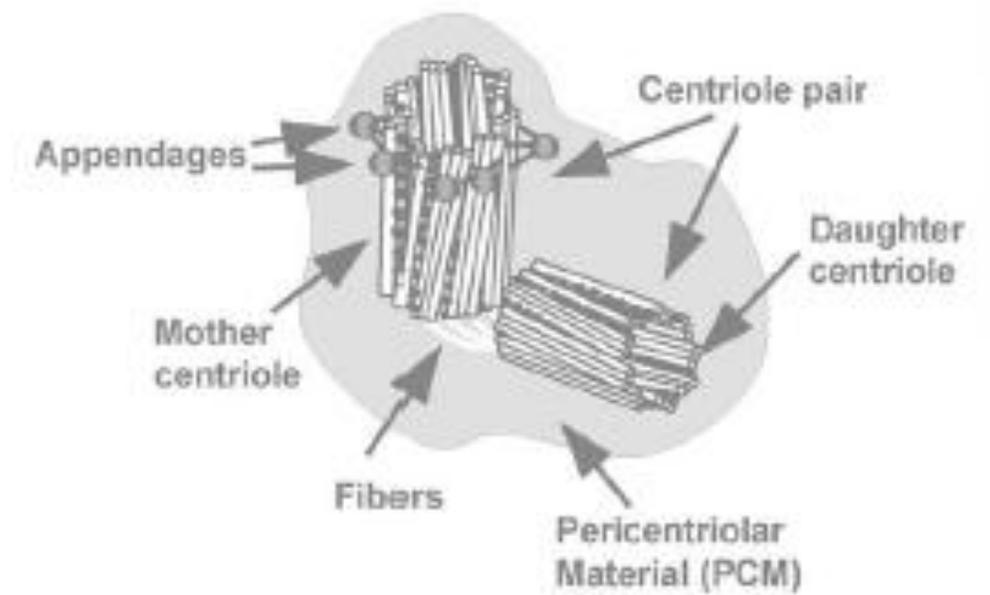


Figura 12. Conformación del centrosoma ó MTOC. El MTOC está formado por el material pericentriolar un par de centriolos; uno viejo y el otro nuevo, fibras proteínas accesorias (Tomado de Fukusawa K, 2004).

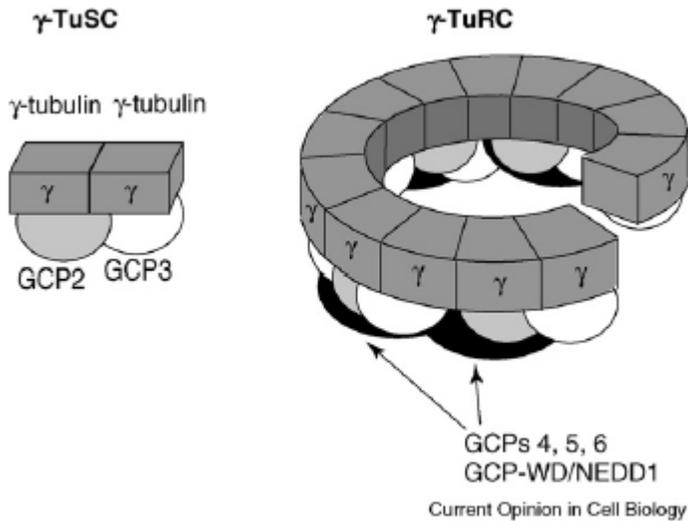


Figura 13. Conformación del Complejo Y-Turc. El complejo Y-Turc está formado por un heterodímero de Y-tubulina unido a GCP2 y Y-tubulina unido a GCP3 los cuales a su vez se unen a proteínas accesorias como GCP4, 5, 6 y GCP-WD entre otras, Tomada de Messina-Raynaud B and Merdes Andreas, 2007.

5.2 Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs)

Las MAPs son proteínas que se co-ensamblan con los MT estabilizándolos. Las MAPs se distinguen por 4 características: 1) en el C-terminal presentan una alta homología entre las distintas isoformas y tienen tres o cuatro zonas con repeticiones alrededor de 31 aminoácidos que son fosforiladas por diversas cinasas como PKA, 2) las isoformas son generadas por splicing alternativo, 3) las MAPs se pueden encontrar en distintos estados de fosforilación y 4) la expresión de las isoformas es regulada por el estado de desarrollo del organismo.

Las MAPs participan en los motores de MT, como proteínas asociadas al centrómero y/o como proteínas asociadas a MT estructurales. Las MAPs clásicas son MAP1A, MAP1B, MAP2A, MAP2B, MAP2C, MAP2D, TAU y MAP4. MAP1A y MAP1B forman una familia separada y la otra está conformada por MAP4 que suele encontrarse expresada ubicuamente.

Las proteínas asociadas a microtúbulos suelen tener varias longitudes que varían de 50 a 185 nm, tienen un dominio de proyección que se extiende como una estructura filamentosa que puede variar de tamaño dependiendo del corte y empalme de la proteína [102].

5.2.1 Proteína Asociada a Microtúbulos 2 (MAP2)

MAP2 posee la habilidad de estabilizar los MT mediante su interacción en la periferia [102, 103]. MAP2 tiene un papel en la migración y crecimiento de neuritas al parecer por la interacción entre MAP2 y PKA [102]. La unión a MT es regulada por la fosforilación del motivo KXGS en cada repetición de unión a MT que se encuentra en el extremo carboxilo terminal por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico II (PKAII), la cinasa con afinidad reguladora de MAP/microtúbulos I, II y IV (MARKI, MARKII y MARK IV) y las cinasas de N-terminal c-Jun (JNK), lo cual lleva a una disminución en la afinidad a los MT e interacción con actina [104].

La familia de MAP2 consta de MAP2A, MA2B, MA2C y MAP2D (Figura 14), MAP2a y MAP2B fueron identificadas como proteínas filamentosas de aproximadamente 280 y 270kDa en electroforesis SDS-PAGE y son estables al calor. MAP2A consta de 1911 residuos de aminoácidos y MAP2B de 1828, la variante generada por corte y empalme MAP2C es de bajo peso molecular (70kDa) y consta de 467 residuos de aminoácidos [102].

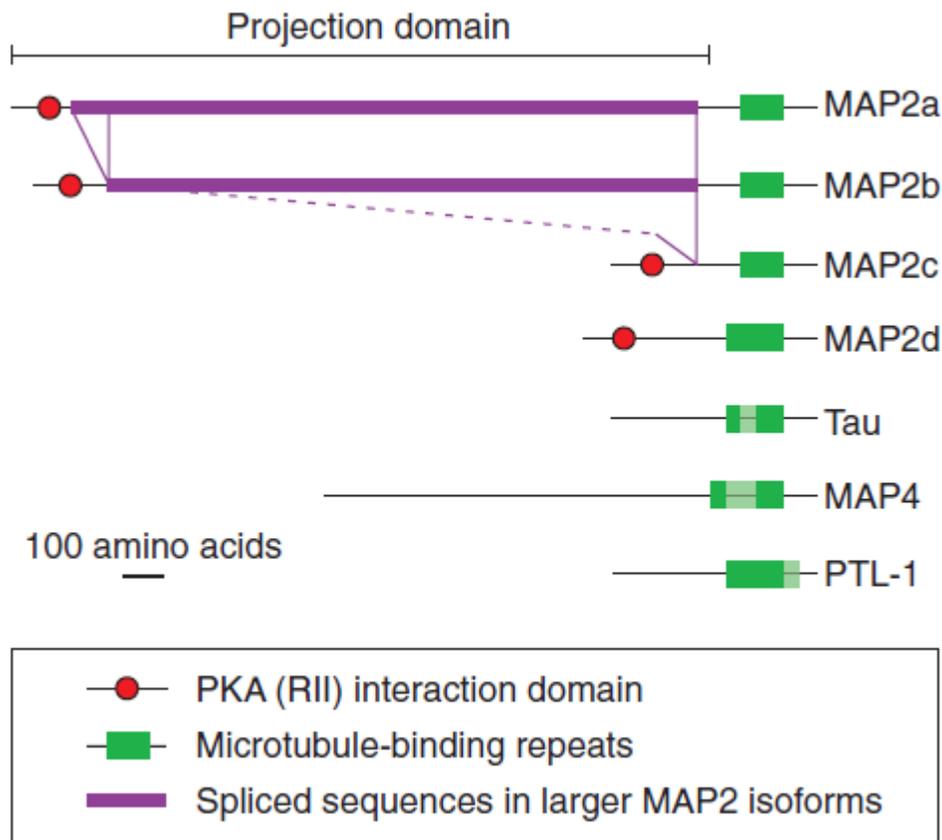


Figura 14. Comparación estructural de las isoformas de MAP2 (Dehemelt and Halpain, 2004). En rojo se muestran los dominios de interacción con PKA, en verde los repetidos de unión a los MT y en morado las secuencias espaciadoras de splicing in las isoformas de mayor peso molecular.

MAP2 es expresado principalmente en neuronas, pero también se ha detectado en células no neuronales, por ejemplo se detectó la presencia de MAP2 principalmente MAP2 de bajo peso molecular a nivel RNA mensajero (mRNA) en células somáticas y germinales en testículo de rata ubicada en el núcleo contrario al citoplasma en neuronas [105].

MAP2 está sobreexpresada en melanoma cutáneo [34], tumor carcinoide pulmonar y en carcinoma de células pequeñas [106] y está correlacionada con la invasión y motilidad celular en células tumorales epiteliales y orales[35].

5.2.2 Proteína Asociada a Microtúbulos 1S (MAP1S)

MAP1S es un Proteína Asociada a Microtúbulos que ha sido implicada in la dinámica de MT (Figura 15) [107], anormalidades mitóticas, inhibición de proliferación a través del arresto mitótico, muerte celular mitótica e inducción apoptótica vía mitocondria mediante la estabilización de MT y la formación del uso mitótico [108]. La regulación de MAP1S es muy diversa. Se sabe que MAP1S es regulada positivamente por la expresión de las proteínas B-célula CLL/linfoma 2 (Bcl-2), B-célula CLL/x-L(Bcl-xL) y al inhibidor 1B cinasa dependente de ciclina (P27), distribución de la mitocondria y varias respuestas in estrés nutricional. Adicionalmente, las isoformas de MAP1S interactúan con la cadena ligera asociada al autofagosoma 3 de MAP1A/B (LC3) reclutando MT en una forma dependiente de LC3 y MAP1. Además, MAP1S interactúa con la proteína que contiene un motivo PPR rico en leucina asociada a mitocondria (LRPPRC) que a su vez interactúa con el iniciador de mitofagia y con la proteína relacionada a la enfermedad con Parkinson, Parkin [109]. La inducción de autofagia está siendo explorada para inhibir la progresión del cáncer de mama a través de la activación de MAP1S [110]. La autofagia ejecuta un rápida degradación de proteínas y organelos no necesarias a través de la vía lisosomal y es crucial en los procesos catabólicos ampliamente conservados entre eucariontes por lo tanto MAP1S se ha convertido en uno de los blancos moleculares en cáncer de colon [111] y cáncer de mama [110]. Funciones esenciales de los MT y las MAPs incluyen segregación cromosomal y posicionamiento en el núcleo durante la mitosis. Defectos en estas funciones pueden inhibir la proliferación celular e inducir muerte celular.

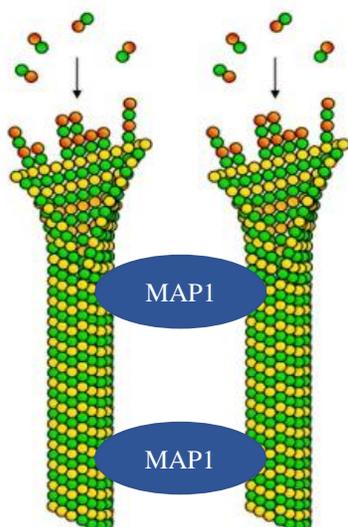


Figura 15. Estabilización de MT por MAP1S. La polimerización y/o rescate y la despolimerización y/o catástrofe de MT es regulada por MAP1S dándole rigidez y estabilidad a los MT.

6. PROTEÍNAS QUE REGULAN EL CICLO CELULAR

6.1 P53

P53 es una proteína multifactorial que regula ciclo celular, diferenciación, inflamación, respuesta inmune, metabolismo, procesos inducidos por hormonas, transcripción, reparación de ADN, epigenoma, senescencia, autofagia e induce apoptosis. p53 es un potente factor transcripcional y la transcripción dependiente de p53 es regulada por muchos cofactores [112]. p53 se activa para inducir la transcripción de una gran variedad de genes en respuesta a diferentes tipos de estímulos como UV. De hecho, se le conoce como uno de los genes que responden a la radiación UV. Uno de sus principales funciones radica en la regulación del ciclo celular en dos puntos de control principalmente, Figura 16. El primer punto de control está en la transición de la fase G1 a S. La activación de p53 induce la transcripción de p21 que inhibe el complejo Ciclina D-Cdk4/6 inhibiendo la progresión del ciclo celular. El segundo punto de control se encuentra en la transición de la fase G2 a la M (Figura 16). En respuesta a daño al DNA las vías dependientes o independientes de p53 convergen para inhibir el complejo Ciclina B-Cdc2 inhibiendo la progresión del ciclo celular inhabilitando la mitosis. La activación de p53 reprime transcripcionalmente a Cdc25 y Ciclina B, además induce la sobreexpresión de p21 que inhibe el complejo CiclinaB-cdk1. También promueve la transcripción de GADD45 que a su vez inhibe el complejo Ciclina B-Cdk1 [11, 113]. Los inductores de p53 pueden ser UV y radiación γ en donde la primera ha mostrado una inducción más potente [27, 114, 115]. Se ha demostrado que la radiación UV induce apoptosis en una variedad de diferentes tipos celulares [116, 117] independiente o dependientemente de p53 [118] por lo tanto p53 puede mediar algunos efectos apoptóticos vía la irradiación con UV.

Las proteínas supresoras de tumores p53 y pRb, son reguladas por las oncoproteínas VPH E6 y E7, respectivamente [119]. La proteína E7 se une a la forma hipofosforilada de Rb desensamblando el complejo Rb-E2F-1 resultando en la liberación de E2F1 permitiendo la

transcripción genes necesarios para promover la entrada de la fase G1 a la fase S [120]. Se ha demostrado que la inducción con UVB inhibe la proliferación, ciclo celular e induce la apoptosis en parte por la expresión de p53 que a su vez induce a p21, GADD45 y Bax [121], sin embargo, el efecto independiente de p53 vía UVB no se debe descartar [117].

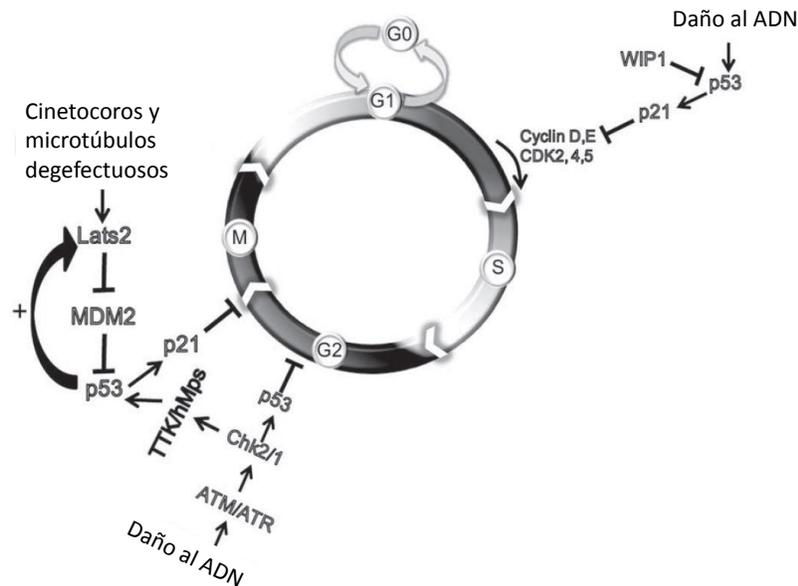


Figura 16. Regulación de ciclo celular mediada por p53 Modificado Borrás et al 2011.

6.2 E2F1

La familia de factores transcripcionales E2F son clave para la regulación de genes involucrados en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S, determinación de destino celular, reparación por daño al ADN y apoptosis [122]. Ocho genes *E2F* han sido identificados en mamíferos los cuales codifican proteínas clasificadas como activadores (E2F1-3) o represores transcripcionales (E2F4-8) [123]. Las funciones de E2F relacionados con proliferación en el cáncer se han encontrado en diferentes carcinomas [124].

E2F1 ejerce efecto en muchos tipos de carcinomas como regulador de una gran cantidad de genes desencadenando diversos procesos de transcripción aberrantes que pueden determinar la procesividad de la malignidad [125].

E2F1 está compuesto por 437 aminoácidos y su máximo nivel de expresión es observado en la fase G1/S tardía del ciclo celular en la que induce la transcripción de los genes

necesarios para la síntesis de ADN. La función de E2F1 es regulada por la proteína retinoblastoma (pRb). Rb hipofosforilada se une a E2F1 a través de su dominio de bolsillo e inhibe la interacción con E2F1 a las secuencias de ADN específicas reprimiendo la transcripción. Tras la fosforilación de pRb por CDKs, E2F1 es liberado del complejo inhibidor Rb/E2F1 y se une a su compañero de dimerización (DP) DP1 o DP2. El Heterodímero E2F1/DP1 se une a la secuencia consenso TTTSSCGCS (donde S= G o C) dentro de los promotores de genes blanco e induce la transcripción. Los blancos transcripcionales de E2F1 incluyen proteínas del ciclo celular como CDC2, CDC25A, Ciclina D1 y Ciclina E y las proteínas requeridas para la replicación del ADN (DHFR, ADN polimerasa α) y/o reparación del ADN (RCF3 y Rad52) [126].

La expresión aberrante de E2F1 ha sido detectada en varias líneas de cáncer y en tejidos clínicos, incluyendo amplificaciones del gen E2F1 en líneas celulares de eritroleucemia. La expresión elevada de la proteína E2F1 en líneas celulares de cáncer de mama, cabeza y cuello, y cérvico-uterino entre otros y se le ha asociado con afecciones avanzadas y pobre prognosis [127, 128]. Se ha observado que E2F1 está involucrado en la respuesta a la radiación UVB [129] induciendo a las células quiescentes a que entren a la fase S del ciclo celular e iniciar su proliferación [130, 131]. Cabe resaltar que E2F-1 responde tiempos cortos de exposición de UVB [132] lo que contrasta con nuestro estudio.

CAPÍTULO 2

1. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país las muertes causadas por cáncer cervical (CC) ocupan el segundo lugar en frecuencia entre las enfermedades malignas (Secretaría de Salud, 2014) que afectan a la población femenina, principalmente en etapas reproductivas. Recientemente, se estableció el programa preventivo basado en la vacunación de mujeres de entre 9 y 11 años de edad. Sin embargo, la efectividad de esta vacuna que protege solo contra los virus de alto riesgo, VPH-16 y VPH-18, y los de bajo riesgo, VPH-6 y VPH-11 se podrá ver reflejada en la siguiente generación. Los problemas socioeconómicos, las costumbres y tradiciones de un alto porcentaje de la población mexicana influyen directamente en la incidencia y

mortalidad del CC debido a la falta de protección y a la baja proporción de mujeres que acuden a realizarse el examen citológico que identifica lesiones pre-malignas y malignas de cérvix [2]. Otro problema de vital importancia al que se enfrenta la población femenina es que aproximadamente el 50% de las mujeres que recibe el tratamiento convencional basado en concurrente radio y quimio-terapia no responde al tratamiento o presenta regresión de la enfermedad a los 2 o 5 años después de la terapia [4]. Adicionalmente, el tratamiento convencional es limitado debido a la serie de efectos adversos generados que en muchas ocasiones no sólo causa un gran malestar en las pacientes, sino que también conduce a un peor pronóstico de la enfermedad [133]. Por lo tanto, el CC es un problema de salud que afecta de manera alarmante a la población femenina de México y otros países en desarrollo y la generación de alternativas de prevención, detección y tratamiento es imperativa.

En el presente trabajo es de nuestro interés identificar la respuesta que se genera a la UVB. Recientemente, se ha sugerido que la radiación UV puede ser factor que influye directamente en la tasa de incidencia por CC. Por otro lado, un estudio mostró que la radiación UV y no la radiación ionizante, induce rápidamente a apoptosis de células cancerosas de teratoma. Por lo tanto, con el fin de conocer la capacidad de la UVB de eliminar células derivadas de cérvix con diferente estatus de infección viral es de gran relevancia tomando también en cuenta el menor riesgo de daño a tejidos adyacentes que conlleva el uso de este tipo de radiación. El estudio de los procesos alterados en cáncer como la proliferación celular, apoptosis, detención del ciclo celular así como la expresión de proteínas con funciones vitales en el proceso carcinogénico como son p53, E2F, MAP1s, MAP-2 y α -, β - y γ -tubulinas, es una herramienta muy útil para conocer la respuesta inducida en células de cérvix expuestas a distintas dosis agudas UVB.

2. HIPÓTESIS

La irradiación con UVB en líneas celulares tumorigénicas C-33A, CaLo y SiHa y en la línea celular inmortal HaCaT alterará los procesos celulares de proliferación, ciclo celular y apoptosis. Adicionalmente, la expresión de las proteínas p53, E2F, MAP1s, MAP-2 y α 3C-, β - y γ -Tubulina jugarán un papel en la regulación de los procesos celulares de cáncer en respuesta a UVB.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la radiación UVB en las líneas celulares tumorigénicas de cérvix C-33A, CaLo y SiHa e inmortal de queratinocitos HaCaT.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la UVB en los procesos celulares de proliferación, ciclo celular y apoptosis en líneas celulares tumorigénicas de cérvix C33-A, CaLo y SiHa e inmortal de queratinocitos HaCaT.

2. Evaluar la expresión de las proteínas p53, E2F, MAP1s, MAP-2, α 3C-, β - y γ -Tubulinas en respuesta a UVB en células SiHa.

CAPÍTULO 3

1. METODOLOGÍA

1.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares SiHa (tumorigénica, HPV-16 positiva de carcinoma escamoso cervical), CaLo (Tumorigénica, HPV-18 positiva, de carcinoma escamoso de cérvix), C-33A (Tumorigénica, HPV- de carcinoma escamoso de cérvix) y HaCaT (Inmortal, HPV-, de queratinocitos) fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) enriquecido con suero fetal bovino al 5% (SFB), a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%. El cambio y pasaje de medio se realizó cada 3 y 4 días, respectivamente. Las líneas celulares fueron amablemente donadas por el Laboratorio del Dr. Gariglio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN).

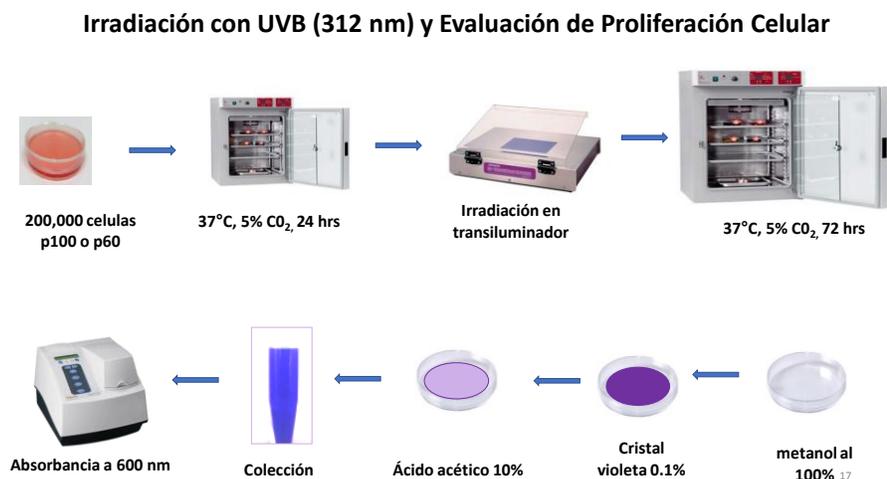
1.2 Irradiación de Células con Luz UVB

Las células HaCaT, C33-A, SiHa, y Calo fueron cuantificadas con el uso de una cámara de Neubauer y microscopio invertido. Posteriormente fueron cultivadas a 2×10^5 células por caja p60 (60 mm de diámetro por 15 mm de alto) o p100 (100 mm de diámetro por 15 mm de alto) en una campana de bioseguridad (Thermofisher Scientific). A las 24 horas las células fueron irradiadas con luz UVB (312 nm de longitud de onda) a diferentes tiempos con protección de lucita. A las 72 horas de incubación en presencia de CO₂ al 5% las células fueron procesadas para realizar los diferentes ensayos para evaluar los procesos celulares cancerígenos o la detección de proteínas o genes específicos. La IR con UVB se realizó con una lámpara de fototerapia (UV Radiation Treatment System 0.0004) de emisión de radiación UVB (311 nm) a una distancia de 8 cm de la muestra o por medio de un transiluminador (spectroline ultraviolet transilluminator) de emisión de UVB de 312 nm a 5mm de distancia de las células. Durante la estandarización de la IR de las células se utilizaron diferentes instrumentos, distancias y energías de IR que se mencionan en los resultados de los ensayos preliminares.

1.2 Ensayo de Proliferación Celular

Las células son cultivadas a 2×10^5 células por caja o p60 o a 4×10^5 por caja petri p100 y se incubaron por 24 horas y posteriormente fueron irradiadas con UVB a diferentes dosis. El efecto se midió a diferentes tiempos post- radiación (0, 24, 48, 72 y 96 hrs) o como se especifique. Para determinar la proliferación celular las células se cosechan con tripsina y son resuspendidas en solución de buffer de fosfatos (PBS 1X) y son cuantificadas con el uso de un hemacitómetro (cámara de Neubauer) y se determina la cantidad de células por ml. Alternativamente la proliferación se midió por medio de la incorporación de cristal violeta al 0.1%, para lo cual las células son lavadas con buffer de fosfatos 1X (PBS), fijadas con metanol al 100% por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se tiñen con cristal violeta por 15 minutos en agitación suave (20 rpm). Seguidamente, la tinción no incorporada es liberada con ácido acético al 10% y posteriormente se analiza en un lector de microplaca (Multiskan GO Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Ratastie, Finland)

a 600 nm. Los resultados se normalizan con el control negativo y se grafican para su posterior análisis estadístico.



1.3 Extracción de Proteínas de Células HaCaT, C-33A, SiHa y CaLo

Las células fueron cultivadas 2X10⁵ células por caja p60 o 4X10⁵ células por caja para p100 y fueron irradiadas con diferentes dosis de UVB. Posteriormente fueron cosechadas con solución de lisis celular RIPA (Radioinmuno Precipitation Assat Buffer) y el extracto proteico fue cuantificado por el método de Bradford y mediante el uso de un lector de placas (Multiscan GO Spectrophotometer de Termo Scientific, Ratasie, Finland a 595 nm.

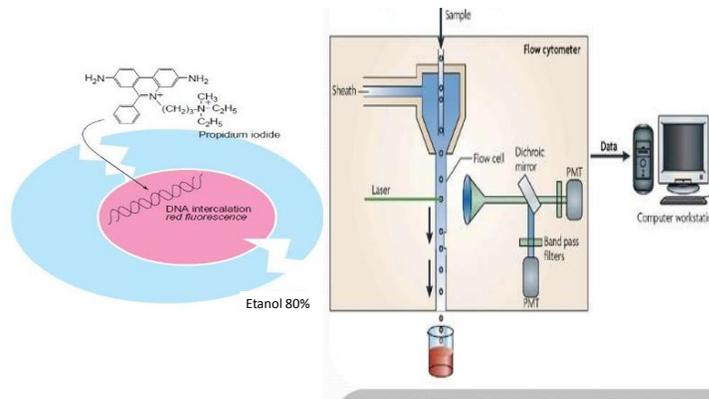
1.4 Detección de Proteínas p53, E2F, Map1s, Map2, α3C-, β- y γ-Tubulinas

Los extractos proteicos fueron utilizados para identificar la expresión de proteínas por medio inmunodetección en fase sólida (Western-Blotting). 50 ug de proteína soluble total fueron desnaturalizados con buffer de carga Laemmli y herbidos por 5 minutos previamente a su electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS al 10%. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-RAD). Las proteínas en la membrana se incuban con el anticuerpo primario para p53 (Sc-126), E2F (sc-251), MAP1S (324102), MAP-2 (sc-20172), α-Tubulina3C (sc-134240), β-Tubulina (sc-5274) o γ-

Tubulinas (17787) y β -Actina (sc-1616) (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA). Posteriormente, se utilizó un secundario marcado con peroxidasa y con el uso del reactivo luminol (Western Blotting Luminol Reagent sc-2048 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los anticuerpos primarios y secundarios fueron utilizados a una dilución de 1:1000 y 1:15,000 respectivamente. La señal fue analizada por medio del software LabImage.

1.5 Evaluación del Ciclo Celular por Citometría de Flujo

Las células cultivadas a 2×10^5 o 4×10^5 células por placa petri (según el tamaño de la caja de petri) y fueron incubadas por 24 horas y posteriormente irradiadas por 0, 5, 10, 15, 20 y 25 segundos de 312 nm de UVB. A las 48 horas después de irradiación las células fueron cosechadas con tripsina al 0.05% por 8 minutos (la tripsina fue neutralizada con medio DMEM al 5% de SFB (Suero Fetal Bovino) y posteriormente centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos. Después de lavar el pellet con 5 ml de PBS 1X, las células empaquetadas fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos. El paquete de células se resuspendió en etanol al 80% a -20°C y se incubaron por 12 horas. Se lavó el pellet con PBS 1X a 2500 rpm por 5 minutos. Se incubaron con 5 ul de solución de RNAasa A a 30 ug/ml (libre de RNAasa) (Thermo Scientific TM) por 10 minutos. Posteriormente, se tiñeron con 50 ul de solución de Ioduro de propidio (IP) (Sigma–Aldrich, St. Louis MO) a 50 ug/ml y se incubó por una hora para posteriormente ser analizadas en el citómetro de flujo (FACS Canto II flow Jo (FlowJo 7.6.2 Software; FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). El análisis de los datos se realizó por medio del programa FlowJo. Se determinaron las fases del ciclo celular con el algoritmo Dean-Jett Fox.



1.6 Ensayo de Apoptosis

Las células se cultivan a una confluencia de 2×10^5 células por caja p60 y se irradian con UVB a las 24 horas. Se incuban a 37°C , en atmósfera de 5% de CO_2 por 72 horas. Posteriormente, se obtiene medio de cultivo y se cosechan las células de la caja con tripsina al 0.05% por 8 minutos (la tripsina será neutralizada con medio DMEM al 5% de SFB (Suero Fetal Bovino) y se unen con el medio de cultivo colectado. Posteriormente se centrifugan a 3500 rpm por 5 minutos. Después de lavar el pellet con 5 ml de PBS 1X, las células empaquetadas se resuspenden en 10 μl de anexina V (Annexin-V-FLUGOS Kit, Roche Diagnostics GmbH, Penznberg Germany) y 10 μl de Ioduro de propidio 50 μM . Finalmente, las muestras fueron leídas en citómetro de flujo (FACS Canto II flow cytometer. Becton Dickinson) en un lapso de no más de 1 hora. Los datos se analizaron con el software Flow Jo (FlowJo 7.6.2 Software; FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

1.7 Análisis Estadístico

La normalización de los datos fue verificada por medio de pruebas D'Angostino-Pearson Tests. Dependiendo de la distribución normal de los datos, se realizó la comparación múltiple por medio de one-way ANOVA o Kruskal-Wallis test. Para la identificación de diferencias significativas, se utilizó el método de Tukey o Dunn post test según

correspondía. La correlación de los análisis se realizó por medio del análisis de correlación de Pearson o Spearman de acuerdo a la distribución de los datos. El nivel de alfa fue establecido <0.05 . Todos los análisis fueron llevados a cabo usando el programa GraphPad Prism Software V.6 (GraphPad, USA).

2. RESULTADOS NOVEDOSOS ESPERADOS

El presente trabajo tiene el objetivo de contribuir con el entendimiento del efecto de la UVB en líneas celulares con distinto contexto de tumorigénesis, infección y tipo viral a nivel de regulación de la expresión de proteínas que regulan procesos cancerígenos y del sistema de microtúbulos así como a nivel de procesos celulares característicos de cáncer que pueden servir para el desarrollo de métodos de terapia, diagnóstico y pronóstico de cáncer cervical.

CAPÍTULO 4

1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

1.1 Proliferación de Células SiHa en Respuesta a la Radiación UVB

El objetivo de este ensayo fue la identificación de la dosis efectiva para inducir un efecto en la proliferación en las diferentes líneas celulares. Se utilizó la línea celular SiHa que posee la característica de tumorigénesis e infección con el VPH tipo 16. Las células SiHa pasaje 340 (p-340) (2×10^5 células/pozo) fueron cultivadas en multi-pozos de 6 y tratadas con UVB (68.8 J/m^2) a una distancia de 8 cm del bulbo de la lámpara a las células y se determinó el número de células/ml a las 2, 4, 8, 24 y 72 horas post-radiación para determinar el tiempo en el cual se obtiene el mayor efecto en respuesta a este estrés. En la figura 17 se muestra que no se observó efecto significativo con la dosis utilizada a los diferentes tiempos analizados.

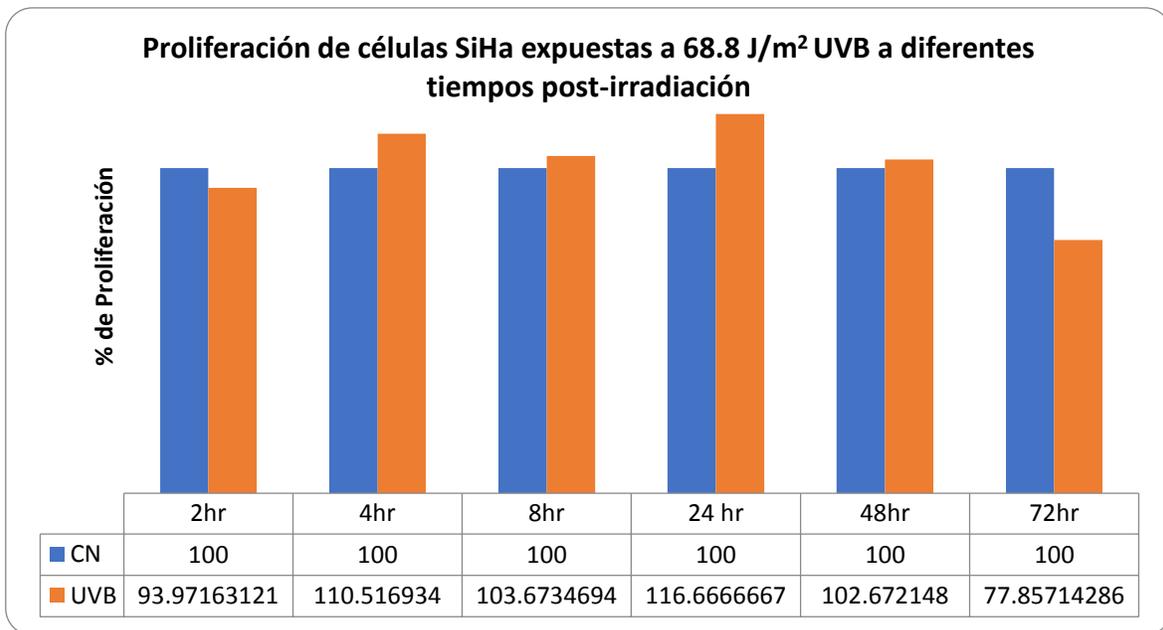


Figura 17. Proliferación de células SiHa a diferentes tiempos post 68.8 J/m² de UVB.

La dosis de 68.8 J/m² fue insuficiente para producir un efecto detectable en proliferación celular. Por lo tanto, las células fueron tratadas con tres dosis de 120.4 J/m² con intervalos de tiempo de 3 horas con la finalidad de determinar si dosis mayores afectan la proliferación de esta línea celular. Como se observa en la figura 18 an con tres dosis consecutivas de UVB la proliferación celular no se encuentra afectada considerablemente.

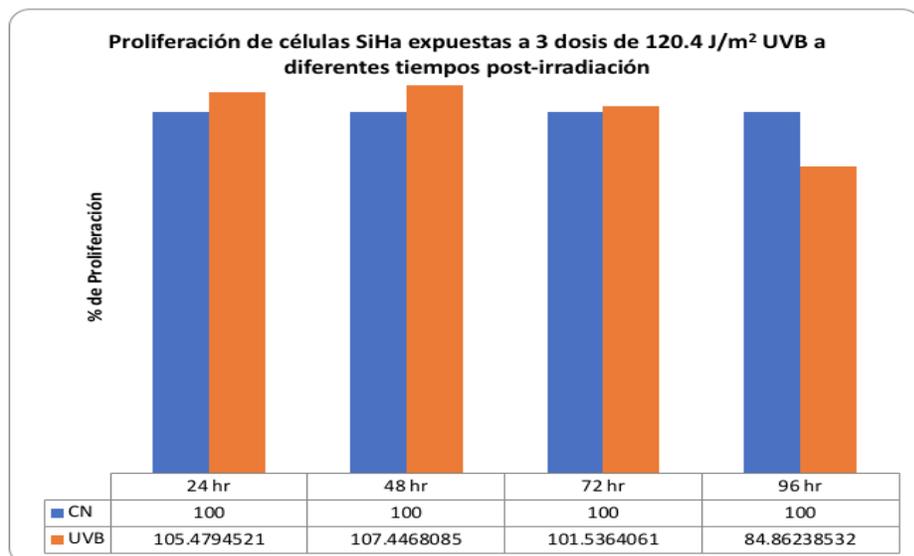


Figura 18. Proliferación de células SiHa expuestas a 3 dosis de 120.4 J/m^2 de UVB en intervalos de 3 horas entre cada IR. En azul se muestran las células no irradiadas analizadas a diferentes tiempos.

Debido a que no se observó un efecto significativo en las células SiHa tratadas con UVB en las dosis anteriores se decidió aumentar la dosis a 172 J/m^2 . Se cultivaron 20,000 células por pozo y a las 24 hrs fueron irradiadas con UVB. Posteriormente se cuantificaron las células y se observó una ligera disminución de aproximadamente 20% en las determinaciones realizadas a los tiempos de 24, 48 y 72 hrs, sin embargo, dicha disminución no es considerada un efecto importante para realizar estudios posteriores (Figura 19).

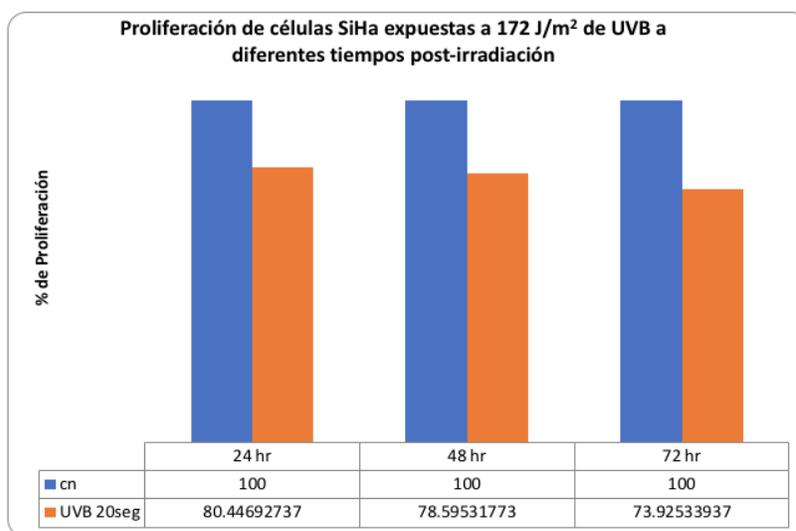


Figura 19. Proliferación de células SiHa expuestas 172 J/m^2 (20 segundos) de UVB. En azul se muestran las células no irradiadas analizadas a diferentes tiempos.

En el siguiente ensayo las células fueron cultivadas en iguales condiciones y fueron expuestas a tres dosis de 172 J/m^2 de UVB cada tres horas y las células fueron cuantificadas a las 24, 48, 72 y 96 horas (figura 20). En este ensayo se mostró que aún con tres dosis consecutivas de UVB la proliferación de las células no es afectada.

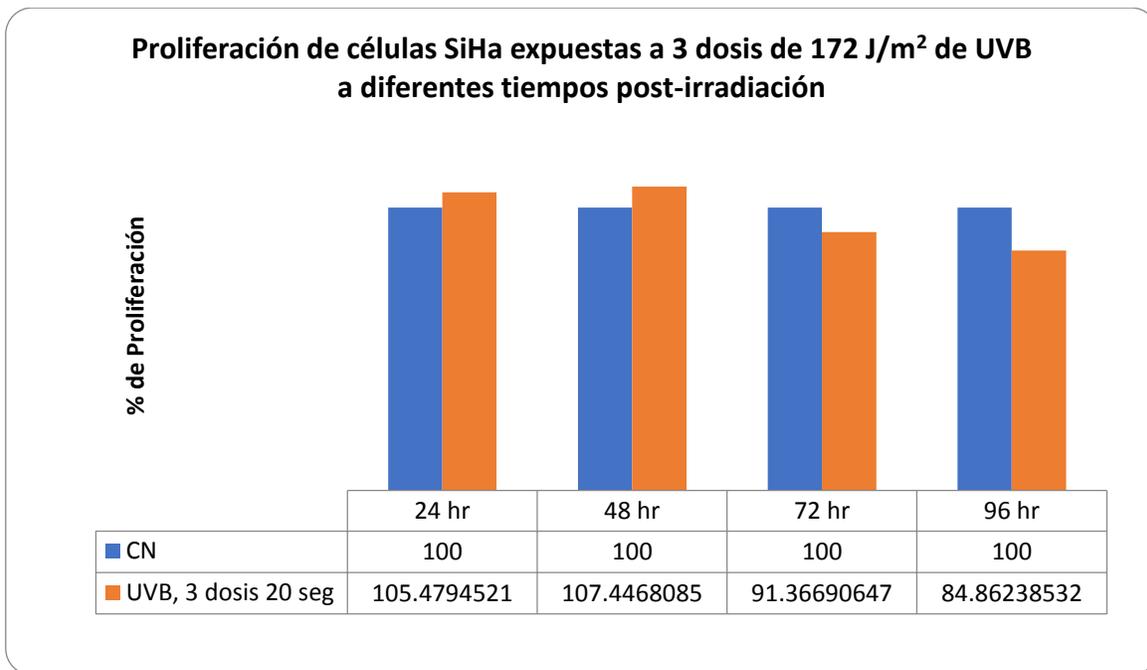


Figura 20. Proliferación de células SiHa expuestas a 3 dosis de 172 J/m² de UVB en intervalos de tres horas entre cada IR. En azul se muestran las células no irradiadas analizadas a diferentes tiempos. En naranja se muestran la proliferación de las células irradiadas y analizadas a diferentes tiempos post-IR.

Para corroborar los resultados anteriores las células SiHa fueron irradiadas a diferentes dosis de UVB por 2 seg (17.2 J/m²), 4 seg (34.4 J/m²), 8 seg (68.8 J/m²), 16 seg (137.6 J/m²) y 32 seg (275.2 J/m²). En la figura 21 se puede observar que aún con dosis de 275 J/m² la proliferación no se ve afectada de manera importante, obteniéndose un 32.93% de aumento de proliferación con respecto al control.

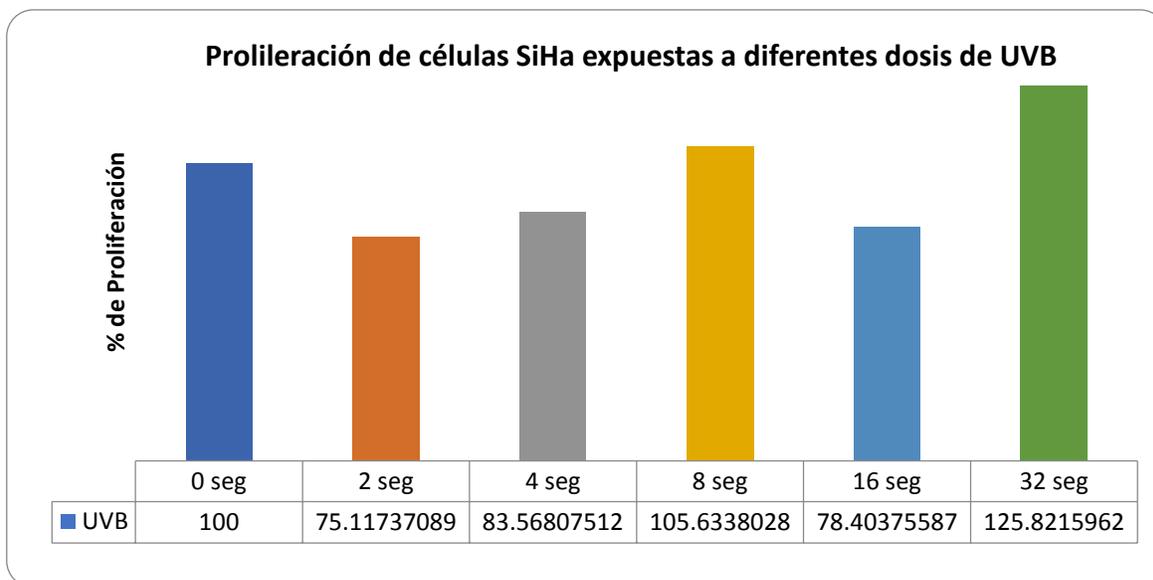


Figura 21. Proliferación de células SiHa a las 72 hrs después de su exposición a diferentes dosis 17.2 (2 seg), 34.4 (4seg), 68.8 (8 seg), 137.6 (16 seg), 275.2 (32 seg) J/m² de UVB.

1.2 Proliferación de células HaCat en respuesta a la radiación UVB

La ausencia de efecto evidente en proliferación de células SiHa puede deberse a resistencia por parte de esta línea celular en estas condiciones de estrés. Por lo tanto, se evaluó la proliferación de células HaCaT en respuesta a 68.8 J/m² de UVB. Como se puede observar en la gráfica de la figura 22. Las células muestran resistencia a este estímulo ya que la diferencia de proliferaciones entre células tratadas y no tratadas con UV no es significativa en este primer ensayo.

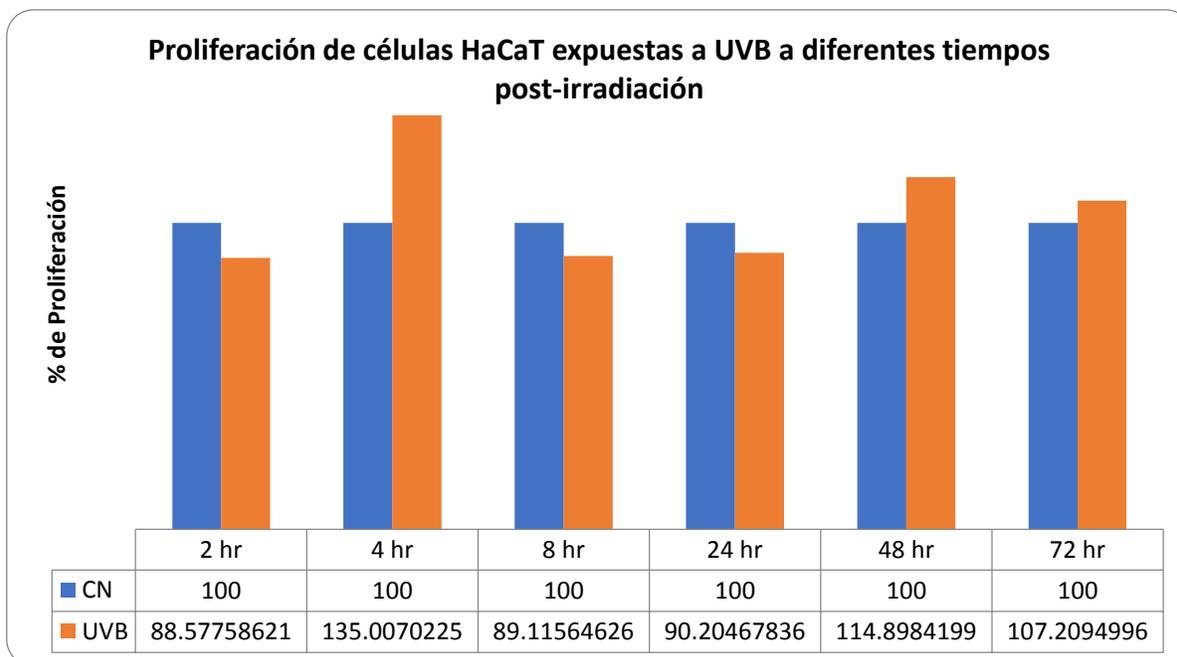


Figura 22. Proliferación de células HaCaT post 68.8 J/m^2 de radiación UVB. Sobre las barras se muestra el porcentaje de proliferación con respecto al control respectivo.

Los ensayos realizados hasta este punto mostraron que bajo las condiciones utilizadas (IR de 172 J/m^2 de UVB a 8 cm de la fuente) en células SiHa y HaCaT 68.8 J/m^2 no se estaba generando un efecto a nivel de proliferación en las células SiHa y HaCaT o bien estas muestran alta resistencia a UVB en la dosis utilizada. Por lo tanto, se requirió modificar las condiciones de irradiación utilizando un transiluminador (Spectroline Ultraviolet transiluminator) en el cual las células son expuestas directamente a 312 nm de UVB.

1.3 UVB inhibe la proliferación de las células Inmortal, tumorigénicas, VPH-Positivas y -Negativas de manera dosis dependiente

Se evaluó el efecto de UVB en la proliferación de células SiHa a las dosis de 882, 8820 y 17640 J/m^2 . En este ensayo se utilizó como fuente un transiluminador de UV de λ de 312 nm en donde las células se encuentran expuestas muy cercanamente a la radiación. Posteriormente, las células se incubaron por 72 horas y se evaluó la proliferación por medio

de un hemacitómetro. La figura 23 muestra que a partir de 881 J/m² de UVB se genera una fuerte disminución de en la proliferación celular. Adicionalmente, se observó por microscopía invertida una cantidad considerable de células muertas y detrito celular así como cambios morfológicos como el agrandamiento y aplanamiento de células.

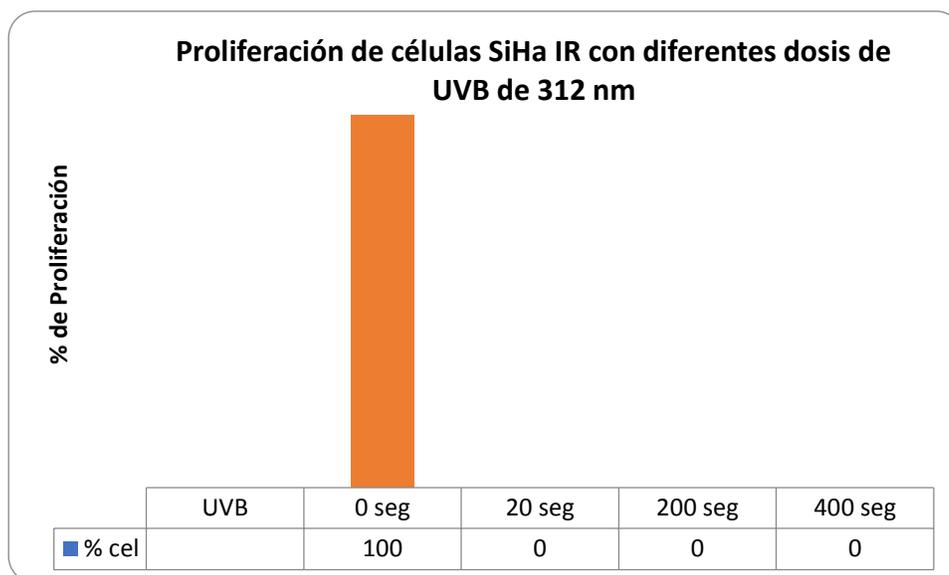
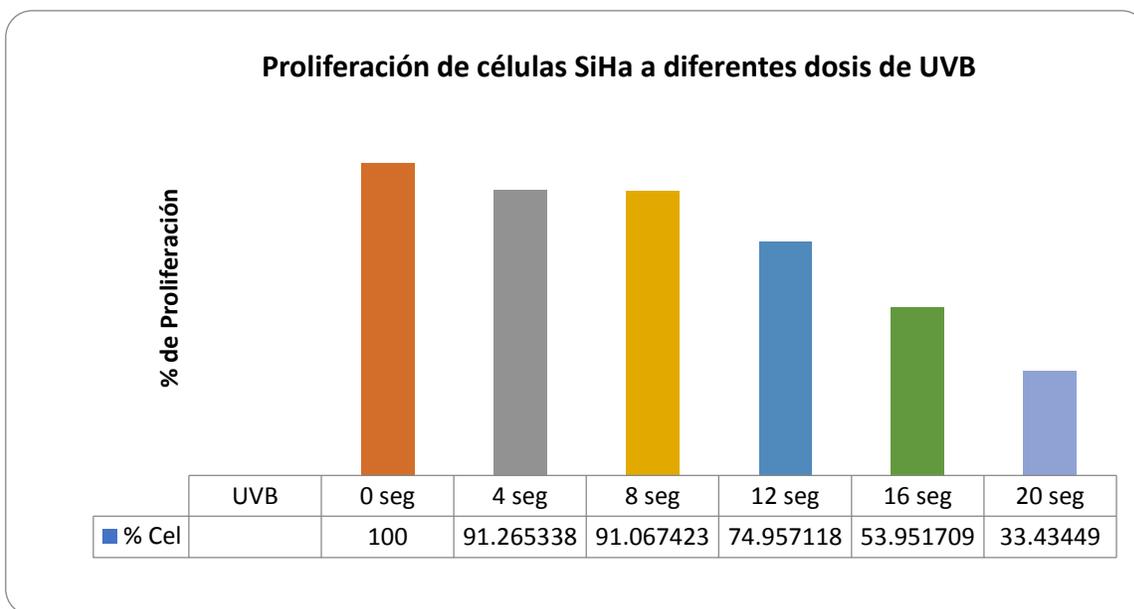


Figura 23. Proliferación de células SiHa irradiadas con distintas dosis de UVB. Las células fueron IR con 882, 8820 y 17,640 J/m² de UVB correspondientes a 0, 20, 200 y 400 segundos de exposición a UVB.

El ensayo mostró que a partir de 882 J/m² de exposición a UVB la proliferación es abatida completamente, el análisis en el microscopio evidenció gran cantidad de células muertas y detrito celular, por lo tanto, se evaluaron tiempos más cortos de exposición a UVB (4, 8 12, 16 y 20 segundos) para posicionar el experimento en un rango mayor de células viables y que sea posible un análisis mas profundo. El conteo celular por medio del uso de la cámara de Neubauer puede mostrar resultados con un porcentaje de error del 20 al 30% debido a varios factores como, error de pipeteo, incorrecta colocación de la muestra y falta de precisión en el conteo por el operador (Electronmicroscopy Sciences), por lo tanto, en este ensayo, adicionalmente, se probó la evaluación de proliferación por medio de otra metodología para corroborar los resultados obtenidos con el hemacitómetro. Se realizó un

ensayo doble con 0, 4, 8, 12, 16 y 20 segundos de irradiación con UVB (176.4, 352, 529.2, 705.6 y 882 J/m²) y se evaluó la proliferación celular tanto con cámara de Neubauer como por medio de tinción con cristal violeta seguido por espectrometría a 260 nm. En este ensayo se observa como la proliferación de las células disminuye conforme las células son expuestas a dosis mayores de UVB y se corroboró que por medio de ambos métodos de evaluación se obtiene el mismo patrón de proliferación (Figura 24). Sin embargo debido al menor margen de error que puede obtenerse por medio de la tinción con cristal violeta, se procedió a realizar los ensayos de proliferación posteriores por este método.

a)



b)

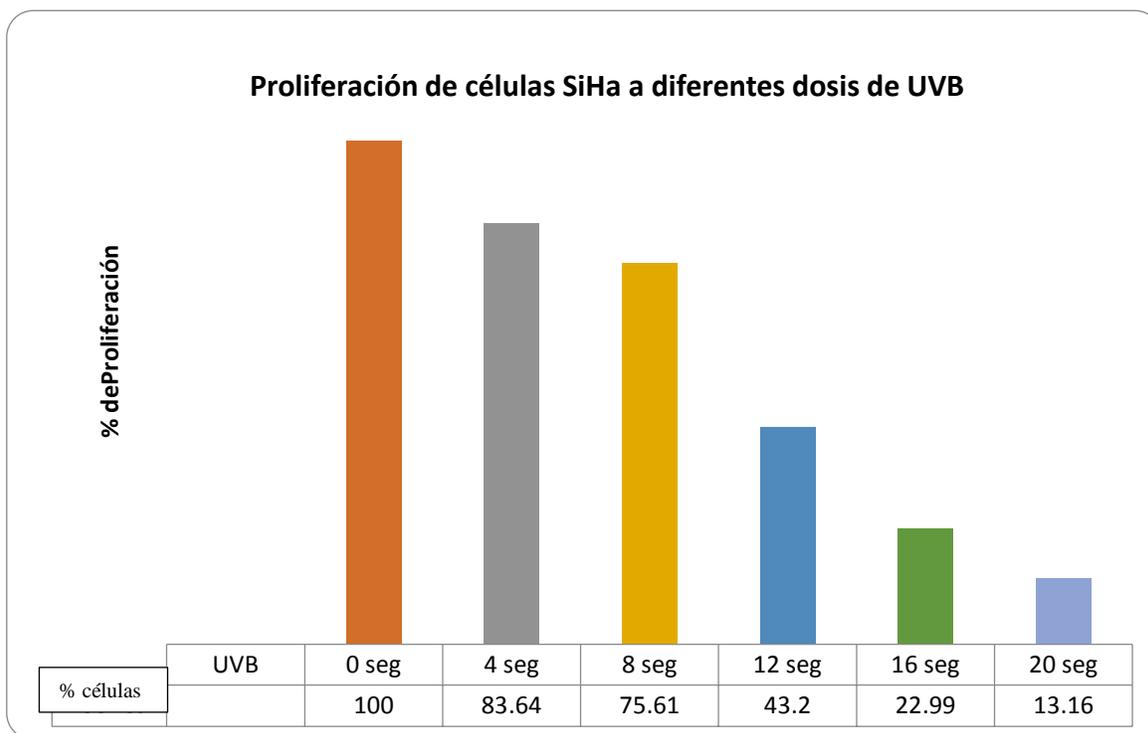


Figura 24. Proliferación de células SiHa IR con distintas dosis de UVB. Las células fueron IR con 176.4, 352, 529.2, 705.6, 882 J/m², correspondientes a 0, 4, 8, 12, 16 y 20 segundos de UVB respectivamente. a) La proliferación fue analizada con un hemacitómetro. b) Se determinó la proliferación por medio de incorporación con cristal violeta al 0.1%.

Con la finalidad de observar un efecto más claro bajo la exposición a UVB las células fueron expuestas a 5, 10, 15, 20 y 25 segundos. En la figura 25 se muestra que el efecto observado con dosis ligeramente diferentes se mantiene y se corroboró que el efecto es específico.

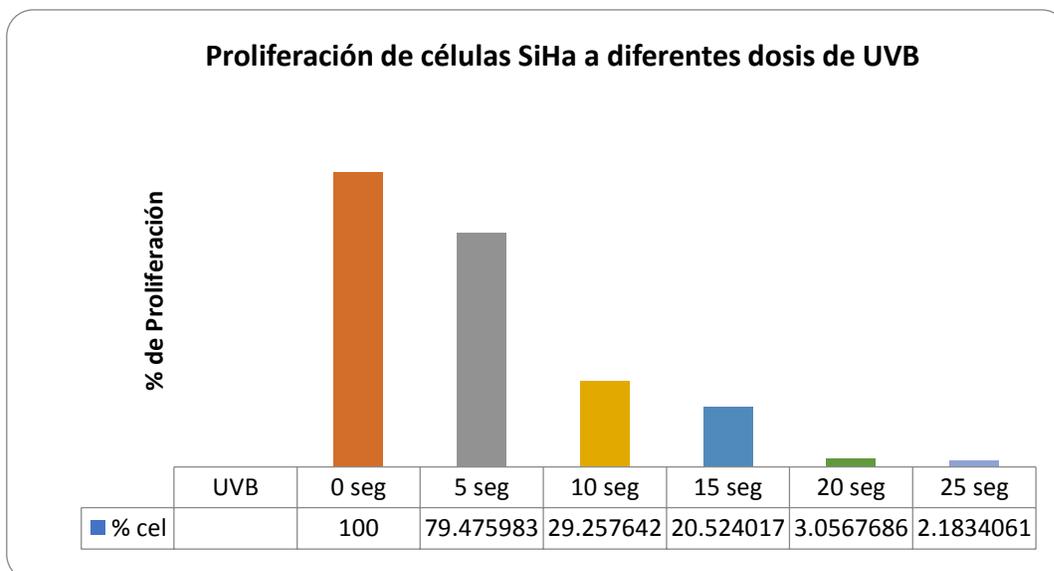


Figura25. Proliferación de células SiHa irradiadas con distintas dosis de UVB. Las células fueron irradiadas con distintas dosis de UVB (220.5 J/m^2 (5 seg), 441 J/m^2 (10seg), 661.5 J/m^2 (15seg), 882 J/m^2 (20seg) y 1102.5 J/m^2 (25 seg)). Determinación por medio de incorporación de cristal violeta al 0.1%.

Una vez caracterizado el efecto de UVB en proliferación celular en células SiHa se analizó dicho efecto en otras líneas celulares con distinto contexto celular como, la presencia o ausencia de VPH, tipo viral y característica inmortal o tumorigénica, lo cual puede influir considerablemente en la respuesta deseada por un agente anticancerígeno, por lo tanto, pueden ser determinantes en la resistencia o susceptibilidad a la RUVB. En estos experimentos involucramos tres variables a considerar: inmortalidad versus tumorigénesis, células VPH positivas contra VPH negativas y células VPH 16 versus VPH 18 +, por lo tanto, evaluamos la proliferación celular en las siguientes líneas celulares. Línea celular HaCaT inmortal y negativa a VPH; C33-A, línea tumoral, VPH negativa (VPH -); SiHa, línea tumoral, VPH 16 positiva (VPH 16+); y CaLo, línea tumoral, VPH 18 positiva (VPH 18+). Las células fueron tratadas con UVB y observamos efectos diferenciales entre ellas. Con respecto a las células no tumorales y tumorales, las células HaCaT presentaron menor efecto antiproliferativo que las tumorales SiHa y CaLo. En relación a la presencia del VPH se observa un efecto mayor en células VPH positivas que en VPH negativas, ya que tanto

las células SiHa, CaLo y C33A fueron mayormente afectadas por la UVB. Por otro lado, las células VPH-16 fueron más afectadas en proliferación que lo que lo fueron las células VPH-18 (figura 26).

Se analizó la proliferación celular de las líneas celulares IR y correspondientes controles negativos (células sin IR) por medio de incorporación de cristal violeta después de la exposición a UVB con dosis crecientes después de una incubación de 72 horas en condiciones libres de UVB. Se observaron cambios considerables en la proliferación de todas las líneas celulares a partir de 661.5 J/m² de UVB, sin embargo, la intensidad de la inhibición varió entre las distintas líneas celulares. Interesantemente, las células C-33A y CaLo mostraron mayor susceptibilidad que las células HaCaT y SiHa (Figura 26), sugiriendo que el estatus de tumorigénesis y el tipo de virus de papiloma humano puede determinar la respuesta a UVB. El análisis de la IC₅₀ mostró efectos diferenciales importantes entre células inmortal y tumorigénica, y VPH + y VPH-. Las células C-33 fueron más susceptibles con una IC₅₀ de 378.3, seguidas de las células CaLo con un aIC₅₀ de 474.8, sugiriendo que la presencia de VPH puede estar jugando un papel en la susceptibilidad de las células inmortales a UVB. Las células HaCaT presentaron una IC₅₀ de 681.9, sugiriendo menor susceptibilidad que las líneas tumorigénicas C-33Ay CaLo, y que la tumorigénesis puede favorecer la susceptibilidad a UVB. Sin embargo, las células SiHa fueron menos afectadas por la UVB, con una IC₅₀ de 724.7. Por lo tanto, es probable que el contexto celular como la presencia de VPH, expresión génica y proteica influyan en la respuesta celular a UVB. La inhibición de la proliferación celular inducida en estas células IR con UVB puede ser consecuencia de la detención del ciclo y/o muerte celular; por lo tanto, se analizaron estos procesos celulares con el fin de caracterizar más profundamente el efecto de la UVB en estas células.

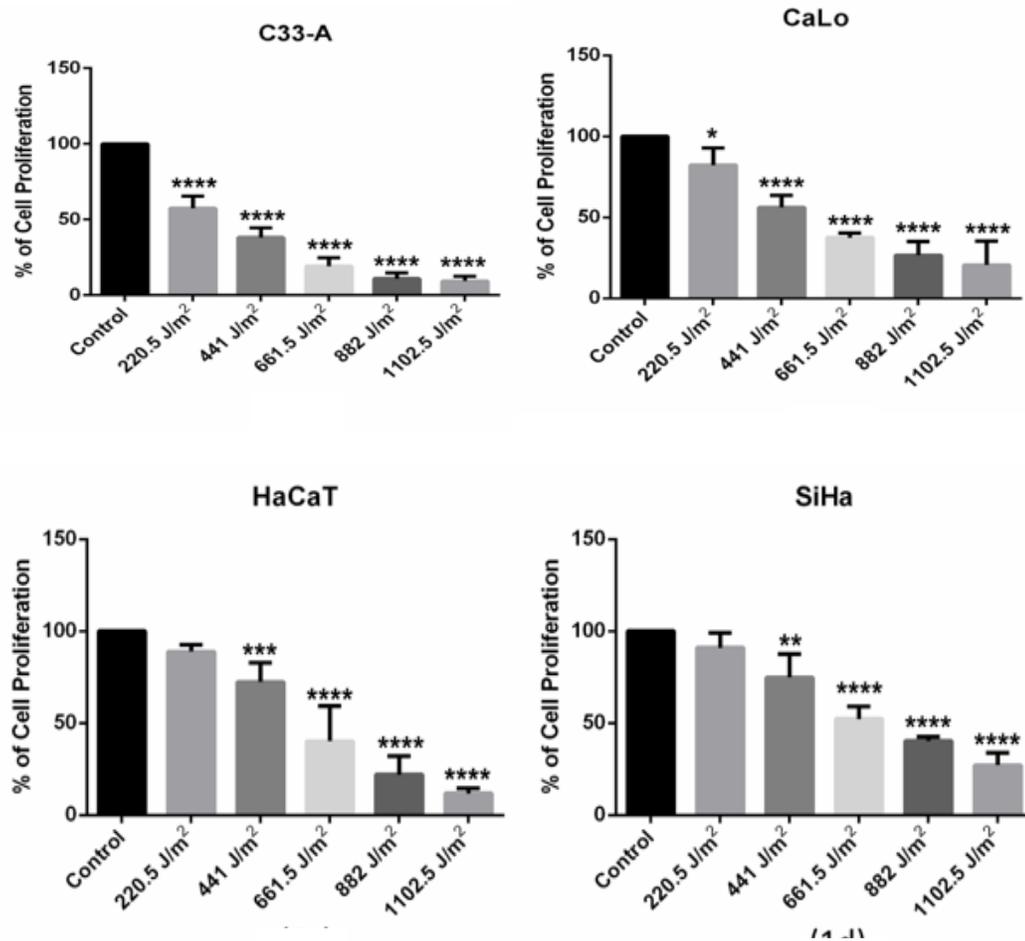


Figura 26. La UVB inhibe la proliferación de Células C33-A, HaCaT, CaLo y SiHa. Las Células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²) de UVB. a) Células C-33A, b) Células CaLo, c) Células HaCaT y d) Células SiHa. Control: Células sin irradiación con UVB.

Table 1. IC50 of cells UVB-IR and cell characteristics.

| Cell line | HPV status | Cell phenotype | IC50 |
|-----------|-----------------|----------------|------------------------|
| C-33A | HPV negative | Tumorigenic | 378.3 J/m ² |
| CaLo | HPV 18 positive | Tumorigenic | 474.8 J/m ² |
| HaCaT | HPV negative | Immortal | 681.9 J/m ² |
| SiHa | HPV 18 positive | Tumorigenic | 724.7 J/m ² |

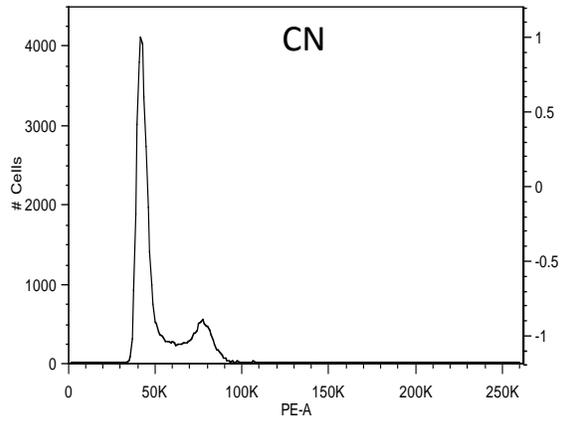
Tabla 1. IC50 de células Inmortal y Tumorigénicas. Determinado con el programa GraphPad.

2. La Radiación UVB Inhibe el Ciclo Celular de las Células Inmortal, Tumorigénicas, VPH Negativas y VPH positivas

2.1 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 72 hrs post-IR

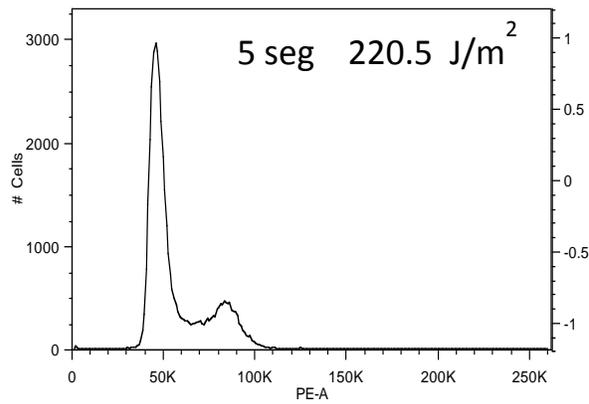
Durante la exposición a estrés por UVB se desencadenan vías de señalización que conducen a la regulación del ciclo celular. La detención del ciclo celular en algún punto es un paso indispensable para el chequeo del daño al ADN y posterior resolución ya sea, continuación del ciclo celular, inducción a muerte celular (apoptosis) u otro proceso relacionado a la detención del ciclo vital como la senescencia, autofagia, entre otros. Con el interés de conocer en qué punto del ciclo celular se está llevando a cabo el efecto que se ha observado se realizó un ensayo de ciclo celular por medio de citometría de flujo con tinción con Ioduro de Propidio (IP). La evaluación del ciclo celular mostró claramente como el porcentaje de células en las fases S y G2/M del ciclo celular aumenta a partir de 5 segundos de exposición a UVB (661.5 J/m²) y continúa acentuándose el efecto con mayores dosis de UVB (882 y 1102.5 J/m²). Adicionalmente, se observó la presencia de células muertas en la fase sub G0 a partir de la misma dosis. Este resultado correlaciona con los ensayos de proliferación en los cuales se observa como la proliferación celular disminuye a mayor dosis de UVB (Figuras 27a y 27b).

a)



%G1 = 62.2
%S = 21.8
%G2 = 15.6

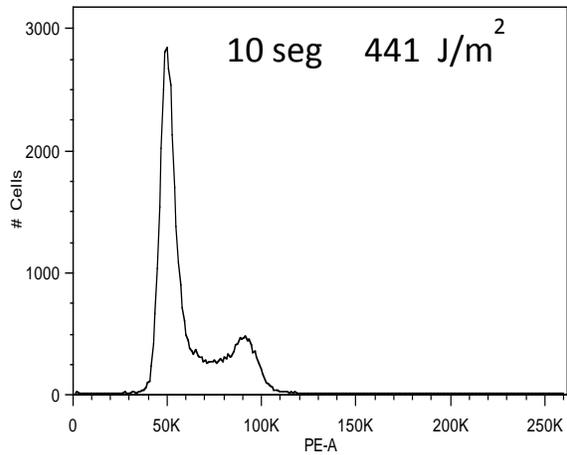
b)



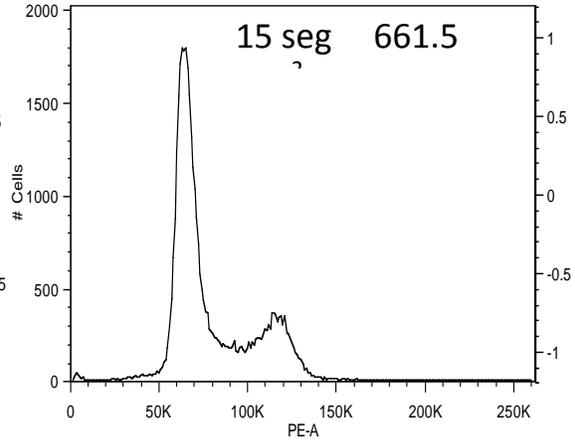
%G1 = 62.1
%S = 20.3
%G2 = 16.6

c)

d)

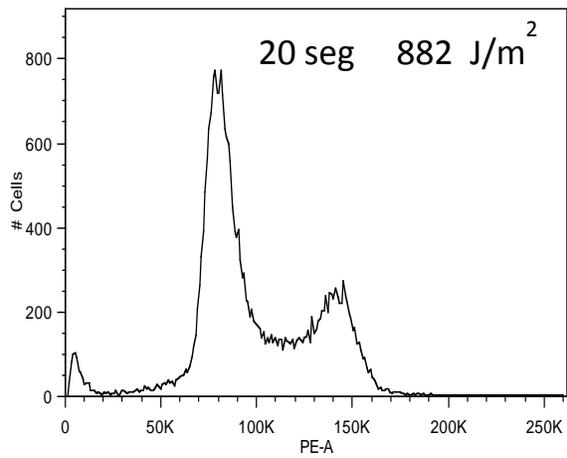


%G1 = 59.2
 %S = 23.1
 %G2 = 16.3



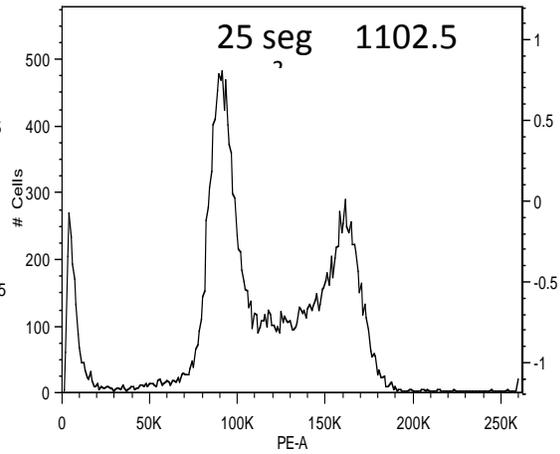
%G1 = 57.1
 %S = 21.4
 %G2 = 18.5

e)



%G1 = 26.2
 %S = 39
 %G2 = 29.8

f)



%G1 = 14.8
 %S = 40.2
 %G2 = 33

Ciclo celular por citometría de flujo de células SiHa expuestas a dosis crecientes de UVB de 312 nm

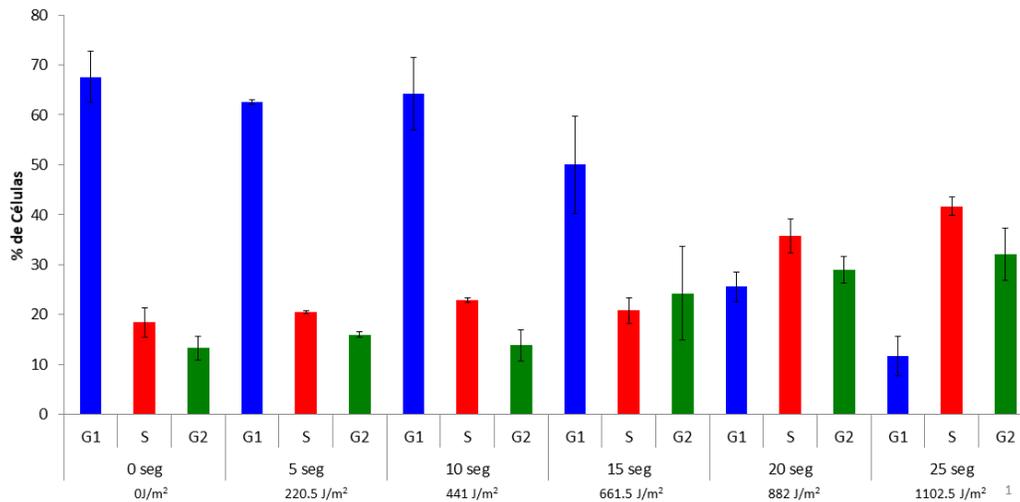


Figura 27. La radiación con UVB detiene el ciclo de vida de células SiHa en las fases S y G2/M. a) Se muestran los histogramas obtenidos para cada uno de los tratamientos. Control negativo (cn), IR con 220.5 J/m²; IR con 441 J/m²; IR con 661.5 J/m², IR con 882 J/m² e IR con 102.5 J/m². Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes. b) Se muestra la gráfica de los resultados de 3 experimentos independientes del análisis de ciclo celular.

2.2 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 72 hrs post-IR

Las células HaCaT fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 72 hrs post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis con el programa Flowjo, muestra que las células IR tienden a detenerse en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. El uso del algoritmo Dean-Jett Fox para determinar las fases del ciclo, reveló las fases del ciclo celular en las células control, células IR con 220.5 y 441 J/m², mientras que a mayores dosis no fue posible obtener las fases del ciclo, lo que sugiere que el grado de daño celular es muy fuerte a estas dosis de UVB. Fue notable la presencia de un pico

correspondiente a la fase SubG0 del ciclo celular, sugiriendo fuertemente amplia destrucción celular a esas dosis. Figura 28.

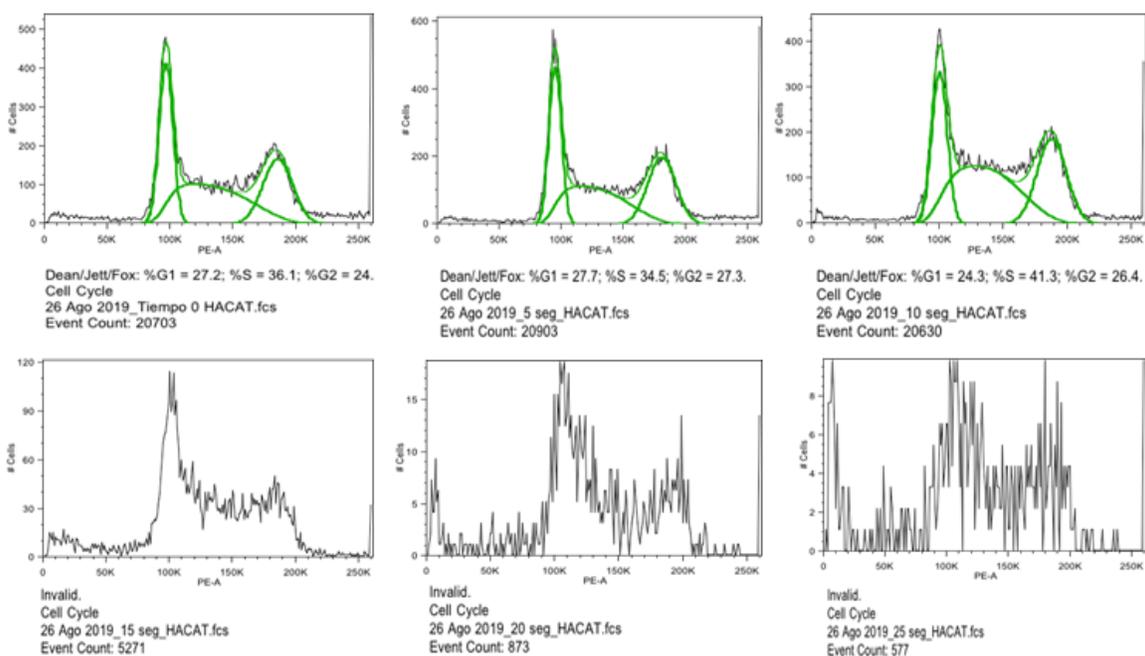


Figura 28. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 72 hrs post-IR.

Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.3 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A a las 72 hrs post-IR

Las células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 72 hrs post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis en el programa Flowjo, muestra que las células IR se detienen en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. El uso del algoritmo Dean-Jett Fox para determinar las fases del ciclo, reveló las fases del ciclo celular en las células control, células IR con 220.5, 441 y 661.5 J/m², mientras que a mayores dosis no

fue posible obtener las fases del ciclo, lo que sugiere un alto grado de daño celular a estas dosis de UVB. Figura 29.

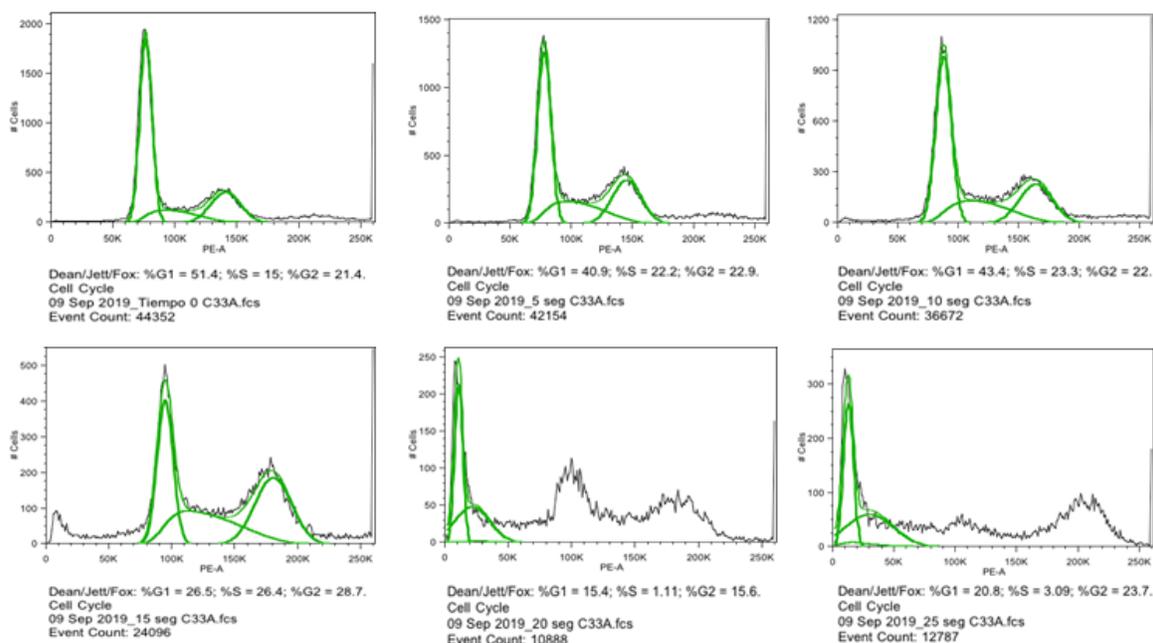


Figura 29. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A. Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.4 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 72 hrs post-IR

Las células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 72 hrs post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis en el programa Flowjo, muestra que las células IR tienden a detenerse en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. El uso del algoritmo Dean-Jett Fox para determinar las fases del ciclo, identificó las fases del ciclo celular en las células control, células IR con 220.5, 441, 661.5 y 882 J/m², mientras que a 1102.5 J/m² no fue posible obtener las fases del ciclo sugiriendo cierta resistencia de estas

células a UVB, sin embargo dicha resistencia se pierde con la mayor dosis de UVB estudiada. Figura 30.

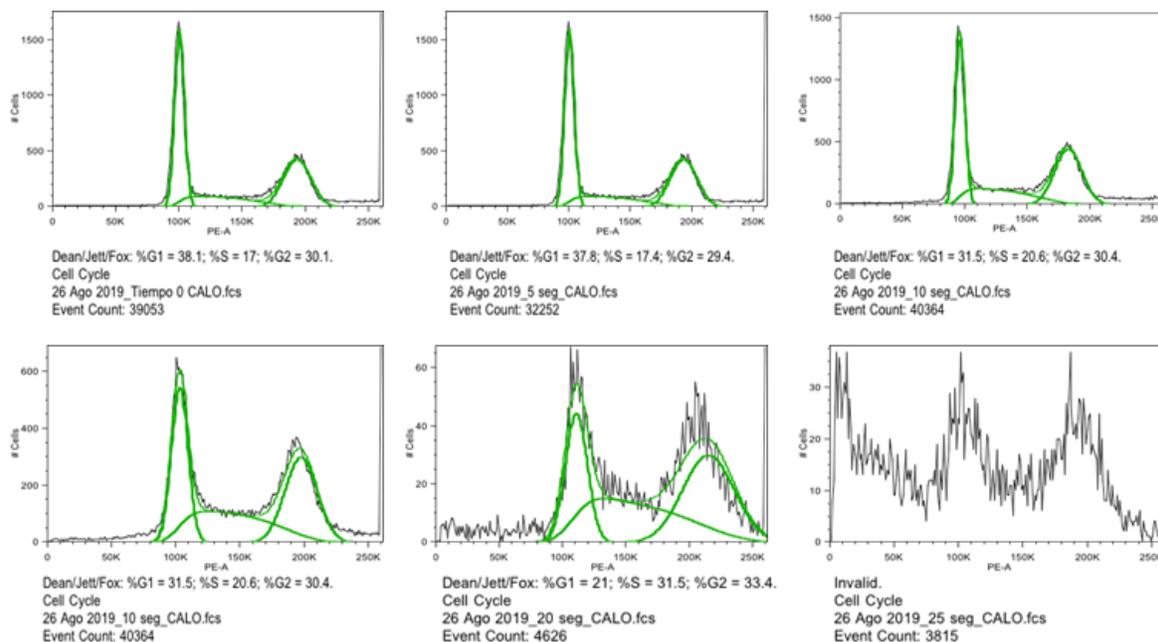


Figura 30. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 72 hrs post-IR

Las células fueron cultivadas a una confluencia de 200,000 células por caja p60 y se IR a las 24 hrs. Las células fueron cosechadas a las 72 hrs para su análisis por citometría de flujo. Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882 J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.5 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 48 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células HaCaT IR con UVB y analizadas a las 72 hrs post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 661.5, 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide obtener porcentajes de células de cada fase del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y

fueron analizadas a las 48 hrs post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis en Flowjo muestra que las células IR se arrestan en las fases S y G2/M del ciclo celular conforme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción, corroborando lo que se observó a las 72 horas de evaluación. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 661.5, 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular. Figura 31.

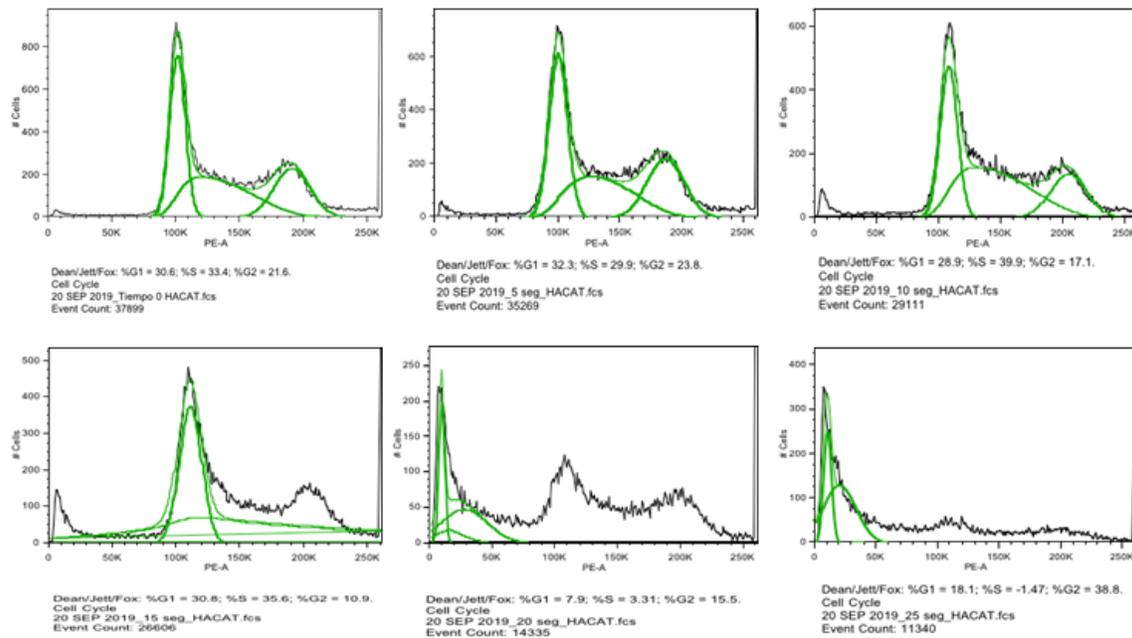


Figura 31. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 48 hrs post-IR.

Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.6 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A a las 48 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células C33A IR con UVB y analizadas a las 72 hrs post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células

fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 48 horas post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis con el algoritmo de Dean-Jett Fox muestra que las células IR se arrestan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción como se había observado a las 48 horas post IR. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 661.5, 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular. Figura 32.

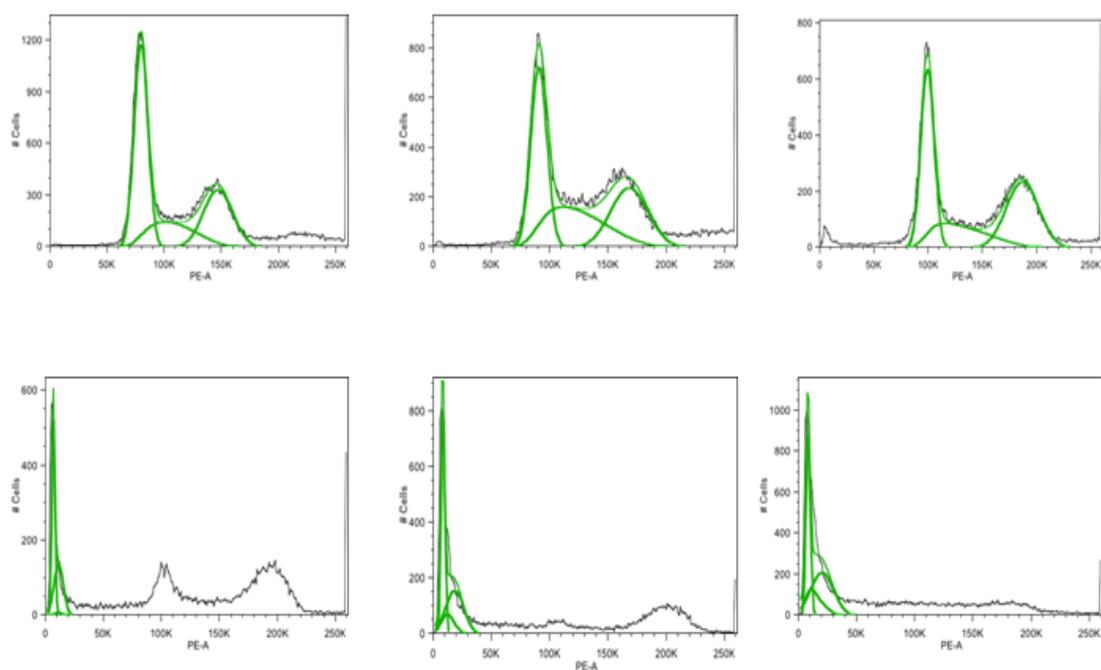


Figura 32. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C33A a las 48 hrs post-IR. Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.7 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 48 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células HaCaT, C33A y CaLo IR con UVB y analizadas a las 72 hrs post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m²,

lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células SiHa fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 48 hrs post IR para comparar el efecto de UVB a este tiempo con las otras líneas analizadas a las 48 horas post-IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis con Dean-Jett-Fox muestra que las células IR se detienen en las fases S y G2/M del ciclo celular conforme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción como se había observado previamente a las 72 horas. Figura 33.

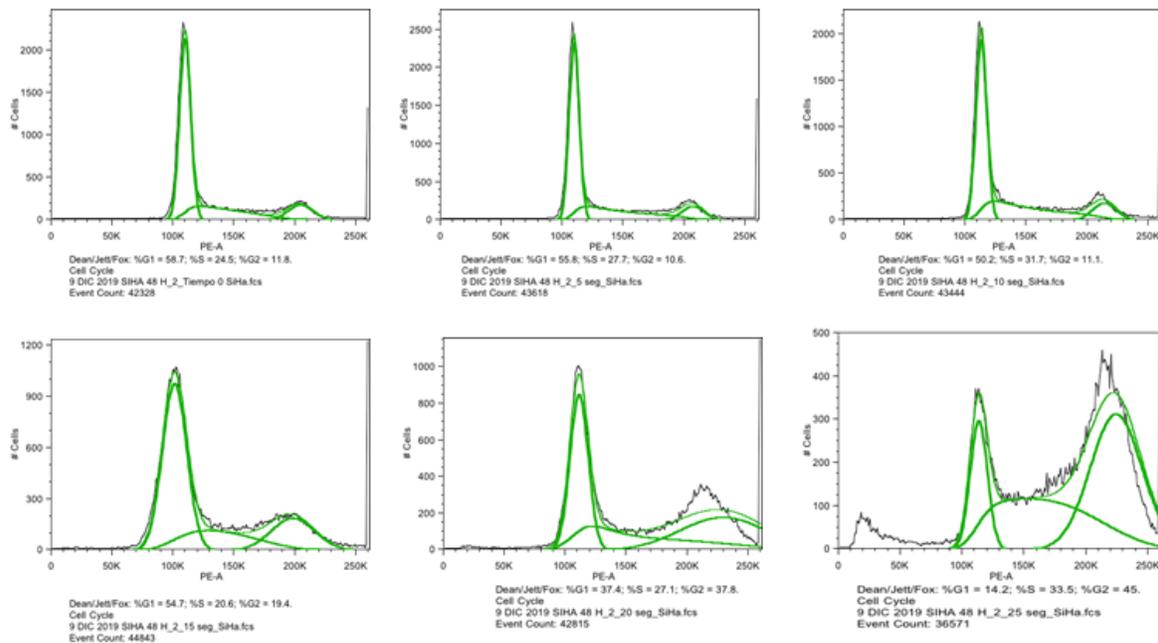


Figura 33. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 48 hrs post-IR. Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.8 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 48 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células CaLo IR con UVB y analizadas a las 72 hrs post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células

fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 48 horas post IR con la finalidad de obtener un análisis con mayor certeza del ciclo celular. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo muestra que las células IR se arrestan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de la células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 661.5, 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular. Figura 34.

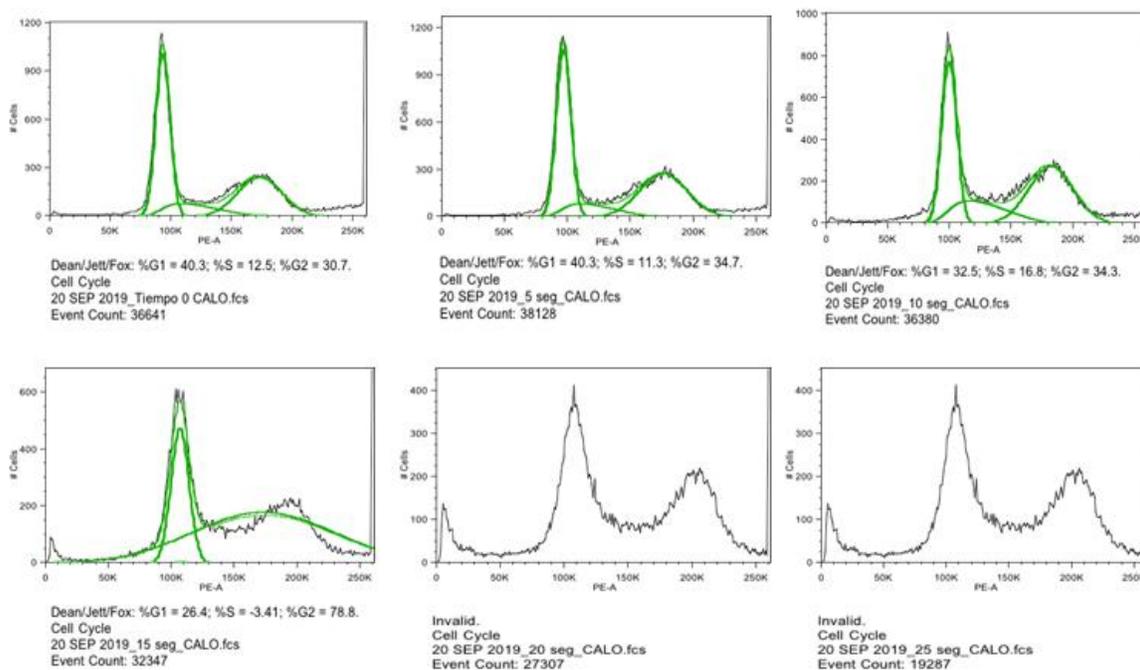


Figura 34. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 48 hrs post-IR. Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.9 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 24 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células C33A IR con UVB y analizadas a las 72 y 48 horas post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 24 horas post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis estadístico de dos ensayos independientes muestran que las células IR se arresan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de la células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular, figura 35.

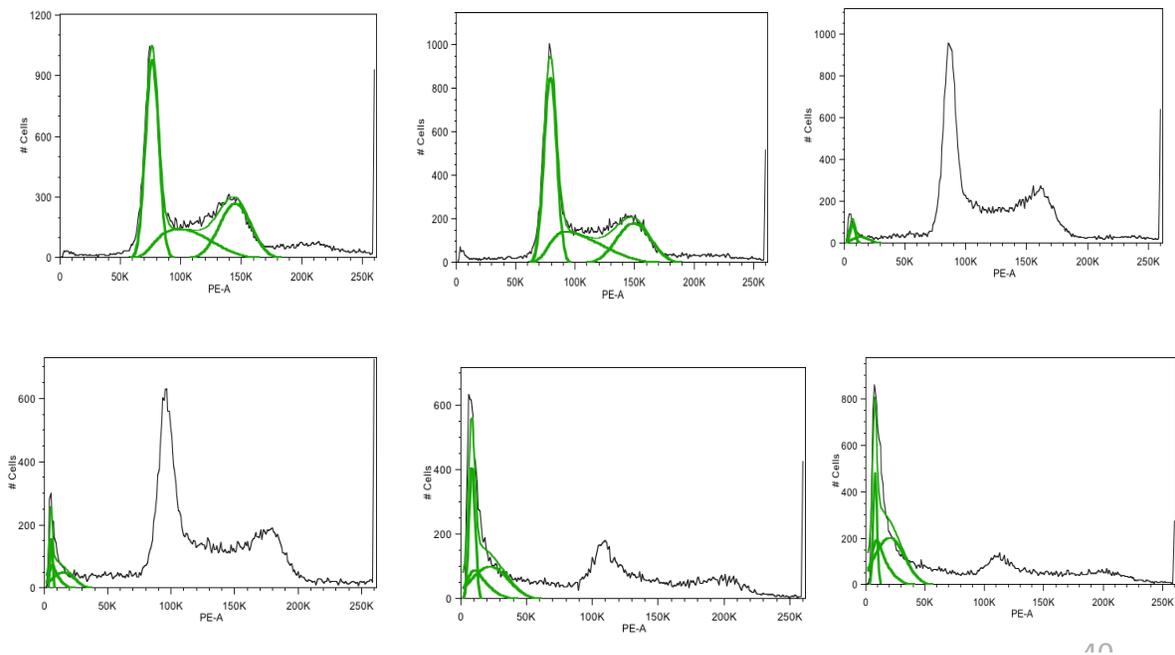


Figura 35. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células HaCaT a las 24 hrs post-IR. Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882 J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.10 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C-33A a las 24 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células C-33A IR con UVB y analizadas a las 72 y 48 horas post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 24 horas post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis estadístico de dos ensayos independientes muestran que las células IR se arretan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular, figura 36.

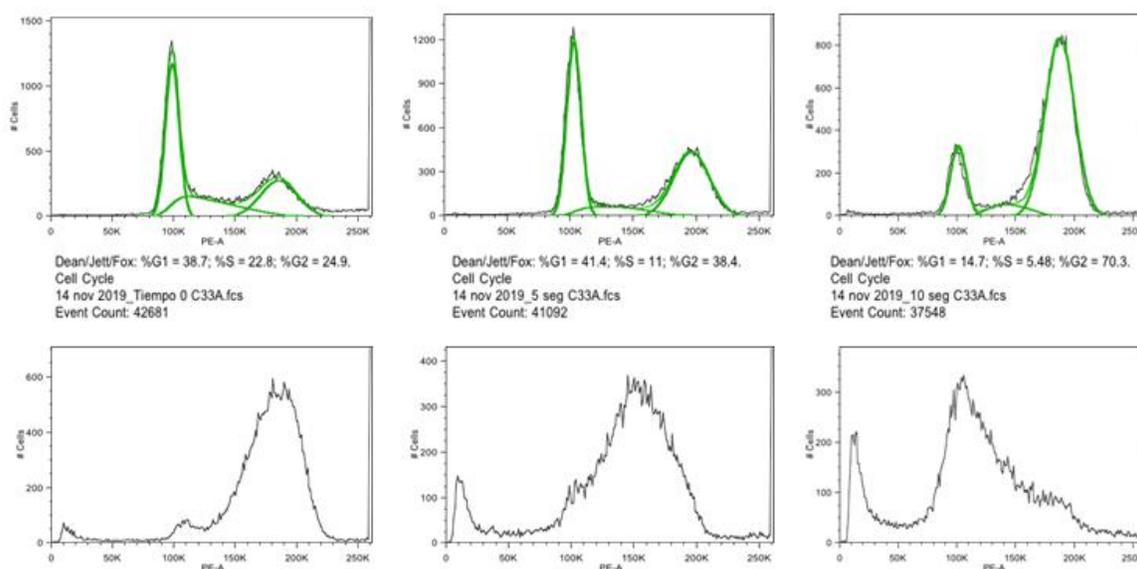


Figura 36. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células C-33A a las 24 horas post-IR. Histograma izq/arriba: células sin IR; Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882 J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.11 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 24 hrs post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células HaCaT, C33A y CaLo IR con UVB y analizadas a las 72 y 48 horas post-IR nuevamente tuvo un fuerte impacto con las dosis de 661.5, 882 y 1102.5 J/m², lo cual impidió realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células SiHa fueron IR con dosis crecientes de UVB (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 24 horas post IR para comparar el efecto de UVB a este tiempo con las otras líneas analizadas a las 24 horas post-IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis con Dean-Jett-Fox muestra que las células IR se arrestan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de las células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción como se había observado previamente a las 72 horas, figura 37.

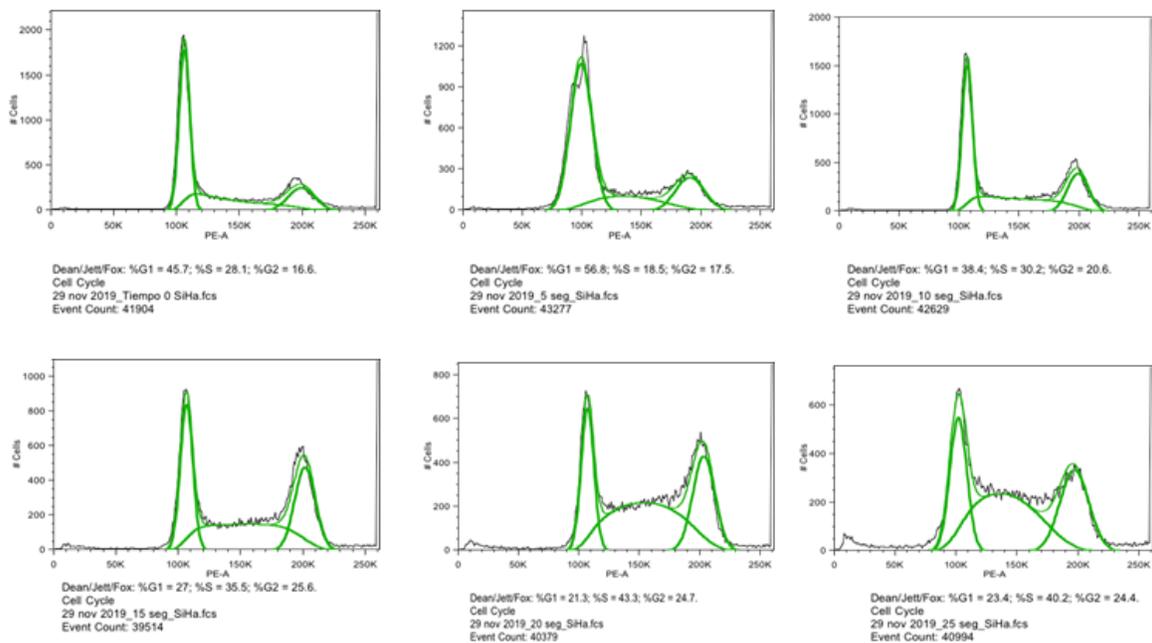


Figura 37. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células SiHa a las 24 horas post-IR. Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba:

células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

2.12 Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 24 horas post-IR

El efecto sobre el ciclo celular de las células CaLo IR con UVB y analizadas a las 72 y 48 horas post-IR tiene un fuerte impacto con las dosis de 882 y 1102.5 J/m², lo cual impide realizar un análisis confiable del ciclo celular a este tiempo de evaluación. Por lo tanto, las células fueron IR con dosis crecientes de UVB de 312 nm (220.5 a 1102.5 J/m²) y fueron analizadas a las 24 horas post IR. La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo y posterior análisis estadístico de dos ensayos independientes muestran que las células IR se arrestan en las fases S y G2/M del ciclo celular con forme aumenta la dosis de UVB, a diferencia de la células sin IR que se posicionan en la fase G1 del ciclo en mayor proporción. Es notorio el grado de daño celular con las dosis de 882 y 1102.5 J/m² de UVB donde el ciclo celular no puede analizarse con exactitud y no se obtienen picos respectivos para ninguna de las fases del ciclo celular. 0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m², figura 38.

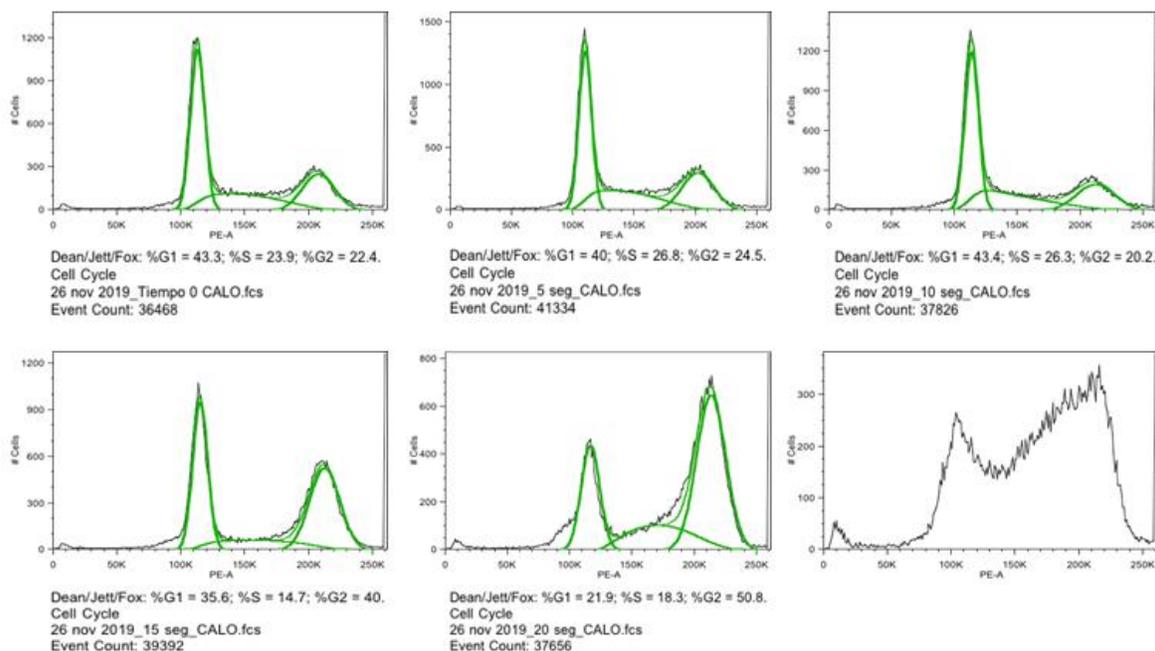


Figura 38. Efecto de la radiación UVB sobre el ciclo celular de células CaLo a las 24 horas post-IR. Histograma centro/arriba: células IR con 220.5 J/m²; Histograma der/arriba: células IR con 441 J/m²; Histograma izq/abajo: células IR con 661.5 J/m²; Histograma centro/abajo: 882J/m²; Histograma der/abajo: células IR con 1102.5 J/m².

El análisis de proliferación celular mostró un efecto diferencial entre las distintas líneas celulares expuestas a UVB que podría ser también reflejado en el progreso del ciclo de vida. El estudio de ciclo celular por medio de citometría de flujo mostró detención de las fases de ciclo celular S y G2/M a 441 J/m² en células HaCaT, mientras que en células C-33A y CaLo el efecto se registró a los 661.5 J/m² de UVB. Puede apreciarse que en células HaCaT, los picos correspondientes a las fases del ciclo celular no son evidentes y picos correspondientes a la fase subG0 fueron evidentes desde 220.5 J/m², mientras que la fase SubG0 fue apreciable a partir de 661.5 J/m². Diferencialmente, las células SiHa mostraron detención del ciclo en las fases S y G2/M a los 881 J/m², mostrando resistencia a dosis menores de UVB. Interesantemente, las células SiHa no mostraron picos altos en la fase SubG0. Nuevamente, es notable, que la presencia o ausencia del VPH no es determinante en la sensibilidad de las células a daño celular, pero el tipo viral puede jugar un papel en la resistencia a UVB. Todas las líneas celulares exhibieron proporciones importantes de células en la fase SubG0. Sugiriendo regulación de muerte celular debido a la exposición a UVB.

3. APOPTOSIS

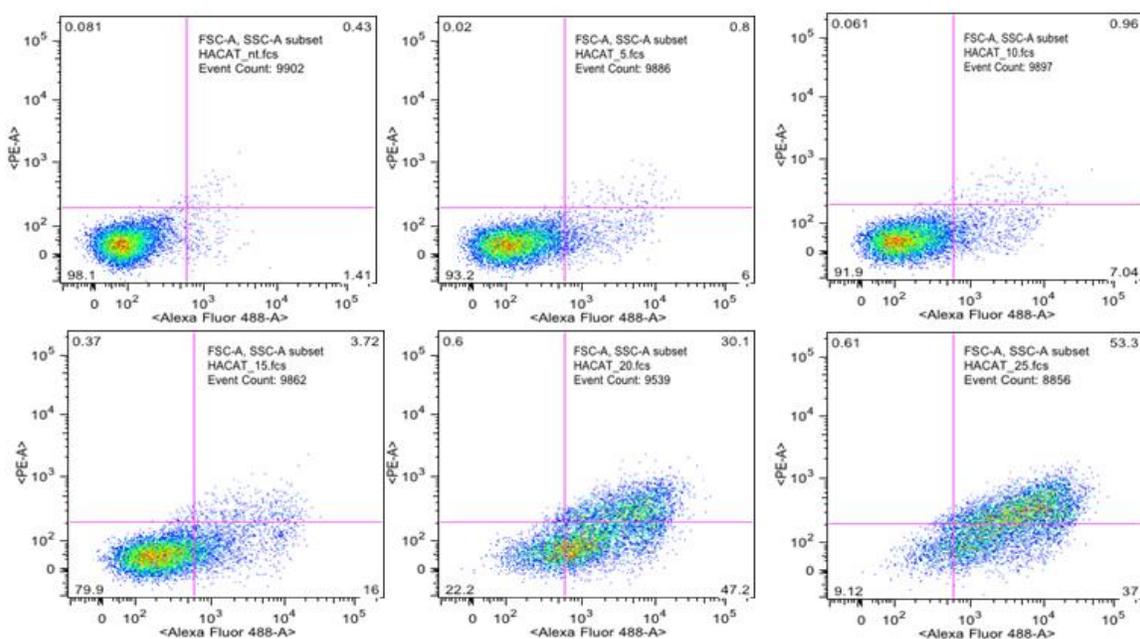
3.1 La UVB Induce a Apoptosis de Líneas Celulares Inmortal, Tumorigénicas, VPH Negativas y Positivas de Manera Dosis-Dependiente

3.1.1 Apoptosis de Células HaCaT Irradiadas con UVB

Las células fueron IR con diferentes dosis de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²) a las 24 horas post cultivo con 200,000 células por caja p60. A las 72 horas post IR las

células fueron teñidas con Anexina V y IP para el análisis de apoptosis por citometría de flujo. Los datos obtenidos de tres ensayos independientes muestran que las células son inducidas a apoptosis a partir de 661.5 J/m^2 . Los porcentajes de apoptosis totales (sumatorias de apoptosis tempranas y tardías correspondientes a cada dosis) obtenidas con 0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m^2 fueron de 6.43, 6.37, 11.49, 17.51, 59.88, 77.21 respectivamente. El análisis estadístico por medio ANOVA muestra que el efecto es significativo con respecto al control con 882 J/m^2 y 1102 J/m^2 . Figura 39a y 39b.

a)



b)

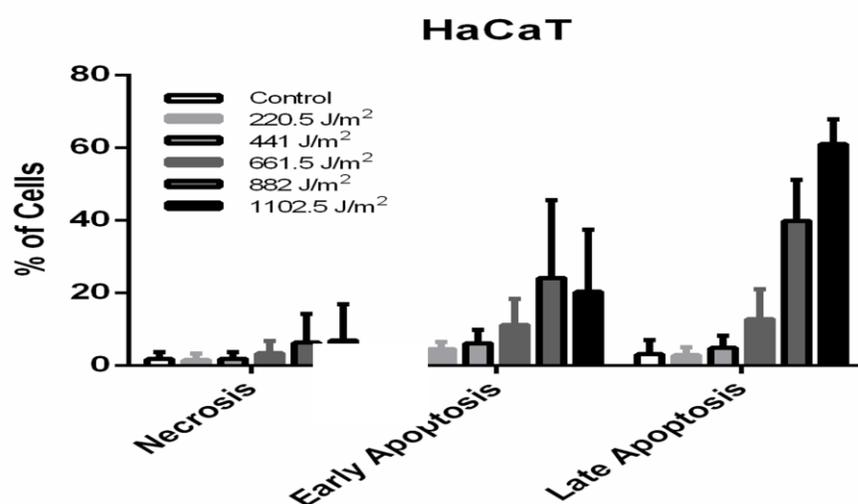


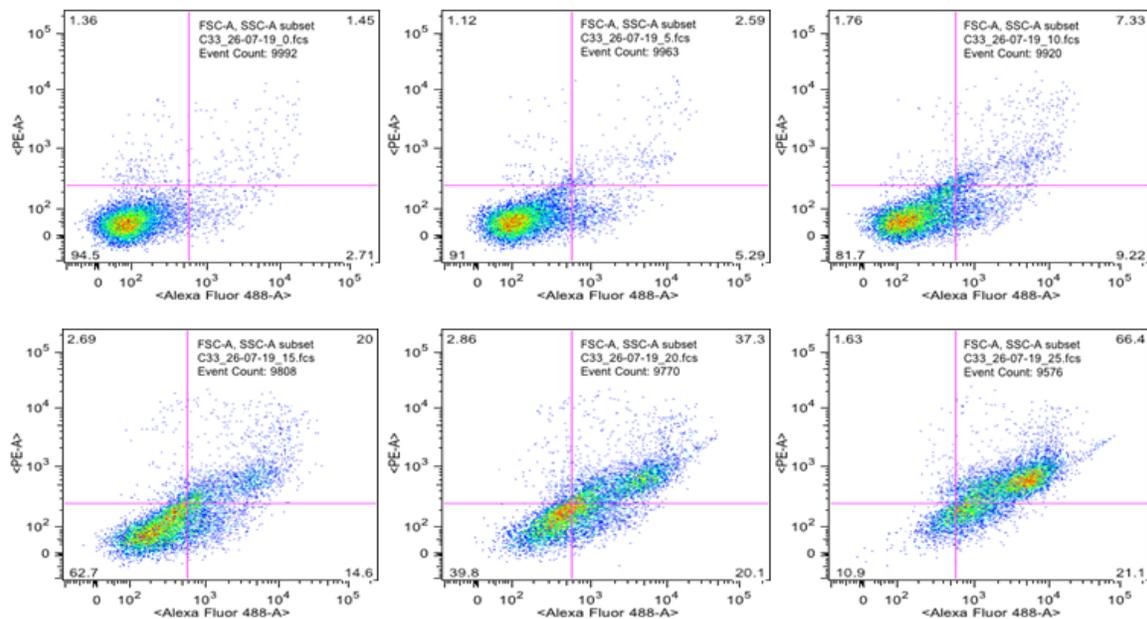
Figura 39. Apoptosis inducida por UVB en células HaCaT. a) Se analizó la apoptosis y necrosis por citometría de flujo. De izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran los histogramas con cada estímulo de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²). El efecto fue comparado con el efecto en células no IR. Cada histograma muestra los cuadrantes de izquierda a derecha y arriba abajo siguientes: necrosis, apoptosis tardía, células normales y apoptosis temprana. b) Se muestra una gráfica con los datos de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. Se utilizó comparación múltiple one-wat ANOVA con Tukey post-test. Las barras representan la desviación estándar y media de tres experimentos independientes ($p < 0.05$). Se muestra la significancia: ***=0.0003 a 882 y ****=0.0001 a 1102.5 J/m² en apoptosis tardía.

3.1.2 Apoptosis de Células C-33A Irradiadas con UVB

Las células fueron IR con diferentes dosis de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²) a las 24 horas post cultivo con 200,000 células por caja p60. A las 72 horas post IR las células fueron teñidas con Anexina V y IP para el análisis de apoptosis por citometría de flujo. Los datos obtenidos de tres ensayos independientes muestran que las células son prontamente inducidas a apoptosis a partir de 441 J/m² alcanzando porcentajes de 3.81, 8.08, 16.7, 33.26, 53.21, 83.2 con las dosis de 0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²

respectivamente. Para obtener los valores totales de apoptosis, los porcentajes correspondientes a cada dosis se obtuvieron de la sumatoria de la apoptosis temprana y tardía. El análisis estadístico ANOVA muestra que los cambios significativos se observan con las dosis de 661.5, 882 y 1102 J/m². Es de interés que los niveles de apoptosis tardía muestran un incremento dosis dependiente más pronunciado que los niveles de apoptosis temprana lo que sugiere un fuerte efecto de la UVB sobre la inducción a muerte celular. Figura 40a y 40b.

a)



b)

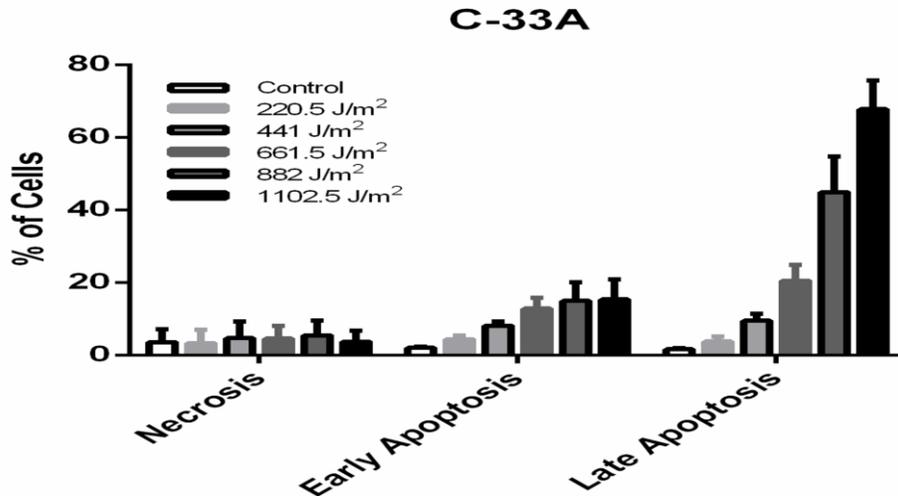


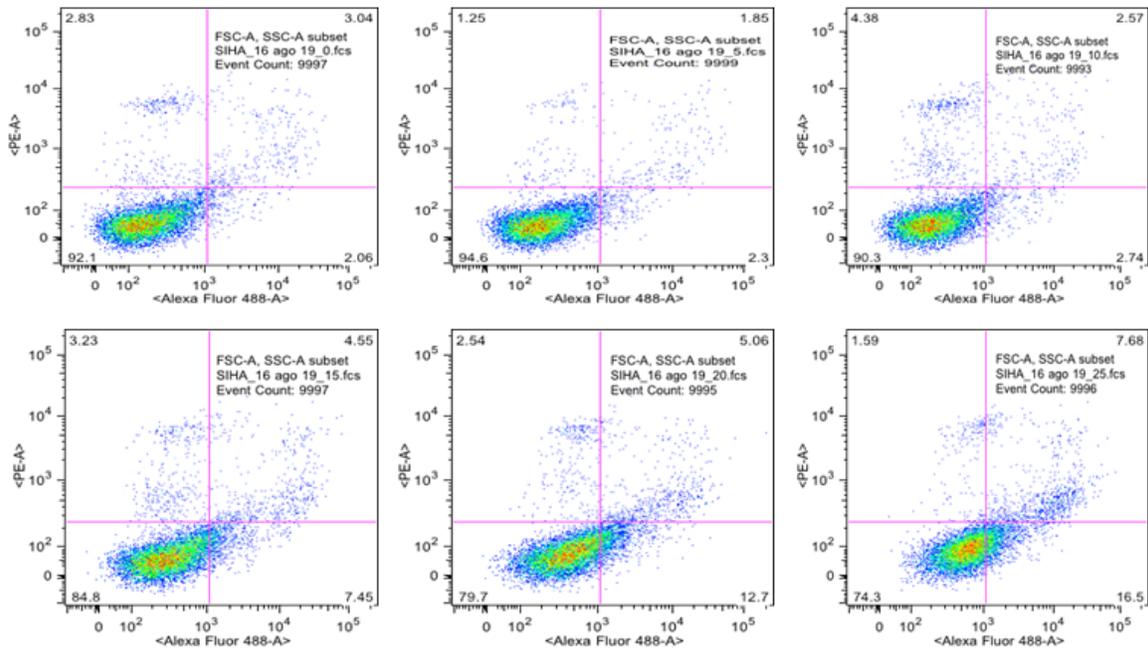
Figura 40. Apoptosis inducida por UVB en células HaCaT. a) Se analizó la apoptosis y necrosis por citometría de flujo. De izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran los histogramas con cada estímulo de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²). El efecto fue comparado con el efecto en células no IR. Cada histograma muestra los cuadrantes de izquierda a derecha y arriba abajo siguientes: necrosis, apoptosis tardía, células normales y apoptosis temprana. b) Se muestra una gráfica con los datos de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. Se utilizó comparación múltiple one-wat ANOVA con Tukey post-test. Las barras representan la desviación estándar y media de tres experimentos independientes ($p < 0.05$). Se muestra la significancia: $* = 0.0143$ a 882 y $** = 0.0048$ a 1102.5 J/m² en apoptosis temprana y $*** = 0.0003$ a 882 y $**** = 0.0001$ a 1102.5 J/m² en apoptosis tardía.

3.1.3 Apoptosis de Células SiHa Irradiadas con UVB

Las células fueron IR con diferentes dosis de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²) a las 24 horas post cultivo con 2×10^5 células por caja p60. A las 72 horas post IR las células fueron teñidas con Anexina V y IP para el análisis de apoptosis por citometría de flujo. Los datos obtenidos de tres ensayos independientes muestran que las células son inducidas a

apoptosis a partir de 882 J/m^2 alcanzando porcentajes de 3.86, 3.2, 6.43, 8.84, 14.82, 20.63% con las dosis de 0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m^2 respectivamente (los porcentajes de apoptosis totales analizados corresponden a la suma de apoptosis tardías y tempranas). Es de interés notar que el efecto sobre apoptosis inducida en esta línea celular es mucho menor que el que se observa con las otras líneas celulares lo que sugiere que SiHa muestra cierto grado de resistencia a la radiación UVB. Sin embargo, el análisis de los datos por medio de ANOVA muestra que los cambios en apoptosis son significativos con 882 y 1102.5 J/m^2 Figura 41a y 41b.

a)



b)

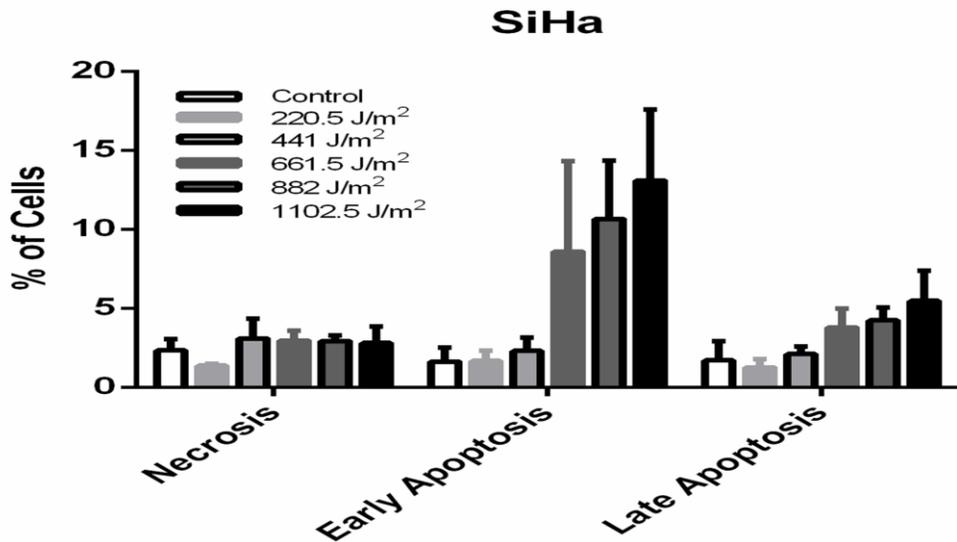


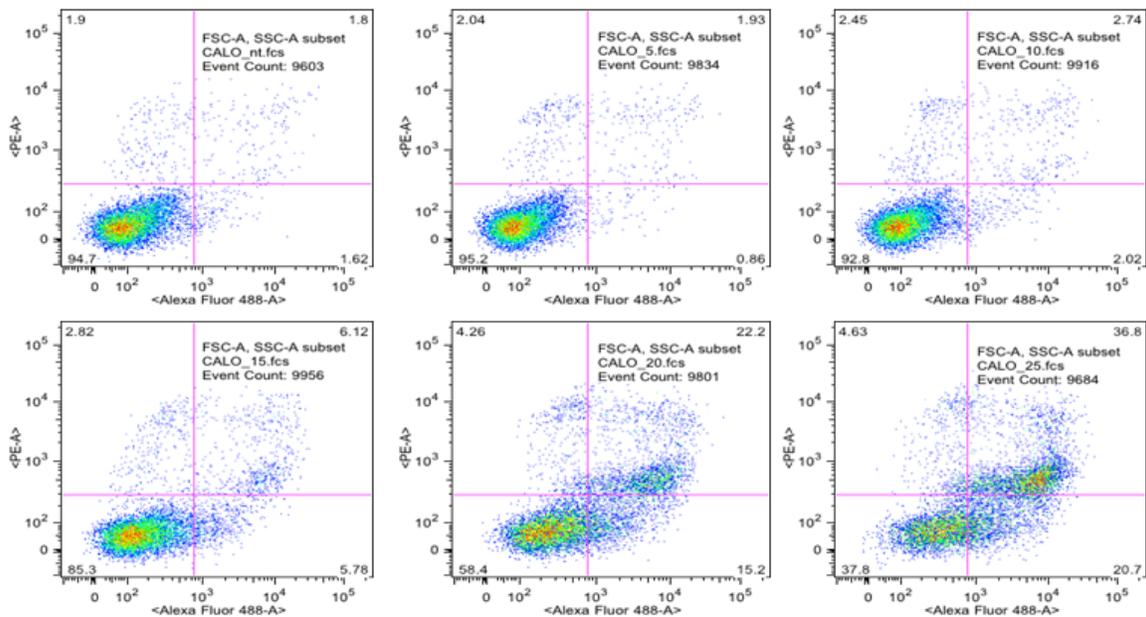
Figura 41. Apoptosis inducida por UVB en células SiHa. a) Se analizó la apoptosis y necrosis por citometría de flujo. De izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran los histogramas con cada estímulo de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²). El efecto fue comparado con el efecto en células no IR. Cada histograma muestra los cuadrantes de izquierda a derecha y arriba abajo siguientes: necrosis, apoptosis tardía, células normales y apoptosis temprana. b) Se muestra una gráfica con los datos de apoptosis temprana,

apoptosis tardía y necrosis. Se utilizó comparación múltiple one-wat ANOVA con Tukey post-test. Las barras representan la desviación estándar y media de tres experimentos independientes ($p < 0.05$). Se muestra la significancia: *= 0.0261 a 882 and 0.0128 a 1102.5 J/m^2 en apoptosis temprana.

3.1.4 Apoptosis de Células CaLo Irradiadas con UVB

Las células fueron IR con diferentes dosis de UVB (0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m^2) a las 24 horas post cultivo con 2×10^5 células por caja p60. A las 72 horas post IR las células fueron teñidas con Anexina V y IP para el análisis de apoptosis por citometría de flujo. Los datos obtenidos de cuatro ensayos independientes muestran que las células son inducidas a apoptosis a partir de 882 J/m^2 (sumatoria de apoptosis temprana y tardía) alcanzando porcentajes de 3.25, 3.46, 5.73, 15.66, 35.79, 65.63 con las dosis de 0, 220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m^2 respectivamente. El análisis estadístico por ANOVA arroja cambios significativos con 882 y 1102 J/m^2 de UVB. Figura 42a y 42b.

a)



b)

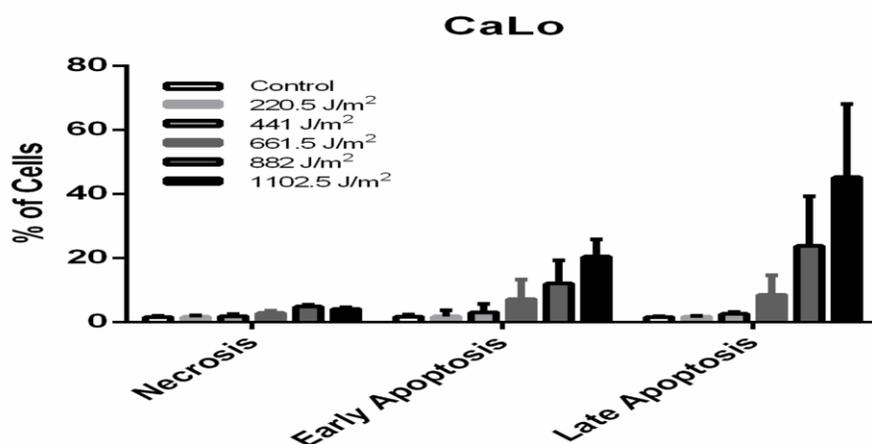


Figura 42. Apoptosis inducida por UVB en células CaLo. a) Se analizó la apoptosis y necrosis por citometría de flujo. De izquierda a derecha y de arriba abajo se muestran los histogramas con cada estímulo de UVB (220.5, 441, 661.5, 882 y 1102.5 J/m²). El efecto fue comparado con el efecto en células no IR. Cada histograma muestra los cuadrantes de izquierda a derecha y arriba abajo siguientes: necrosis, apoptosis tardía, células normales y apoptosis temprana. b) Se muestra una gráfica con los datos de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis. Se utilizó comparación múltiple one-wat ANOVA con Tukey post-test. Las barras representan la desviación estándar y media de tres experimentos independientes ($p < 0.05$). Se muestra la significancia: $** = 0.0058$ a 882 y 0.0046 a 1102.5 J/m² en apoptosis tardía.

A partir de los ensayos de apoptosis en las diferentes líneas celulares se puede inferir que las líneas tumorigénicas en inmortales estudiadas son susceptibles a la UVB de 882 y 1102.5 J/m². Sin embargo, se puede apreciar que cada línea celular tiene una susceptibilidad distinta a UVB. Las células C-33A presentaron un efecto nulo en necrosis mientras que se registró un incremento en apoptosis temprana ($p < 0.0143$ y 0.0048) y tardía ($p < 0.0003$ y 0.0001) a partir de dosis bajas de UVB. Por otro lado, las células HaCaT no experimentaron necrosis mientras que la apoptosis tardía fue incrementada a partir de 882 J/m² ($p < 0.0003$ y 0.0001). Interesantemente, en células CaLo, se registró un incremento en necrosis y apoptosis a 882 y 1102.5 J/m² ($p < 0.0058$ y 0.0046), mientras que en células

SiHa se observó apoptosis tardía a partir de 882 J/m^2 ($p < 0.0261$ y 0.0128), y no se observaron células en apoptosis tardía o necrosis. Es importante hacer notar que las células SiHa muestran cierta resistencia a UVB en contraste a las otras células tumorigénicas, inmortal y línea celular HPV18. Este efecto es probablemente debido a la presencia del VPH 16 y otras proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis.

4. Evaluación de la expresión de proteínas en respuesta a UVB

4.1 P53, E2F y Proteínas del Sistema de Microtúbulos son Reguladas en Células SiHa Tratadas con UVB

Previamente, se mostró que la UVB conduce a células SiHa a inhibición de proliferación celular, detención del ciclo celular y apoptosis de manera dosis-dependiente. Estos procesos celulares son convencionalmente regulados por varias proteínas como p53 y E2F1; por lo tanto, se evaluó la regulación de estas proteínas en respuesta a UVB. Adicionalmente, se analizó la expresión de varias proteínas relacionadas al sistema de microtúbulos que no han sido estudiadas previamente en el contexto de esta línea celular y en estas condiciones de exposición a UVB por medio de inmunodetección en fase sólida (Western-Blotting).

De acuerdo con la inducción de apoptosis, se observó un incremento en la expresión de p53 a partir de 881 J/m^2 (figura 43a). Interesantemente, la expresión de E2F1 disminuyó a partir de 661.5 J/m^2 y acentuándose hasta 1102.5 J/m^2 (figura 43b), sugiriendo regulación del ciclo celular dependiente de E2F1 e independiente de p53 a dosis bajas de UVB. Por otra parte, la expresión de la proteína MAP1S incrementó considerablemente a dosis más altas de UVB, siendo significativo a la dosis de 1102.5 J/m^2 , mientras que la expresión de la proteína MAP2 mostró un patrón de expresión dual- a 441 J/m^2 se mostró que la proteína incrementó, mientras que se observó una disminución considerable a 661.5 y continuo el descenso hasta 1102.5 J/m^2 (figuras 43c y 43d respectivamente). La sobreexpresión de γ -tubulina ha sido observada previamente en diferentes tipos de cáncer; sin embargo, en el presente trabajo, la expresión de γ -tubulina en las condiciones estudiadas se mostró incrementada a partir de 882 J/m^2 (figura 43e). Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo, probablemente indicando que la regulación de γ -tubulina no es determinante para los procesos celulares regulados por UVB. Con respecto a las otras

tubulinas, la expresión de α -Tubulina3C disminuyó a la dosis de 1102.5 J/m² (figura 43f), mientras que la expresión de β -Tubulina mostró un patrón de expresión dual: a 661.5 J/m², la expresión incrementó considerablemente, mientras que la proteína disminuyó drásticamente a 1102.5 J/m² (43g), sugiriendo que β -Tubulina participa diferencialmente en la regulación de los procesos celulares bajo distintos niveles de daño a ADN. Con estos resultados, se puede especular que las proteínas E2F1 y MAP2 son reguladas bajo dosis bajas de UVB y por lo tanto, menor daño a ADN; mientras que el resto de las proteínas analizadas son reguladas bajo condiciones de estrés más severas y son probablemente consecuencia de varios sistemas activados por la exposición a radiación UVB.

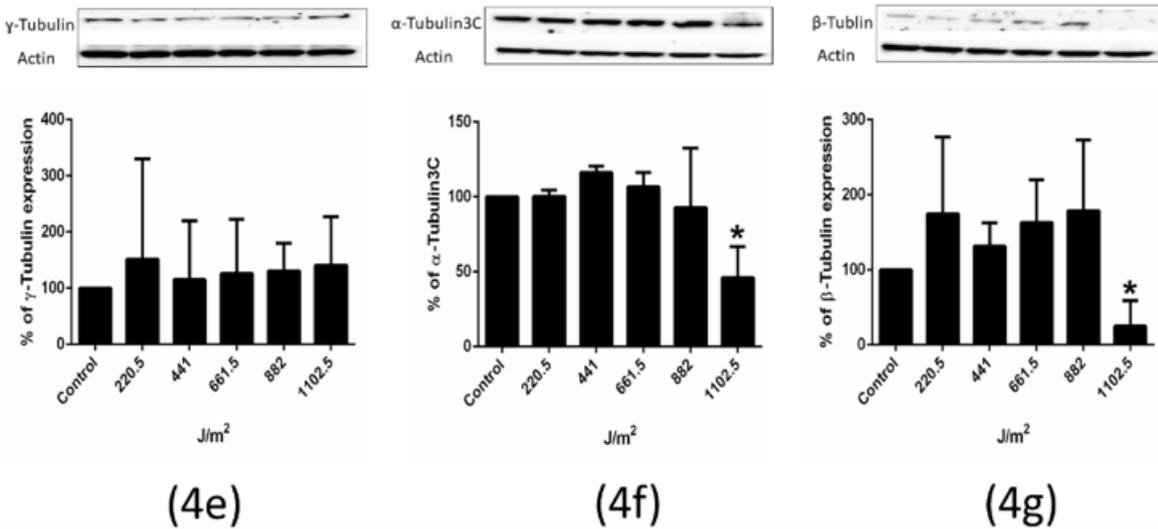
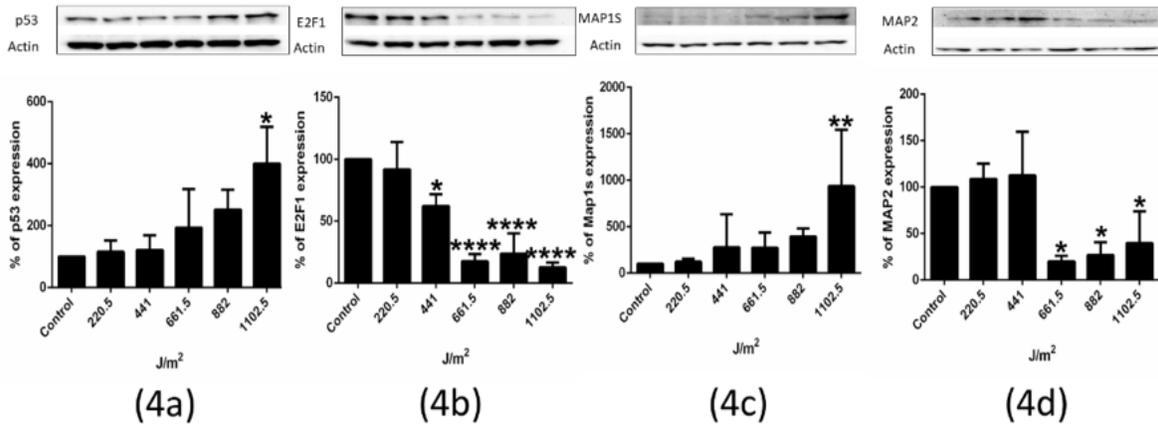


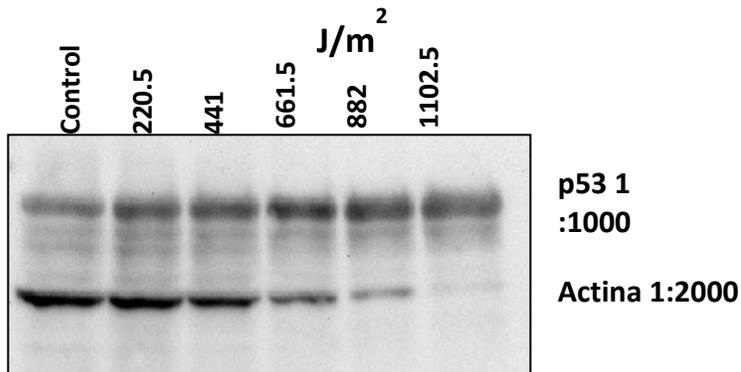
Figura 43. Regulación de la expresión p53, E2F1 y proteínas del sistema de microtúbulos en respuesta a UVB. Las células fueron cultivadas 200,000 células en caja p100 y expuestas a dosis crecientes de UVB y se analizó la expresión de las proteínas a las 72 horas post-incubación en condiciones libres de UVB. El efecto se comparó con células no IR con UVB. a) Expresión de p53 (1102.5 J/m^2 * $p < 0.0332$); b) Expresión de E2F1 (661.5 J/m^2 * $p < 0.0374$), 882 J/m^2 *($p < 0.0473$) and 1102.5 J/m^2 ** ($p < 0.0031$); c) Expresión de MAP1s (1102.5 J/m^2 * $p < 0.0094$); d) Expresión de MAP2 ($r = -0.6754$ and $p < 0.0021$); e) Expresión de γ -Tubulina ($r = -0.7674$, $p < 0.0002$); f) Expresión de $\alpha 3\text{C}$ -Tubulina ($r = -0.4932$, $p < 0.0375$); g) Expresión de β -Tubulina ($r = -0.506$, $p < 0.0322$). El análisis de las proteínas se realizó con Kruskal-Wallis test de cinco experimentos independientes.

4.2 La Expresión de las Proteína p53, E2F1, α -, β -, y δ -Tubulinas es regulada de manera dosis dependiente de UVB en línea celular C-33A

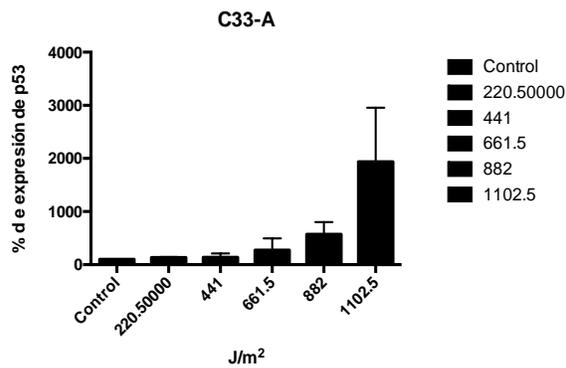
Adicionalmente se inició la evaluación de la expresión de la proteína p53 en las células C-33A IR con UVB. Esta línea celular se caracteriza por su inmortalidad y ausencia del VPH, por lo que la expresión de p53 no se encuentra regulada por proteínas ajenas al fondo genético de la célula. Las figuras 44a y 44b, muestran que la expresión de p53 aumenta considerablemente en células irradiadas con 881 y 1102.5 J/m^2 a diferencia de la expresión en dosis más bajas y no irradiadas. La expresión de p53 empieza a aumentar un $\sim 30\%$ a partir de 220.5 J/m^2 , seguido por 37 , 173 y 472% a los 441 , 661.5 , 882 , mientras que aumenta ~ 18 veces con respecto al control con la dosis de 1102.5 J/m^2 . Este rápido aumento en la expresión de p53 correlaciona fuertemente con la pronta inducción de arresto y ciclo celular observada en estas células en los estudios de procesos celulares. La expresión de p53 convencionalmente, viene acompañada de dtención del ciclo celular y/o apoptosis, por lo que la expresión de factores transcripcionales de proliferación se encuentra inhibidos. Con la finalidad de evaluar el mecanismo por el cual las células están llevando a cabo los procesos anteriormente estudiados, se determinó la expresión de la proteína E2F, un factor transcripcional que es inhibido en respuesta a la regulación mediada por p53. La figura 44c muestra que la expresión de E2F1 disminuye a partir de 220.5 J/m^2 y

continúa disminuyendo a mayores dosis, hasta ser casi imperceptible a los 1102.5 J/m² de UVB en células C33-A. Sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales para confirmar esta observación. Figura 44d.

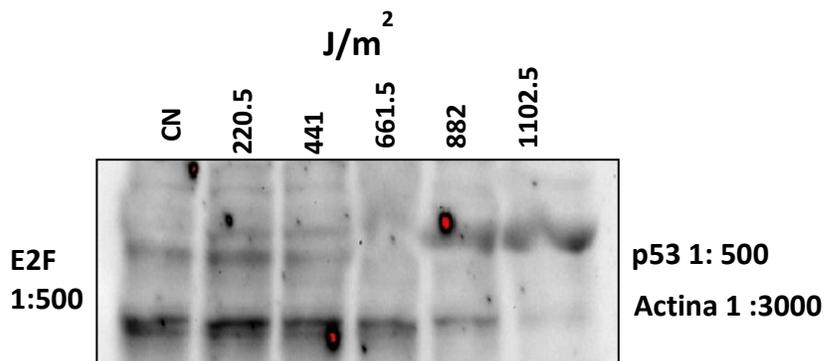
a)



b)



c)



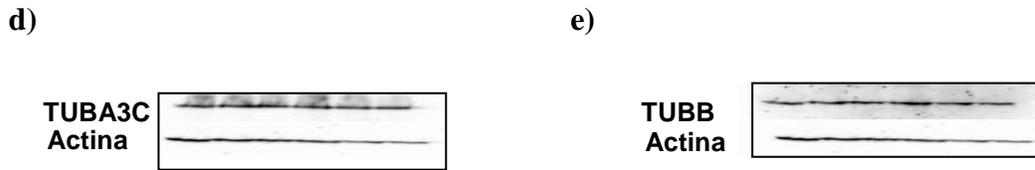


Figura 44. Expresión de p53, E2F1 y α - y β -Tubulinas es regulada en células C-33A irradiadas con dosis crecientes de UVB. a) Inmunodetección en fase sólida de p53 y de actina como control de carga. b) Representación gráfica de la expresión de p53 de dos ensayos independientes; c) Inmunodetección en fase sólida de E2F1 y de actina como control de carga; d) Inmunodetección en fase sólida de α -Tubulina y de actina como control de carga; e) Inmunodetección en fase sólida de β -Tubulina y de actina como control de carga.

4.3 Expresión de la proteína p53 en línea celular CaLo

Los procesos celulares de proliferación, ciclo celular y apoptosis fueron reguladas en células CaLo IR con UVB, por lo tanto, se estudió la expresión de la proteína p53 cuya expresión se encuentra generalmente involucrada con los procesos celulares mencionados. El ensayo de inmunodetección en fase sólida mostró que a mayores dosis de UVB la expresión de p53 aumenta, sugiriendo su participación en la regulación de los procesos celulares; sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales para confirmar esta observación, figura 45a). El análisis de la expresión de δ -Tubulina en esta línea celular sugiere que su participación no es requerida en los procesos celulares estudiados, sin embargo, esta observación requiere de experimentos adicionales para confirmar esta observación, lo cual será objeto de estudio de un trabajo ligado a este proyecto. Figura 45b.

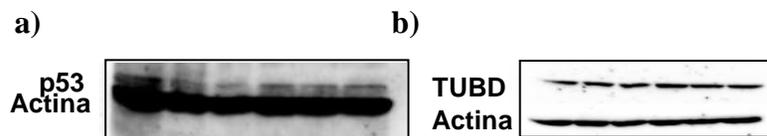


Figura 45. Expresión de p53 y δ -Tubulina en células CaLo irradiadas con dosis crecientes de UVB. a) Inmunodetección en fase sólida de p53 y de actina como control de carga. b) Inmunodetección en fase sólida de p53 y de actina como control de carga. Las células fueron cultivadas e IR en las condiciones que se indican en la sección de materiales y métodos.

CAPÍTULO 5

5. DISCUSIÓN

La radiación UV ha sido dividida en tres tipos de radiación basadas en su longitud de onda llamadas UVA, UVB, and UVC y son esenciales para la vida humana. De estos tipos la radiación UVB tiene actividades importantes en la fisiología humana [134, 135]. Tanto el tiempo como una exposición irradiación prolongada puede conducir al desarrollo de diversos carcinomas así como a su prevención [136]. En este efecto dual de la radiación UVB nuestro grupo de trabajo exploró su efecto sobre células inmortales y tumorigénicas VPH positivas y negativas. La letalidad de la radiación a UVB en diferentes tipos celulares es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición [116, 117]. Se sabe que p53 responde a la irradiación de UVB [121] como nosotros confirmamos en nuestro trabajo. De manera interesante, las células usadas en este trabajo tienen a p53 mutado o presentan una disminución de su expresión vía de la oncoproteína E6 de VPH. Las células C33A tienen una mutación en el codón 273 que conduce a un cambio de una arginina por una cisteína [137] mientras que las células HaCaT tienen por lo menos 3 mutaciones en los codones 179, 281 y 282 produciendo un cambio de histidina por tirosina, asparagina por arginina y asparagina por triptófano, respectivamente [138] [41]. Por otro lado, las células CaLo expresan la oncoproteína E6 de VPH18 [139] mientras que las células SiHa expresan la oncoproteína E6 de VPH16 [43]. En nuestro trabajo observamos un efecto independiente del contenido de VPH y del fenotipo tumorigénico. Encontramos que las células SiHa resisten más la irradiación con UVB por lo tanto exploramos la expresión proteica de p53 por ser conocido como una proteína que responde a UV, de E2F1 que es un regulador del ciclo

celular y de proteínas del sistema de MT. En los ensayos de expresión de proteínas encontramos que p53 y MAP1S a 882 J/m^2 mientras que MAP2 y E2F1, decrecienta a partir de 441.5 J/m^2 . α -Tubulina y β -Tubulina presentan una disminución hasta 1102.5 J/m^2 . Se ha reportado que el tratamiento con UVB inhibe la proliferación, ciclo celular y la apoptosis que en parte se debe a la activación de p53 a través de la inducción transcripcional de p21, GADD45 and BAX [121] por lo que el efecto independiente de p53 no se debe descartar [117]. Se ha reportado que E2F1 es un factor transcripcional que está involucrado en la respuesta a radiación [129]. La expresión de E2F1 promueve la transición de la fase G1 a S en células quiescentes para inducir su proliferación [130, 131]. Adicionalmente, E2F1 presenta un efecto dual en apoptosis. Los genes que regula directamente para promover la apoptosis son múltiples miembros de la familia de las caspasas, Apaf1, p73, PKR, Mc11, ATM, NBS1 and Chk2 [129, 140-144] mientras que C/EBP α , Cdc2, Ciclina A, Ciclina B, Ciclina E entre otros, son inducidos en [145]. Sin embargo, en respuesta a UVB se ha mostrado que E2F1 incrementa su expresión a tiempos cortos de exposición de UV [132]. No obstante, en nuestro trabajo la expresión de E2F1 disminuyó probablemente atribuido a la expresión de p53 en células SiHa que tienen p53 silvestre como ha sido demostrado previamente [146]. La interacción entre p53 y E2F1 puede explicar algunos efectos en las células tratadas con UVB. Sin embargo, se debe remarcar que otras proteínas o RNAs pueden ser relevantes en la exposición a UVB y pueden ser complementarios unos con otros. En este sentido se ha reportado que el centrosoma y la proteína γ -Tubulina que regula la formación de los MT interactúa con los promotores blanco de E2F1 y regula su actividad transcripcional controlando el ciclo celular. γ -Tubulina interactúa con E2F1 en la transición de G1 a S.

Por lo tanto, la actividad transcripcional de E2F es alterada por la expresión reducida de γ -Tubulina. El C-terminal de γ -Tubulina codifica para un dominio de unión a DNA que interactúa con los promotores regulados por E2F resultando en la actividad transitoria mediada por γ -Tubulina [147]. En nuestro trabajo nosotros observamos que la expresión de γ -Tubulina presenta un ligero incremento sugiriendo que probablemente podría interactuar con E2F1. No obstante, debe notarse que E2F1 está disminuido probablemente vía pRB como fue demostrado por Ehlén et al 2012 [31]. De manera interesante, en nuestro estudio la expresión de γ -Tubulina está acompañada con un incremento y decremento a dosis

bajas y altas de UVB de β -Tubulina mientras que la expresión de α -Tubulina 3C está disminuida a la mayor dosis de UVB. Parece que la expresión de β -Tubulina y α -Tubulina 3C está alterada en respuesta a diferentes vías de señalización asociadas a la programación de la expresión de genes por UVB. Se ha reportado que MAP1S estabiliza los MT y está implicado en la formación del uso mitótico [108]. MAP1S está presente en el uso mitótico durante la mitosis y se acumula reversiblemente durante el arresto mitótico [106] y formación [108]. Nosotros observamos, que MAP1S responde a dosis altas del tratamiento con UVB en células SiHa sugiriendo su posible implicación en la apoptosis vía la regulación de la mitocondria [109] y/o inhibición de la proliferación vía arresto mitótico [108]. Otra proteína que interactúa con los MT y responde bien a la irradiación con UVB es MAP2. La expresión de

MAP2 ha sido correlacionada con la movilidad celular e invasión in células epiteliales de cáncer oral [148]. En este estudio, nosotros reportamos que MAP2 se expresa en células de cérvix y que su expresión disminuye con la irradiación de UVB en células SiHa. Aunque la participación de MAP2 en la motilidad celular no es clara todavía puede servir como elementos estructurales mediante el establecimiento de características morfológicas y rearrreglos específicos de los MT [149]. Las funciones esenciales de los MT incluyen segregación cromosomal y posicionamiento durante la mitosis en el núcleo. Defectos en estas funciones pueden conducir a la inhibición de la proliferación celular y a la muerte de células tumorales [36]. Por lo tanto, la inhibición de la proliferación celular, arresto en la fase S y G2-M y la inducción de la apoptosis puede ser consecuencia de la desregulación de la formación de los MT producida por las MAPs.

En conclusión, los datos presentes en este estudio proveen evidencia de la respuesta al tratamiento con UVB en la proliferación celular, arresto en la fase S y G2-M y la inducción de la apoptosis en células SiHa. Adicionalmente, la regulación de E2F1 y MAP2 sugiere que pueden ser blancos moleculares para UVB como la primera línea de respuesta que puede ser usada para monitorear proteínas alteradas in estrés genotóxico. Se necesitan experimentos adicionales para dilucidar las vías de señalización que conducen a un perfil proteico de expresión en células de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, el efecto tan fuerte que tiene la radiación UVB en las células SiHa representa el primer paso para la identificación de un importante blanco como terapia, diagnóstico y pronóstico de la

progresión del cáncer cervical tanto para tratamiento como en la exposición a altos niveles de radiación.

La regulación de E2F1 y MAP2 puede ser propuestos como blancos moleculares de respuesta temprana y pueden ser usados para monitorear estrés genotóxico y/o como blancos moleculares en cáncer. Por otro lado, MAP1S, p53 y las tubulinas son proteínas de respuesta tardía a la irradiación con UVB.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES

Las células inmortales HaCaT VPH negative son más resistentes a la irradiación por UVB que las células tumorigénicas C-33a negativas y las células tumorigénicas CaLo VPH 18 positivas en procesos celulares asociados con la progresión incluyendo proliferación, ciclo celular y apoptosis sugiriendo que el estatus tumorigénico puede favorecer la muerte celular inducida por UVB. Cabe mencionar, que las células tumorigénicas SiHa VPH 16 positivas son más resistentes a la radiación UVB que las células HaCaT probablemente porque contiene VPH16 que puede modificar la señalización celular y expresión génica.

El uso de UVB como posible tratamiento puede ser selectivo para infecciones con VPH18 positivas, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para elucidar su posible aplicación en tratamientos relacionados a enfermedades causadas por VPH.

De manera interesante en células SiHa la expresión de p53 conocida como proteína de respuesta a UV mostró una respuesta tardía ante el tratamiento con UVB comparada con la expresión de E2F1 una proteína reguladora del ciclo celular probablemente la expresión de la oncoproteína E6 que regula negativamente a p53 y E7 que regula positivamente a E2F1 o puede deberse a otras vías de señalización independientes de p53 en proliferación, ciclo celular y/o apoptosis. Las proteínas del sistema de MT también presentan respuestas diferentes dependientes de la dosis de UVB. Por un lado, la expresión de MAP1S incrementa hasta 882 J/m² mientras que MAP2 presenta una expresión dual ya que a bajas dosis su incrementa y a altas dosis disminuye su expresión.

La expresión de α - y β -Tubulina se disminuida a la última dosis de UVB mientras que γ -Tubulina permanece constante. En conjunto nuestros resultados sugieren que E2F1 y MAP2 son proteínas de respuesta temprana a UVB mientras que p53 y MAP1S son proteínas de respuesta media a UVB y finalmente α -Tubulina y β -Tubulina son proteínas de respuesta tardía a UVB. Este estudio agrega conocimiento nuevo de la especificidad de UVB en procesos celulares de cáncer cervical en líneas con contenido diferente de VPH y estatus tumorigénico, resaltando algunas proteínas involucradas en dichos efectos para validarse como una posible aplicación de tratamiento con UVB en pacientes con cáncer cervical con VPH específico.

CAPITULO 7

7. REFERENCIAS

- [1] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, F. Bray, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *Int J Cancer*, 144 (2019) 1941-1953.
- [2] M. Teran-Hernandez, R. Ramis-Prieto, J. Calderon-Hernandez, C.F. Garrocho-Rangel, J. Campos-Alanis, J.A. Avalos-Lozano, M. Aguilar-Robledo, Geographic variations in cervical cancer risk in San Luis Potosi state, Mexico: A spatial statistical approach, *Int J Equity Health*, 15 (2016) 161.
- [3] E. Lazcano-Ponce, L.S. Palacio-Mejia, B. Allen-Leigh, E. Yunes-Diaz, P. Alonso, R. Schiavon, M. Hernandez-Avila, Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17 (2008) 2808-2817.
- [4] A. Gadducci, R. Tana, S. Cosio, L. Cionini, Treatment options in recurrent cervical cancer (Review), *Oncol Lett*, 1 (2010) 3-11.
- [5] S.E. Rudolph, A. Lorincz, C.M. Wheeler, P. Gravitt, E. Lazcano-Ponce, L. Torres-Ibarra, L. Leon-Maldonado, P. Ramirez, B. Rivera, R. Hernandez, E.L. Franco, J. Cuzick, P. Mendez-Hernandez, J. Salmeron, F.S. Group, Population-based prevalence of cervical infection with human papillomavirus genotypes 16 and 18 and other high risk types in Tlaxcala, Mexico, *BMC Infect Dis*, 16 (2016) 461.
- [6] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Munoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol*, 189 (1999) 12-19.
- [7] S. de Sanjose, W.G. Quint, L. Alemany, D.T. Geraets, J.E. Klaustermeier, B. Lloveras, S. Tous, A. Felix, L.E. Bravo, H.R. Shin, C.S. Vallejos, P.A. de Ruiz, M.A. Lima, N. Guimera, O. Clavero, M. Alejo, A. Llombart-Bosch, C. Cheng-Yang, S.A. Tatti, E. Kasamatsu, E. Iljazovic, M. Odida, R. Prado, M. Seoud, M. Grce, A. Usubutun, A. Jain, G.A. Suarez, L.E. Lombardi, A. Banjo, C.

- Menendez, E.J. Domingo, J. Velasco, A. Nessa, S.C. Chichareon, Y.L. Qiao, E. Lerma, S.M. Garland, T. Sasagawa, A. Ferrera, D. Hammouda, L. Mariani, A. Pelayo, I. Steiner, E. Oliva, C.J. Meijer, W.F. Al-Jassar, E. Cruz, T.C. Wright, A. Puras, C.L. Llave, M. Tzardi, T. Agorastos, V. Garcia-Barriola, C. Clavel, J. Ordi, M. Andujar, X. Castellsague, G.I. Sanchez, A.M. Nowakowski, J. Bornstein, N. Munoz, F.X. Bosch, S. Retrospective International, H.P.V.T.T.S. Group, Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study, *Lancet Oncol*, 11 (2010) 1048-1056.
- [8] A.A. McBride, A. Warburton, The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers, *PLoS Pathog*, 13 (2017) e1006211.
- [9] Y. Liu, Z. Lu, R. Xu, Y. Ke, Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology, *Oncotarget*, 7 (2016) 5852-5864.
- [10] K. Munger, A. Baldwin, K.M. Edwards, H. Hayakawa, C.L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, K. Huh, Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J Virol*, 78 (2004) 11451-11460.
- [11] C. Borrás, M.C. Gomez-Cabrera, J. Vina, The dual role of p53: DNA protection and antioxidant, *Free Radic Res*, 45 (2011) 643-652.
- [12] D.H. Kim, Y.G. Roh, H.H. Lee, S.Y. Lee, S.I. Kim, B.J. Lee, S.H. Leem, The E2F1 oncogene transcriptionally regulates NELL2 in cancer cells, *DNA Cell Biol*, 32 (2013) 517-523.
- [13] A. El-Sharkawy, A. Malki, Vitamin D Signaling in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications, *Molecules*, 25 (2020).
- [14] M. Norval, S. Howie, J. Ross, J. Maingay, The effect of UV-irradiation on viral infections of the skin, *Microbiol Sci*, 3 (1986) 220-223.
- [15] L.A. Sitailo, S.S. Tibudan, M.F. Denning, Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C delta catalytic domain, *J Invest Dermatol*, 123 (2004) 434-443.
- [16] W.B. Grant, C.F. Garland, The association of solar ultraviolet B (UVB) with reducing risk of cancer: multifactorial ecologic analysis of geographic variation in age-adjusted cancer mortality rates, *Anticancer Res*, 26 (2006) 2687-2699.
- [17] W. Chen, B.K. Armstrong, B. Rahman, R. Zheng, S. Zhang, M. Clements, Relationship between cancer survival and ambient ultraviolet B irradiance in China, *Cancer Causes Control*, 24 (2013) 1323-1330.
- [18] W. Chen, M. Clements, B. Rahman, S. Zhang, Y. Qiao, B.K. Armstrong, Relationship between cancer mortality/incidence and ambient ultraviolet B irradiance in China, *Cancer Causes Control*, 21 (2010) 1701-1709.
- [19] W.B. Grant, C.F. Garland, Vitamin D has a greater impact on cancer mortality rates than on cancer incidence rates, *BMJ*, 348 (2014) g2862.
- [20] W.B. Grant, Solar ultraviolet irradiance and cancer incidence and mortality, *Adv Exp Med Biol*, 810 (2014) 52-68.
- [21] S. Adams, J. Lin, D. Brown, C.D. Shriver, K. Zhu, Ultraviolet Radiation Exposure and the Incidence of Oral, Pharyngeal and Cervical Cancer and Melanoma: An Analysis of the SEER Data, *Anticancer Res*, 36 (2016) 233-237.
- [22] D.E. Godar, R. Tang, S.J. Merrill, Pharyngeal and cervical cancer incidences significantly correlate with personal UV doses among whites in the United States, *Anticancer Res*, 34 (2014) 4993-4999.
- [23] A.B. Fleischer, Jr., S.E. Fleischer, Solar radiation and the incidence and mortality of leading invasive cancers in the United States, *Dermatoendocrinol*, 8 (2016) e1162366.
- [24] B. Akgul, N. Bostanci, K. Westphal, I. Nindl, H. Navsaria, A. Storey, H. Pfister, Human papillomavirus 5 and 8 E6 downregulate interleukin-8 secretion in primary human keratinocytes, *J Gen Virol*, 91 (2010) 888-892.

- [25] S. Mouret, A. Favier, J.C. Beani, M.T. Leccia, Differential p53-mediated responses to solar-simulated radiation in human papillomavirus type 16-infected keratinocytes, *Exp Dermatol*, 16 (2007) 476-484.
- [26] W.T. Lee, S.H. Lee, S.G. Carriedo, R.G. Giffard, Y.J. Yoon, J.H. Kim, K.A. Park, J.E. Lee, UV-vulnerability of human papilloma virus type-16 E7-expressing astrocytes is associated with mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation, *Mol Cells*, 14 (2002) 288-294.
- [27] X. Zeng, D. Keller, L. Wu, H. Lu, UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription, *Cancer Res*, 60 (2000) 6184-6188.
- [28] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144 (2011) 646-674.
- [29] T.W. Hendrickson, J. Yao, S. Bhadury, A.H. Corbett, H.C. Joshi, Conditional mutations in gamma-tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis, *Mol Biol Cell*, 12 (2001) 2469-2481.
- [30] J. Jochova, Z. Zakeri, R.A. Lockshin, Rearrangement of the tubulin and actin cytoskeleton during programmed cell death in *Drosophila* salivary glands, *Cell Death Differ*, 4 (1997) 140-149.
- [31] A. Ehlen, C.A. Rossello, K. von Stedingk, G. Hoog, E. Nilsson, H.M. Pettersson, K. Jirstrom, M. Alvarado-Kristensson, Tumors with nonfunctional retinoblastoma protein are killed by reduced gamma-tubulin levels, *J Biol Chem*, 287 (2012) 17241-17247.
- [32] A. Dallol, W.N. Cooper, F. Al-Mulla, A. Agathangelou, E.R. Maher, F. Latif, Depletion of the Ras association domain family 1, isoform A-associated novel microtubule-associated protein, C19ORF5/MAP1S, causes mitotic abnormalities, *Cancer Res*, 67 (2007) 492-500.
- [33] L. Liu, A. Vo, G. Liu, W.L. McKeegan, Distinct structural domains within C19ORF5 support association with stabilized microtubules and mitochondrial aggregation and genome destruction, *Cancer Res*, 65 (2005) 4191-4201.
- [34] K.M. Bhat, N. Maddodi, C. Shashikant, V. Setaluri, Transcriptional regulation of human MAP2 gene in melanoma: role of neuronal bHLH factors and Notch1 signaling, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) 3819-3832.
- [35] S.Y. Liu, Y.T. Chen, M.Y. Tseng, C.C. Hung, W.F. Chiang, H.R. Chen, T.Y. Shieh, C.H. Chen, Y.S. Jou, J.Y. Chen, Involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in oral cancer cell motility: a novel biological function of MAP2 in non-neuronal cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 366 (2008) 520-525.
- [36] M.A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat Rev Cancer*, 4 (2004) 253-265.
- [37] R. Paduch, Theories of cancer origin, *Eur J Cancer Prev*, 24 (2015) 57-67.
- [38] B.D. Preston, T.M. Albertson, A.J. Herr, DNA replication fidelity and cancer, *Semin Cancer Biol*, 20 (2010) 281-293.
- [39] J.K. Oh, E. Weiderpass, Infection and cancer: global distribution and burden of diseases, *Ann Glob Health*, 80 (2014) 384-392.
- [40] K. Chen, J. Huang, W. Gong, P. Iribarren, N.M. Dunlop, J.M. Wang, Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer, *Int Immunopharmacol*, 7 (2007) 1271-1285.
- [41] K.Z. Guyton, I. Rusyn, W.A. Chiu, D.E. Corpet, M. van den Berg, M.K. Ross, D.C. Christiani, F.A. Beland, M.T. Smith, Application of the key characteristics of carcinogens in cancer hazard identification, *Carcinogenesis*, 39 (2018) 614-622.
- [42] I. Madani, W. De Neve, M. Mareel, Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis?, *Bull Cancer*, 95 (2008) 292-300.
- [43] K. Hemminki, P. Vaittinen, C. Dong, D. Easton, Sibling risks in cancer: clues to recessive or X-linked genes?, *Br J Cancer*, 84 (2001) 388-391.
- [44] M. Havas, When theory and observation collide: Can non-ionizing radiation cause cancer?, *Environ Pollut*, 221 (2017) 501-505.

- [45] D.A. Sabbah, R. Hajjo, K. Sweidan, Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors, *Curr Top Med Chem*, 20 (2020) 815-834.
- [46] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic pathology*, 35 (2007) 495-516.
- [47] N. Maishi, K. Hida, Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis, *Cancer Science*, n/a-n/a.
- [48] D. Hanahan, J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, 86 (1996) 353-364.
- [49] R.J. DeBerardinis, J.J. Lum, G. Hatzivassiliou, C.B. Thompson, The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation, *Cell Metab*, 7 (2008) 11-20.
- [50] R.G. Jones, C.B. Thompson, Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth, *Genes Dev*, 23 (2009) 537-548.
- [51] G.L. Semenza, HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism, *Curr Opin Genet Dev*, 20 (2010) 51-56.
- [52] G.L. Semenza, Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene*, 29 (2010) 625-634.
- [53] Y. Tamura, A. Teng, R. Nozawa, Y. Takamoto-Matsui, Y. Ishii, Characterization of the immature dendritic cells and cytotoxic cells both expanded after activation of invariant NKT cells with alpha-galactosylceramide in vivo, *Biochem Biophys Res Commun*, 369 (2008) 485-492.
- [54] D. Mougiakakos, A. Choudhury, A. Lladser, R. Kiessling, C.C. Johansson, Regulatory T cells in cancer, *Adv Cancer Res*, 107 (2010) 57-117.
- [55] R.H. Lynette Denny, Carol Levin, and Jane J Kim, *Cervical Cancer*, Cancer: Disease Control Priorities, Place Published, 2015.
- [56] J.A. López, A.J.G. López, MiRNAs in Cervical Cancer Radio- and Chemotherapy Response, in: R. Rajkumar (Ed.) *Colposcopy and Cervical Pathology*, InTech, Place Published, 2017, pp. 85-105.
- [57] A.C.R. Ana Rita Ferreira, Mariana Marques, Daniela Ribeiro The Interplay between Antiviral Signalling and Carcinogenesis in Human Papillomavirus Infections, *Cancers (Basel)*, 12 (2020) 646.
- [58] P. Naga Ch, L. Gurram, S. Chopra, U. Mahantshetty, The management of locally advanced cervical cancer, *Curr Opin Oncol*, 30 (2018) 323-329.
- [59] Y. Zhang, B. Li, Y. Wang, S. Liu, H. Wang, Paclitaxel Plus Platinum Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Surgery Versus Primary Surgery in Locally Advanced Cervical Cancer-A Propensity Score Matching Analysis, *Front Oncol*, 10 (2020) 604308.
- [60] S. Chopra, M. Gupta, A. Mathew, U. Mahantshetty, R. Engineer, G. Lavanya, S. Gupta, J. Ghosh, M. Thakur, K. Deodhar, S. Menon, B. Rekhi, J. Bajpai, S. Gulia, A. Maheshwari, R. Kerkar, T.S. Shylasree, S.K. Shrivastava, Locally advanced cervical cancer: A study of 5-year outcomes, *Indian J Cancer*, 55 (2018) 45-49.
- [61] R.R. Allison, The electromagnetic spectrum: current and future applications in oncology, *Future Oncol*, 9 (2013) 657-667.
- [62] R.S. Parul Parihar, Samiksha Singh, MPVVB Singh, Vijay Pratap Singh, Sheo Mohan Prasad, Ultraviolet Radiation Targets in the Cellular System, in: S.S. Vijay Pratap Singh, Sheo Mohan Prasad, Parul Parihar (Ed.) *UV- B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth*, Wiley Online, Place Published, 2011.
- [63] D. Kulms, E. Zeise, B. Poppelmann, T. Schwarz, DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way, *Oncogene*, 21 (2002) 5844-5851.
- [64] N. Chatterjee, G.C. Walker, Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ Mol Mutagen*, 58 (2017) 235-263.

- [65] R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, E.W. Breitbart, K.O. Greulich, M.C. Cardoso, A. Rapp, UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages, *Nucleic Acids Res*, 40 (2012) 10263-10273.
- [66] T.R. Dunkern, G. Fritz, B. Kaina, Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation, *Oncogene*, 20 (2001) 6026-6038.
- [67] C. Rosette, M. Karin, Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors, *Science*, 274 (1996) 1194-1197.
- [68] Y. Aragane, D. Kulms, D. Metze, G. Wilkes, B. Poppelmann, T.A. Luger, T. Schwarz, Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L, *J Cell Biol*, 140 (1998) 171-182.
- [69] C.H. Lee, S.B. Wu, C.H. Hong, H.S. Yu, Y.H. Wei, Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy, *Int J Mol Sci*, 14 (2013) 6414-6435.
- [70] D.M. Milne, L.E. Campbell, D.G. Campbell, D.W. Meek, p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Jun kinase, JNK1, *J Biol Chem*, 270 (1995) 5511-5518.
- [71] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Place Published, 2010.
- [72] J.C. Gatlin, K. Bloom, Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance, *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier, 2010, pp. 248-254.
- [73] M. Moritz, D.A. Agard, γ -Tubulin complexes and microtubule nucleation, *Current opinion in structural biology*, 11 (2001) 174-181.
- [74] H.P. Erickson, γ -tubulin nucleation: template or protofilament?, *Nature cell biology*, 2 (2000) E93-E96.
- [75] J. Archer, F. Solomon, *the NlicrohrMrganizing Center*, (1994).
- [76] P. Chang, T. Stearns, δ -Tubulin and ϵ -tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function, *Nature* 2(2000) 30-35.
- [77] S.K. Dutcher, The tubulin fraternity: alpha to eta, *Current opinion in cell biology*, 13 (2001) 49-54.
- [78] P. Chang, T. Stearns, δ -Tubulin and ϵ -tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function, *Nature Cell Biology*, 2 (2000) 30-35.
- [79] P. Chang, T.H. Giddings, M. Winey, T. Stearns, ϵ -Tubulin is required for centriole duplication and microtubule organization, *Nature cell biology*, 5 (2003) 71-76.
- [80] T. Mitchison, M. Kirschner, Dynamic instability of microtubule growth, *nature*, 312 (1984) 237-242.
- [81] M. Bornens, M. Paintrand, J. Berges, M.C. Marty, E. Karsenti, Structural and chemical characterization of isolated centrosomes, *Cell motility and the cytoskeleton*, 8 (1987) 238-249.
- [82] R.F. Luduena, A hypothesis on the origin and evolution of tubulin, *Int Rev Cell Mol Biol*, 302 (2013) 41-185.
- [83] R.F. Luduena, Are tubulin isotypes functionally significant, *Mol Biol Cell*, 4 (1993) 445-457.
- [84] P. Verdier-Pinard, E. Pasquier, H. Xiao, B. Burd, C. Villard, D. Lafitte, L.M. Miller, R.H. Angeletti, S.B. Horwitz, D. Braguer, Tubulin proteomics: towards breaking the code, *Anal Biochem*, 384 (2009) 197-206.
- [85] K.F. Sullivan, D.W. Cleveland, Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (1986) 4327-4331.
- [86] C. Janke, The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions, *J Cell Biol*, 206 (2014) 461-472.

- [87] R.F. Luduena, Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications, *Int Rev Cytol*, 178 (1998) 207-275.
- [88] I.T. Yeh, R.F. Luduena, The betaII isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers, *Cell Motil Cytoskeleton*, 57 (2004) 96-106.
- [89] C. Walss-Bass, J.I. Kreisberg, R.F. Luduena, Effect of the antitumor drug vinblastine on nuclear betaII-tubulin in cultured rat kidney mesangial cells, *Invest New Drugs*, 21 (2003) 15-20.
- [90] M. Puurand, K. Tepp, N. Timohhina, J. Aid, I. Shevchuk, V. Chekulayev, T. Kaambre, Tubulin betaII and betaIII Isoforms as the Regulators of VDAC Channel Permeability in Health and Disease, *Cells*, 8 (2019).
- [91] P. Lebok, M. Ozturk, U. Heilenkotter, F. Jaenicke, V. Muller, P. Paluchowski, S. Geist, C. Wilke, E. Burandt, A. Lebeau, W. Wilczak, T. Krech, R. Simon, G. Sauter, A. Quaas, High levels of class III beta-tubulin expression are associated with aggressive tumor features in breast cancer, *Oncol Lett*, 11 (2016) 1987-1994.
- [92] E. Narvi, K. Jaakkola, S. Winsel, C. Oetken-Lindholm, P. Halonen, L. Kallio, M.J. Kallio, Altered TUBB3 expression contributes to the epothilone response of mitotic cells, *Br J Cancer*, 108 (2013) 82-90.
- [93] P. Chang, T. Stearns, Delta-tubulin and epsilon-tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function, *Nat Cell Biol*, 2 (2000) 30-35.
- [94] Y. Zheng, M.K. Jung, B.R. Oakley, Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome, *Cell*, 65 (1991) 817-823.
- [95] D.O.N. Wise, R. Krahe, B.R. Oakley, The γ -tubulin gene family in humans, *Genomics*, 67 (2000) 164-170.
- [96] C.-X. Deng, Roles of BRCA1 in centrosome duplication, *Oncogene*, 21 (2002) 6222-6227.
- [97] M. Moritz, M.B. Braunfeld, V. Guénebaud, J. Heuser, D.A. Agard, Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation, *Nature cell biology*, 2 (2000) 365-370.
- [98] K. Kawamura, H. Izumi, Z. Ma, R. Ikeda, M. Moriyama, T. Tanaka, T. Nojima, L.S. Levin, K. Fujikawa-Yamamoto, K. Suzuki, Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression, *Cancer research*, 64 (2004) 4800-4809.
- [99] B. Raynaud-Messina, A. Merdes, γ -tubulin complexes and microtubule organization, *Current opinion in cell biology*, 19 (2007) 24-30.
- [100] N.F. Maounis, E. Dráberová, E. Mahera, M. Chorti, V. Caracciolo, T. Sulimenko, D. Riga, N. Trakas, A. Emmanouilidou, A. Giordano, Overexpression of γ -tubulin in non-small cell lung cancer, *Histology and histopathology*, 27 (2012) 1183.
- [101] E. Dráberová, L. D'Agostino, V. Caracciolo, V. Sládková, T. Sulimenko, V. Sulimenko, M. Sobol, N.F. Maounis, E. Tzelepis, E. Mahera, Overexpression and Nucleolar Localization of γ -Tubulin Small Complex Proteins GCP2 and GCP3 in Glioblastoma, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 74 (2015) 723-742.
- [102] L. Dehmelt, S. Halpain, The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins, *Genome Biol*, 6 (2005) 204.
- [103] T.C. Gambelin, K. Nachmanoff, S. Halpain, R.C. Williams, Jr., Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules, *Biochemistry*, 35 (1996) 12576-12586.
- [104] B. Bjorkblom, N. Ostman, V. Hongisto, V. Komarovski, J.J. Filen, T.A. Nyman, T. Kallunki, M.J. Courtney, E.T. Coffey, Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector, *J Neurosci*, 25 (2005) 6350-6361.
- [105] K.L. Loveland, D. Herszfeld, B. Chu, E. Rames, E. Christy, L.J. Briggs, R. Shakri, D.M. de Kretser, D.A. Jans, Novel low molecular weight microtubule-associated protein-2 isoforms contain a functional nuclear localization sequence, *J Biol Chem*, 274 (1999) 19261-19268.

- [106] Y. Liu, C.D. Sturgis, D.M. Grzybicki, K.M. Jasnosz, P.R. Olson, M. Tong, D.D. Dabbs, S.S. Raab, J.F. Silverman, Microtubule-associated protein-2: a new sensitive and specific marker for pulmonary carcinoid tumor and small cell carcinoma, *Mod Pathol*, 14 (2001) 880-885.
- [107] I. Barbiero, R. De Rosa, C. Kilstrup-Nielsen, Microtubules: A Key to Understand and Correct Neuronal Defects in CDKL5 Deficiency Disorder?, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).
- [108] L. Malerod, R. Le Borgne, A. Lie-Jensen, A.H. Eikenes, A. Brech, K. Liestol, H. Stenmark, K. Haglund, Centrosomal ALIX regulates mitotic spindle orientation by modulating astral microtubule dynamics, *EMBO J*, 37 (2018).
- [109] R. Xie, S. Nguyen, K. McKeehan, F. Wang, W.L. McKeehan, L. Liu, Microtubule-associated protein 1S (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation, *J Biol Chem*, 286 (2011) 10367-10377.
- [110] M. Shi, Y. Yao, F. Han, Y. Li, Y. Li, MAP1S controls breast cancer cell TLR5 signaling pathway and promotes TLR5 signaling-based tumor suppression, *PLoS One*, 9 (2014) e86839.
- [111] Y. Wang, S. Zhang, S. Dang, X. Fang, M. Liu, Overexpression of microRNA-216a inhibits autophagy by targeting regulated MAP1S in colorectal cancer, *Onco Targets Ther*, 12 (2019) 4621-4629.
- [112] N. Issaeva, p53 Signaling in Cancers, *Cancers (Basel)*, 11 (2019) 332.
- [113] E. Senturk, J.J. Manfredi, p53 and cell cycle effects after DNA damage, *Methods Mol Biol*, 962 (2013) 49-61.
- [114] H. Lu, Y. Taya, M. Ikeda, A.J. Levine, Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 6399-6402.
- [115] M. Kapoor, G. Lozano, Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 2834-2837.
- [116] S.J. Martin, T.G. Cotter, Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis, *Int J Radiat Biol*, 59 (1991) 1001-1016.
- [117] M. Loignon, R. Fetni, A.J. Gordon, E.A. Drobetsky, A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts, *Cancer Res*, 57 (1997) 3390-3394.
- [118] S. Bates, K.H. Vousden, p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis, *Curr Opin Genet Dev*, 6 (1996) 12-18.
- [119] E.K. Yim, J.S. Park, The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis, *Cancer Res Treat*, 37 (2005) 319-324.
- [120] J. McCaffrey, L. Yamasaki, N.J. Dyson, E. Harlow, A.E. Griep, Disruption of retinoblastoma protein family function by human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits lens development in part through E2F-1, *Mol Cell Biol*, 19 (1999) 6458-6468.
- [121] L. Latonen, Y. Taya, M. Laiho, UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts, *Oncogene*, 20 (2001) 6784-6793.
- [122] D. Worku, F. Jouhra, G.W. Jiang, N. Patani, R.F. Newbold, K. Mokbel, Evidence of a tumour suppressive function of E2F1 gene in human breast cancer, *Anticancer Res*, 28 (2008) 2135-2139.
- [123] D.H. Kim, Y.-G. Roh, H.H. Lee, S.-Y. Lee, S.I. Kim, B.J. Lee, S.-H. Leem, The E2F1 oncogene transcriptionally regulates NELL2 in cancer cells, *DNA Cell Biol*, 32 (2013) 517-523.
- [124] Z.-L. Liu, X.-W. Bi, P.-P. Liu, D.-X. Lei, Y. Wang, Z.-M. Li, W.-Q. Jiang, Y. Xia, Expressions and prognostic values of the E2F transcription factors in human breast carcinoma, *Cancer Manag Res*, 10 (2018) 3521-3532.
- [125] X. Ma, Y. Gao, Y. Fan, D. Ni, Y. Zhang, W. Chen, P. Zhang, E. Song, Q. Huang, Q. Ai, H. Li, B. Wang, T. Zheng, T. Shi, X. Zhang, Overexpression of E2F1 promotes tumor malignancy and correlates with TNM stages in clear cell renal cell carcinoma, *PloS one*, 8 (2013) e73436-e73436.
- [126] M.G. Ertosun, F.Z. Hapil, O. Osman Nidai, E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling, *Cytokine Growth Factor Rev*, 31 (2016) 17-25.

- [127] Y.X. Liang, J.M. Lu, R.J. Mo, H.C. He, J. Xie, F.N. Jiang, Z.Y. Lin, Y.R. Chen, Y.D. Wu, H.W. Luo, Z. Luo, W.D. Zhong, E2F1 promotes tumor cell invasion and migration through regulating CD147 in prostate cancer, *International journal of oncology*, 48 (2016) 1650-1658.
- [128] S. Tian, L. Zhang, Y. Li, D. Cao, S. Quan, Y. Guo, X. Yang, T. Yang, Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Promotes Proliferation and Migration through the Transcription Factor E2F1 in Cervical Cancer Cells, *Anticancer Agents Med Chem*, (2020).
- [129] T.R. Berton, D.L. Mitchell, R. Guo, D.G. Johnson, Regulation of epidermal apoptosis and DNA repair by E2F1 in response to ultraviolet B radiation, *Oncogene*, 24 (2005) 2449-2460.
- [130] P.B. Dirks, J.T. Rutka, S.L. Hubbard, S. Mondal, P.A. Hamel, The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells, *Oncogene*, 17 (1998) 867-876.
- [131] J. DeGregori, G. Leone, A. Miron, L. Jakoi, J.R. Nevins, Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 7245-7250.
- [132] S. Zirkin, A. Davidovich, J. Don, The PIM-2 kinase is an essential component of the ultraviolet damage response that acts upstream to E2F-1 and ATM, *J Biol Chem*, 288 (2013) 21770-21783.
- [133] P.J. Eifel, Chemoradiotherapy in the treatment of cervical cancer, *Semin Radiat Oncol*, 16 (2006) 177-185.
- [134] N.G. Jablonski, The evolution of human skin colouration and its relevance to health in the modern world, *J R Coll Physicians Edinb*, 42 (2012) 58-63.
- [135] J.C. Ehrhart, F.P. Gosselet, R.M. Culerrier, A. Sarasin, UVB-induced mutations in human key gatekeeper genes governing signalling pathways and consequences for skin tumourigenesis, *Photochem Photobiol Sci*, 2 (2003) 825-834.
- [136] R. Krause, B. Matulla-Nolte, M. Essers, A. Brown, W. Hopfenmuller, UV radiation and cancer prevention: what is the evidence?, *Anticancer Res*, 26 (2006) 2723-2727.
- [137] M. Scheffner, K. Munger, J.C. Byrne, P.M. Howley, The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991) 5523-5527.
- [138] T.A. Lehman, R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W.P. Bennett, J.A. Welsh, R.A. Metcalf, M.R. Stampfer, N. Fusenig, E.M. Rogan, et al., p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines, *Carcinogenesis*, 14 (1993) 833-839.
- [139] A. Hidalgo, A. Monroy, R.M. Arana, L. Taja, G. Vazquez, M. Salcedo, Chromosomal imbalances in four new uterine cervix carcinoma derived cell lines, *BMC Cancer*, 3 (2003) 8.
- [140] T. Stiewe, B.M. Putzer, Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis, *Nat Genet*, 26 (2000) 464-469.
- [141] M.C. Moroni, E.S. Hickman, E. Lazzerini Denchi, G. Caprara, E. Colli, F. Cecconi, H. Muller, K. Helin, Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53, *Nat Cell Biol*, 3 (2001) 552-558.
- [142] R. Croxton, Y. Ma, W.D. Cress, Differences in DNA binding properties between E2F1 and E2F4 specify repression of the Mcl-1 promoter, *Oncogene*, 21 (2002) 1563-1570.
- [143] Z. Nahle, J. Polakoff, R.V. Davuluri, M.E. McCurrach, M.D. Jacobson, M. Narita, M.Q. Zhang, Y. Lazebnik, D. Bar-Sagi, S.W. Lowe, Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F, *Nat Cell Biol*, 4 (2002) 859-864.
- [144] S.A. Vorburger, A. Pataer, K. Yoshida, G.N. Barber, W. Xia, P. Chiao, L.M. Ellis, M.C. Hung, S.G. Swisher, K.K. Hunt, Role for the double-stranded RNA activated protein kinase PKR in E2F-1-induced apoptosis, *Oncogene*, 21 (2002) 6278-6288.
- [145] J. Wells, C.R. Graveel, S.M. Bartley, S.J. Madore, P.J. Farnham, The identification of E2F1-specific target genes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (2002) 3890-3895.
- [146] N.M. Wikonkal, E. Remenyik, D. Knezevic, W. Zhang, M. Liu, H. Zhao, T.R. Berton, D.G. Johnson, D.E. Brash, Inactivating E2f1 reverts apoptosis resistance and cancer sensitivity in Trp53-deficient mice, *Nat Cell Biol*, 5 (2003) 655-660.

- [147] G. Hoog, R. Zarrizi, K. von Stedingk, K. Jonsson, M. Alvarado-Kristensson, Nuclear localization of gamma-tubulin affects E2F transcriptional activity and S-phase progression, *FASEB J*, 25 (2011) 3815-3827.
- [148] K. Munger, J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzalez, M. Grace, V.L. Zacny, Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein, *Oncogene*, 20 (2001) 7888-7898.
- [149] N. Leclerc, P.W. Baas, C.C. Garner, K.S. Kosik, Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth, *Mol Biol Cell*, 7 (1996) 443-455.