

# RESUMEN



M.C. Juan Manuel Alcocer González.

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología.

Título del Estudio: “ Expresión de citoquinas TH1 y TH2 en cáncer cervical y su relación a la presencia y expresión de los oncogenes virales de HPV 16”.

Area de Estudio : Ciencias Naturales.

Propósito del Estudio: El cáncer es una de las principales causas de muerte en la mayoría de los países del mundo. En nuestro país representa la segunda causa de mortalidad, siendo el

cáncer cervical una de las neoplasias más frecuentes. Un factor que juega un papel muy importante en el desarrollo de esta neoplasia es la infección por ciertos tipos oncogénicos de HPV, pero es claro que la infección viral no es suficiente para la inducción de cáncer y son necesarios otros factores. La respuesta inmune del huésped puede ser de importancia crítica en determinar la progresión o regresión de las neoplasias intraepiteliales asociadas a HPV, por lo que el análisis de la respuesta inmune en el microambiente del tumor puede ser de importancia para el desarrollo de una vacuna ó inmunoterapia en cáncer cervical.

Contribuciones y Conclusiones : En primer lugar se desarrollo un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) para determinar la presencia de HPV 16 y 18 en 30 biopsias de cáncer cervical con diagnóstico histopatológico de estadio avanzado, la tipificación del virus se realizó por análisis de restricción del fragmento amplificado de 253 pb con XbaI y AclI, encontrándose HPV 16 en la mayoría de los tumores analizados ( 98 % ). Se determinó por RT-PCR la expresión de los genes CD4 y CD8 en los linfocitos infiltrantes de los tumores, encontrándose que existe una expresión diferencial, con una mayor expresión de CD8 que de CD4. Así mismo se estableció un método de RT-PCR para determinar la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16. El método puede detectar RNAm del transcrito maduro de los dos oncogenes y los transcritos de cada oncogén generados por maduración diferencial. La expresión de los oncogenes virales fue asociada a los estadios más avanzados de la neoplasia. Para analizar la expresión local de citoquinas en tejido tumoral se estableció un método de RT-PCR para amplificar el mensaje de citoquinas TH1 y TH2 en muestras de 50-100 de tejido. Los tumores de CaCU mostraron un patrón de citoquinas TH2, predominando la presencia de IL-4 y IL-10 en el 80 % de los tumores. El INF- $\gamma$  fue la citoquina TH1 más frecuentemente expresada. Estos datos indican una expresión diferencial de citoquinas, predominando la expresión de citoquinas TH2 en los tumores. En estos tumores la señal de detección de IL-10 por inmunohistoquímica fue encontrada en células coilocíticas y tumorales, lo que sugiere que las células transformadas por HPV 16 son las células productoras de IL-10. Estos datos indican que los HPV además de transformar células y crear una condición de inestabilidad para que se acumulen otras alteraciones génicas, pueden desregular la expresión de IL-10 y crear un estado de inmunosupresión local como una estrategia de evasión de los mecanismos de inmunidad celular del huésped que favorece el proceso de carcinogénesis cervical.

## IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD

En la actualidad, el cáncer cérvico-uterino asociado a papilomavirus ( HPV ) y el cáncer mamario están entre los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial. El cáncer cérvico-uterino es la enfermedad neoplásica más frecuente entre la población femenina de países en desarrollo; según la organización mundial de la salud, anualmente se registran en el mundo 450,000 casos nuevos, de los cuales aproximadamente el 45 % fallece a consecuencia de este padecimiento. En México, la incidencia de cáncer cérvico-uterino es extremadamente alta ( alrededor del 34 % de todos los tumores malignos en la mujer ), con una mortalidad registrada de 4,300 mujeres durante 1995; este porcentaje tan elevado no sólo representa un grave problema de salud, si no que, además constituye un reto socioeconómico de igual importancia. Por tales razones es necesario destinar recursos financieros encaminados a programas sociales de orientación y atención de mujeres para la detección temprana de la enfermedad. Es necesario también conjuntar esfuerzos entre instituciones en el área de la investigación básica y aplicada con el objeto de tener un conocimiento más profundo del comportamiento de la enfermedad en nuestro medio. Los datos más recientes parecen indicar que el cáncer cérvico-uterino se produce por una secuencia de alteraciones moleculares y celulares

acumulativas, donde participan los oncogenes virales, los oncogenes celulares, los anti-oncogenes y el estado inmunológico del huésped, entre otros factores. Sin embargo, en este momento no existen estudios que relacionen la presencia y expresión de los oncogenes de HPV y la respuesta inmune celular local en el cérvix; determinar la influencia del virus sobre la respuesta inmune celular permitirá conocer el papel que juega la relación de ambos factores en el proceso de carcinogénesis cervical, así como aportar algunos datos relacionados con la inmunobiología de HPV en cáncer cervical. Esto podrá ser de utilidad para desarrollar una estrategia de inmunoterapia que podría estar basada en la estimulación específica de aquellos mecanismos que hayan sido bloqueados ó inactivados por influencia de la infección ó transformación viral. Determinar el papel de la respuesta inmune del huésped durante la infección y transformación maligna por HPV, así como durante la progresión del cáncer puede ser de importancia para el diseño racional de una vacuna ó para la inmunoterapia en cáncer cervical.

## ANTECEDENTES

### **PAPEL DE ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR EN CÁNCER:**

Con el propósito de conocer el papel de algunos genes en el origen y desarrollo del cáncer humano, en los últimos años se han descrito dos clases ó categorías de genes que cuando son alterados por mutaciones pueden contribuir al desarrollo de cáncer ( Tabla No.1 ). Describiremos a continuación brevemente el papel de estos genes con la finalidad de entender a nivel molecular esta enfermedad.

**Tabla No. 1 Principales Categorías de Genes Celulares que Contribuyen al Desarrollo de Cáncer.**

PROPIEDAD	ONCOGENES	GENES SUPRESORES DE TUMOR
Numero de Eventos Mutacionales Requeridos	1 ( dominante )	2 ( resesivo )
Función del Alelo Mutante	Ganancia de función	Pérdida de función
Origen de la Mutación	Somática	Heredado ó Somática
Mecanismo de Acción	Componentes de las vías de transmisión de señales	Regulación negativa del ciclo celular
Ejemplos	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Factores de crecimiento.</li> <li>-Receptores.</li> <li>-Proteínas G.</li> <li>- Proteínas quinasas.</li> <li>- Factores de transcripción.</li> <li>-Ciclinas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Proteinas que regulan a factores de transcripción y oncogenes.</li> <li>-Factores de transcripción.</li> </ul>

## PROTO-ONCOGENES:

La familia de los proto-oncogenes está formada por unos 60 genes, todos ellos altamente conservados en la evolución de las especies. Estos genes desempeñan funciones muy importantes en el crecimiento y proliferación de las células, tanto en el individuo adulto como durante el desarrollo embrionario y fetal de los organismos ( 1,2 ). Las proteínas codificadas por estos genes se encuentran localizadas en distintos lugares de la célula y recientemente se ha empezado a entender como funcionan las proteínas proto-oncogénicas; estos estudios han demostrado que dichas proteínas realizan funciones específicas: algunas actúan como factores de crecimiento ( por ejemplo, sis ) , otras como receptores para factores de crecimiento, como el caso de erb-B que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico ( EGF ). Existen otras proteínas proto-oncogénicas ( myc, myb, jun ) que actúan dentro del núcleo de la célula, como factores de transcripción. El aumento en la expresión de estos proto-oncogenes puede activar a una serie de genes que participan en el crecimiento y proliferación de las células. Así, por ejemplo, la proteína myc interviene tanto en la duplicación del DNA celular, y el producto de jun ayuda a que se incremente la expresión de varios genes, ya que actúa como factor ó proteína activadora de la transcripción ( 3,4 ).

## ONCOGENES CELULARES.

Son proto-oncogenes molecularmente alterados. Una gran variedad de productos medioambientales, con los cuales estamos en contacto diariamente ( asfalto, tabaco, radiaciones, etc. ), son carcinogénicos. Estos productos, alteran molecularmente al DNA, lo cual puede llevar a una activación de los proto-oncogenes, transformándolos en oncogenes. Entre las alteraciones más importantes de los proto-oncogenes podemos citar: **mutación, amplificación y rearreglo génico** ( 5, 6 ). El proto-oncogén c-myc se encuentra amplificado ( es decir hay mas de 2 copias por célula ) en varios tumores humanos y los genes ras ( H-ras y K-ras ) se encuentran generalmente mutados en el codón 12 en muchos carcinomas humanos. Se ha observado que en un alto porcentaje de tumores de diversos tipos ( mama, cérvico-uterino, cerebral ) hay alteraciones moleculares ( amplificación y rearreglo génico ) de myc ( 7-12 ).

## GENES SUPRESORES DE TUMOR (ANTI-ONCOGENES):

Un tipo de alteración genética que ocurre durante el desarrollo de un tumor es la inactivación ó pérdida de función de uno ó más anti-oncogenes (Tabla No.2).

**Tabla No.2 Principales Genes Supresores de Tumor  
Relacionados a Cáncer.**

GENE	TUMOR
RB	Retinoblastoma, Osteosarcoma Leucemias linfoides, Pulmón Mama. Ovario, Próstata.
p53	Síndrome Li-Fraumeni, Mama Próstata, Pulmón, Colon Vejiga, Hígado, Cerebro, etc.
WT1	Tumor de Wilms
NF-1	Neurofibromatosis Neurofibromas periféricos
VHL	Enf. von Hippel-Lindau
APC	Poliposis Adenomatosa Familiar ( Colon )
DCC	Colon
MSH-2	Colon, Estómago, Endometrio
MLH-1, PMS 1, PMS 2	Páncreas, Vejiga, Ovario, Mama
MTS1 (p16 )	Melanoma Familiar, Glioblastoma, T-ALL Mesotelioma
MTS2 (p15 )	Vejiga, NSCLC
BRCA-1	Mama, Ovario, Próstata Colon
BRCA-2	Cáncer Pecho Masculino

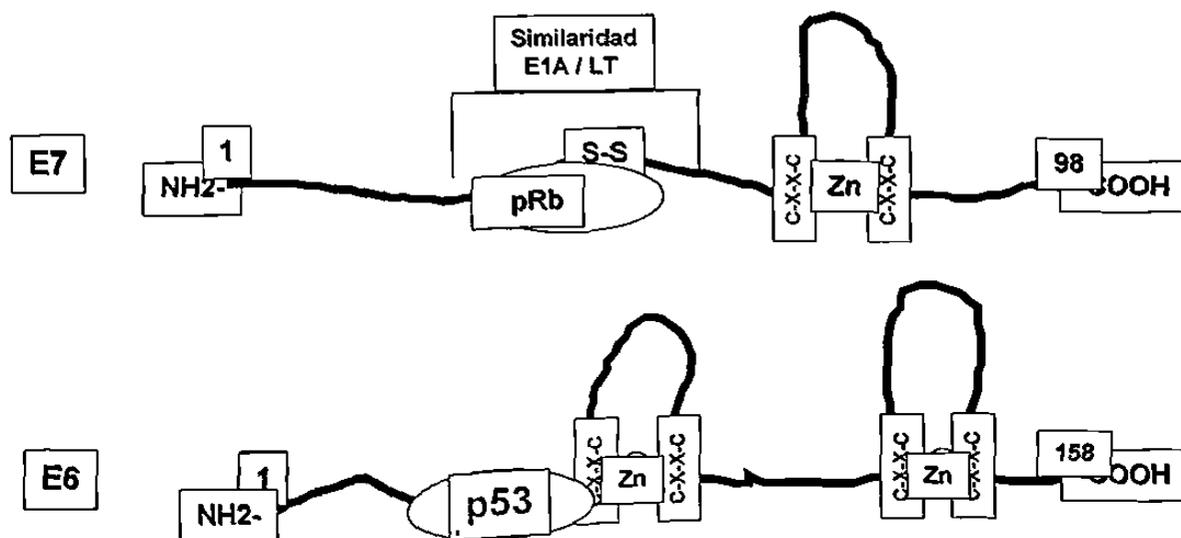
Se piensa que estos genes juegan un papel regulatorio negativo en el control de la proliferación celular. Entre los anti-oncogenes más estudiados podemos citar a los que codifican a las proteínas pRb ( retinoblastoma ) y p53 ( 13 ). Se ha demostrado que el gen Rb suprime el fenotipo transformado de células derivadas de varios tumores ( osteosarcoma, retinoblastoma y

carcinoma de próstata ) que presentan genes Rb inactivados ( 14, 15 ). El gen Rb codifica para una proteína nuclear abundante de 110-114 kd que posee

habilidad de asociarse al DNA, esta proteína se fosforila al final de la fase G1 del ciclo celular y se ha encontrado que la forma defosforilada sería su forma activa capaz de inhibir la proliferación celular ( 16-18 ).

La proteína p53 es también una fosfoproteína nuclear ( 19, 20 ). Estos dos genes supresores de tumor ( p53 y Rb ) se encuentran alterados en la mayoría de los tumores estudiados hasta el momento ( 21-24 ). Ambas proteínas antioncogénicas forman complejos estables con las proteínas transformantes de varios virus tumorales de DNA ( 25, 26 ). El antígeno T de SV40, la proteína E1A de adenovirus y la proteína E7 de los HPVs oncogénicos se unen a pRb, mientras que el antígeno T de SV40, la proteína E1B de adenovirus y la proteína E6 de HPV se unen a p53 ( 27-30 ) ( Fig. No.1 ).

Fig. No.1 Representación de la Interacción de E6 y E7 de HPV16 con p53 y pRb.

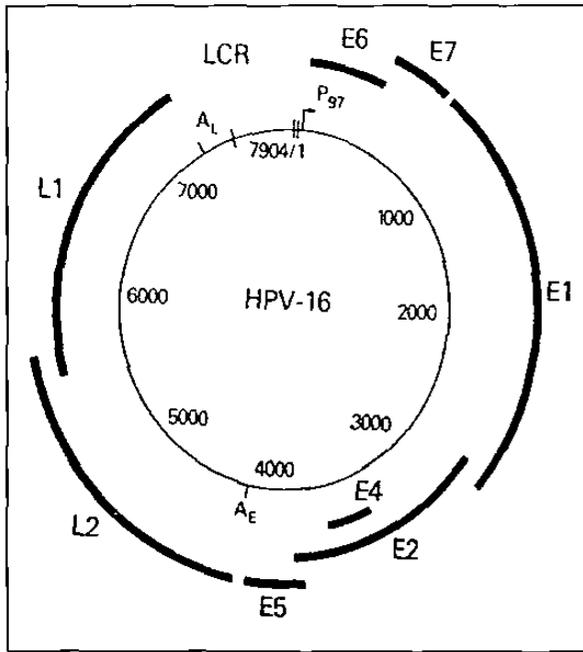


La forma defosforilada de pRb es la que se une preferencialmente al antígeno T de SV40, apoyando la hipótesis de que esta es la forma activa de pRb. Se ha reportado que tanto p53 como pRb son proteínas involucradas en la transcripción de una serie de genes relacionados con división celular ó diferenciación ( 31 ).

### **ONCOGENES VIRALES:**

Una gran cantidad de estudios epidemiológicos revelan que la mayor parte de los cánceres están asociados a factores del medio ambiente. La mayoría de estos factores inducen mutaciones en el DNA, como lo hacen algunos virus que actúan por periodos largos y probablemente en combinación con otros agentes. Esta misma acción la encontramos en los carcinógenos sospechosos de causar algunas neoplasias. Existen algunos virus que se han asociado con cáncer en humanos , en particular HTLV-I y HTLV-II, se han relacionado con leucemia, el virus de la hepatitis B con el cáncer hepático, el virus de Epstein-Barr con el linfoma de burkitt, herpes simplex virus ( HSV-2 ) y algunos tipos de HPVs, son asociados con cáncer genital. Algunos HPVs poseen dos oncogenes ( E6 y E7 ) los cuales son capaces de transformar células en cultivo cuando estos genes son transfectados. Mediante técnicas de ingeniería genética y biología molecular se ha aislado e identificado, de neoplasias genitales, el DNA de muchos tipos de papilomavirus ( 32-35 ).

**Fig. No.2 Organización Genómica de los Papilomavirus.**



Los genomas de los HPV secuenciados hasta ahora presentan una estructura básica muy similar ( Fig. No.2 ); se han identificado genes en la región de expresión temprana ( E ) y tardía ( L ). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación ( E1 ), transcripción ( E2 )

y transformación celular ( E6 y E7 ); los segundos codifican para proteínas de la cápside ( L1 y L2 ). Dichos genomas virales presentan además una región larga de control ( LCR ) conteniendo aproximadamente 1,000 pares de bases, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral. La transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 parece jugar un papel muy importante en la inducción y mantenimiento del estado transformado. Los elementos regulatorios de la expresión de estos genes se encuentran localizados en la LCR ( 36 , 37 ).

## **CANCER CERVICO-UTERINO (Ca-UCU): Un problema de salud pública.**

En la actualidad, el CaCU ocupa un lugar importante en las neoplasias más frecuentes, por lo que es considerado un problema de salud pública a nivel mundial ( 38 ). El CaCU es la enfermedad neoplásica más frecuente entre la población femenina de los países en desarrollo; según la organización mundial de la salud , anualmente se registran en el mundo 450,000 nuevos casos, de los cuales aproximadamente el 45 % fallece a consecuencia de este padecimiento ( 39,40 ). En México , la incidencia de CaCU es extremadamente alta y representa alrededor del 34 % de todos los tumores malignos en la mujer. Durante el año de 1995 fallecieron al menos 4,300 mujeres a consecuencia de esta neoplasia. Este porcentaje tan elevado no solo representa un grave problema de salud en nuestro medio, sino que, además constituye un reto socioeconómico de igual importancia. Por tales razones es necesario intensificar y consolidar los programas nacionales de orientación y atención de mujeres para la detección temprana del CaCU.

## **Factores de Riesgo y Estadios Clínicos:**

La aparición de esta neoplasia es asociada a una amplio rango de edad; usualmente se presenta entre la quinta y sexta década, teniendo una media a los 54 años. En contraste, las lesiones intraepiteliales, las cuales son precursoras del cáncer invasor, ocurren frecuentemente en mujeres jóvenes, por abajo de los 40 años de edad. Estas lesiones precursoras son conocidas como neoplasia intraepitelial cervical ( NIC ) y son caracterizadas por cambios displásicos confinados al epitelio cervical los cuales presentan diversos grados de maduración desordenada de este epitelio. Los tiempos en que se presentan estas alteraciones en el cérvix son consistentes con la noción de que la transformación de las células del epitelio escamoso requiere de un largo periodo de latencia, entre 10 y 20 años ( 41 ). Varios factores de riesgo han sido asociados a esta neoplasia; entre los más importantes se encuentran las relaciones sexuales a temprana edad, múltiples socios sexuales, hábito de fumar; y también se ha sugerido que los pacientes con inmunosupresión por trasplante de aloinjerto ó infección por VIH tienen un riesgo mayor ( 42, 43 ). La población abierta debe de estar bajo control de un programa de detección oportuna de cáncer, sobre todo aquellas mujeres que han alcanzado la madurez sexual ó que tienen una vida sexual activa. La principal

herramienta del programa nacional de detección oportuna del cáncer cervical es la prueba de papanicolaou, la cual está diseñada para identificar personas que tienen lesiones cervicales premalignas ó malignas que requieren posterior evaluación ( 44, 45 ). Un diagnóstico definitivo de lesión intraepitelial ó carcinoma debe ser obtenido únicamente a partir del estudio de una biopsia de lesiones sospechosas observadas durante la inspección cervical por colposcopia. Existen varias clasificaciones citológicas de las alteraciones cervicales determinadas por la prueba de papanicolaou; sin embargo, el sistema de clasificación más ampliamente usado es el de Bethesda. Este sistema reconoce dos categorías de anormalidades citológicas que sugieren la presencia de lesiones intraepiteliales ( 46 ). Estas categorías reciben el nombre de “lesión intraepitelial de bajo grado” y “lesión intraepitelial de alto grado”; en el primer caso tenemos una neoplasia intraepitelial cervical I ( NIC I ), la cual normalmente puede entrar en regresión espontánea, mientras que las lesiones de alto grado sugieren la presencia de NIC II y NIC III en la biopsia ( 47 ).

Las lesiones intraepiteliales no son generalmente visibles durante una inspección visual, por lo que su identificación es facilitada por la utilización de un dispositivo de bajo poder de amplificación, que recibe el nombre de

colposcopio. Usando este sistema se pueden identificar anomalías en la mucosa del cérvix características de NIC ó cancer invasor; estas anomalías son más fácilmente visualizadas aplicando una solución diluida de ácido acético, la cual produce áreas blanquecinas opacas en regiones con alta cantidad en ácido nucleico. Por tanto el poder de la colposcopia radica en identificar con mayor precisión áreas sospechosas que requieren análisis de biopsia, así como, el grado de extensión de la lesión ( 48, 49 ).

El tratamiento de las lesiones intraepiteliales es determinado en base al diagnóstico histológico y a la diseminación de la lesión en el examen colposcopico.( Tabla No. 3 ).

**Tabla No. 3 Manejo de Diferentes Lesiones Intraepiteliales de Cervix Determinadas por la Prueba de Papanicolaou y Analisis Histologico**

<b>PRUEBA DE PAPANICOLAOU</b>	<b>BIOPSIA POR COLPOSCOPIA</b>	<b>TIPO DE MANEJO</b>
<b>Lesión Intraepitelial de Bajo Grado</b>	NIC I	Observación y Seguimiento
<b>Lesión Intraepitelial de Alto Grado</b>	NIC II ó NIC III  Lesión Microinvasiva  Lesión Invasiva	Crioterapia, Vaporización con Laser Biopsia en Cono  De acuerdo a estadio

Los pacientes con NIC I documentado por biopsia no requieren posterior tratamiento, dado que la mayoría de las lesiones se resuelven espontáneamente. Los pacientes con NIC II y NIC III requieren de tratamiento para prevenir el desarrollo a estadios invasivos; existen dos alternativas para erradicar este tipo de lesiones. La primera incluye el uso crioterapia, vaporización laser y procedimiento de excisión con asa eléctrica. La segunda es llamada “conización cervical” ó biopsia en cono, el cual implica un procedimiento quirúrgico con resección de un área en forma cónica de tejido cervical, incluyendo parte del canal endocervical ( 50 ).

**Tabla No. 4 Estadios Clínicos del Cáncer Cervical**

<b>ESTADIO I</b>	El tumor está confinado al útero.
<b>IA</b>	Enfermedad microinvasiva. ( 5 mm profundidad y 7 mm ancho )
<b>IB</b>	Tumor más grande que estadio IA ó tumor visible confinado al cérvix.
<b>Estadio II</b>	Tumor se extiende más allá del útero, pero no involucra la pared pélvica ó el tercio inferior de la vagina.
<b>IIA</b>	Tumor involucra dos tercios superiores de la vagina, sin extensión lateral al parametrio.
<b>IIB</b>	Tumor se extiende lateralmente al parametrio.
<b>Estadio III</b>	El tumor involucra el tercio inferior de la vagina ó la pared lateral pélvica ó causa hidronefrosis.
<b>IIIA</b>	Tumor en el tercio inferior de la vagina.
<b>IIIB</b>	Tumor en la pared lateral pélvica ó hidronefrosis
<b>Estadio IV</b>	Tumor con extensa infiltración local ó presenta diseminación a un tejido distante.
<b>IVA</b>	Tumor en la vejiga ó la mucosa rectal.
<b>IVB</b>	Metástasis distante.

El cáncer cervical invasor es asintomático, aunque los pacientes pueden reportar descarga vaginal y sangrado vaginal poscoital. El diagnóstico de enfermedad invasiva es normalmente realizado mediante biopsia de una lesión visible en examinación pélvica ó por biopsia de una lesión observada durante el estudio colposcópico. Los estadios de cáncer cervical son categorizados de acuerdo a criterios puramente clínicos ( Tabla No. 4 ).

Los pacientes con estadio IA tienen evidencia microscópica de invasión temprana; estos tumores microinvasivos tienen un bajo riesgo de producir metástasis a ganglios linfáticos y consecuentemente son de pronóstico favorable y no requieren un tratamiento radical ( 50 ).

**Tabla No. 5 Manejo y Supervivencia del Cáncer Cervical Microinvasor e Invasor**

<b>DIAGNOSTICO HISTOLOGICO</b>	<b>ESTADIO CLINICO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>SOBREVIVENCIA A 5 AÑOS</b>
<b>Cáncer Microinvasor</b>	IA	Histerectomía Sencilla. Biopsia en Cono.	>95 %
<b>Cáncer Invasor</b>	IB ó IIA	Histerectomia Radical con Disección de Ganglios Pélvicos. Radioterapia Intracavitaria.	80-90 %  65, 40 y 20 %
	IIB, III, IVA	Radioterapia Intracavitaria ( Pélvica ).	20 %
	IVB	Quimioterapia ( Cisplatino ) con ó sin Radioterapia Pélvica.	

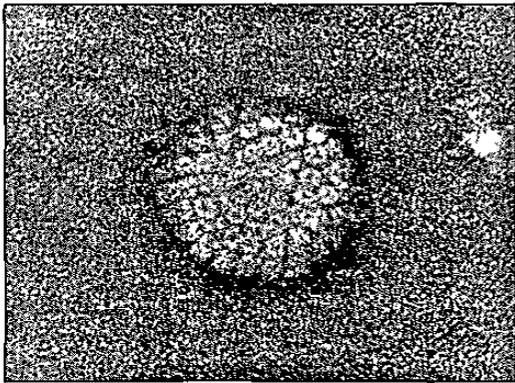
---

El estadio IA es frecuentemente tratado mediante histerectomía sencilla, la cual involucra la eliminación del cuerpo uterino y del cérvix, sin resección del paramétrio, ligamentos uterosacrales ó parte de la vagina. La supervivencia a 5 años con este tratamiento sobrepasa el 95 %; la utilización de histerectomía radical y radioterapia pélvica en pacientes con estado IB y IIA produce tasas similares de supervivencia a 5 años, entre el 80-90 %. Los pacientes con estadio IB y IIA con metástasis a ganglios pélvicos tienen una tasas de supervivencia a 5 años del 45 % y los que tienen metástasis a ganglios paraórticos presentan de un 10-30 % de supervivencia. Los pacientes con extenso tumor locoregional tienen una alta tasa de reaparición local del tumor si son tratados quirúrgicamente, por esta razón los pacientes con estadios IIB, III, y IVA son tratados con radioterapia, la cual produce una supervivencia a 5 años de 65, 40 y 20 %, respectivamente ( Tabla No. 5 ) ( 50 ). Los pacientes con estadio IVB ( metástasis distantes ) requieren de quimioterapia para el tratamiento. El agente más activo para el tratamiento del cáncer de cérvix con metástasis es el cisplatino y sus derivados, el cual produce respuestas favorables en aproximadamente el 20 % de los pacientes ( 51 ).

## CANCER CERVICO = UTERINO Y PAPILOMAVIRUS:

Los papilomavirus son un grupo bastante amplio de pequeños virus de DNA ( genóma de 8000 pb ) que infectan e inducen papilomas en epitelios epidérmicos y de mucosas ( Fig. No.3 ) ( 52 ).

Fig. No.3 Particula Viral Tipica de los Papilomavirus.



La replicación del virus se encuentra aparentemente relacionada con el programa de diferenciación de las células epiteliales, posiblemente a través de proteínas celulares específicas que se unen al DNA viral y regulan la transcripción. Se han detectado DNA de varios tipos de HPV en neoplasias intraepiteliales de cérvix, así como en carcinomas. Los HPV que infectan el tracto anogenital pueden ser clasificados en virus de alto riesgo y bajo riesgo de acuerdo a su asociación con el desarrollo de cáncer ( 53 ) ( Tabla No. 6 ).

**Tabla No. 6 Oncogenicidad Entre los Tipos de HPV y Lesión Producida**

TIPO DE HPV	ONCOGENICIDAD	TIPO DE LESIÓN
6. 11	Baja	Bajo riesgo Condilomas y Precancerosas
31,33,35.42.51,52, 58	Intermedia	Alto Riesgo Lesiones de Tránsito Rápido
16. 18	Alta	Alto Riesgo Precancerosas e Invasoras

Las variedades de bajo riesgo, como los tipos 6 y 11, son comunmente asociados con condiloma viral ó con cambios displásicos ligeros en el epitelio cervical ( NIC I ), los cuales normalmente no progresan a cáncer invasor. Estos tipos de virus de bajo riesgo por lo general no están presentes en mujeres con cáncer cervical. Los tipos de alto riesgo, tales como los HPV 16, 18, 31, 33 y 35 son asociados con displasia moderada ( NIC II ) y con displasia severa ó carcinoma in situ ( NIC III ). Estos tipos de virus están presentes en la mayoría de los pacientes con cáncer cervical. Las lesiones intraepiteliales NIC II y III tienen un gran potencial para progresar a cáncer cervical invasor. Los HPV 16 y 18 son los virus más comunes de alto riesgo que hoy en día son considerados como el principal factor etiológico del desarrollo de cáncer cervical, dado que aproximadamente el 85-90 % de los pacientes con esta enfermedad tienen DNA de HPVs ( 54. 55 ). La transfección de DNA de HPV 16 y 18 produce

---

transformación e inmortalización de queratinocitos y fibroblastos en condiciones de cultivo *in vitro*. Los análisis de mutaciones en regiones específicas de los virus HPV 16 y 18 indicaron que los genes E6 y E7 del virus son los responsables de estas modificaciones en queratinocitos y fibroblastos. Se ha encontrado también que muchos tumores y líneas celulares de cáncer cervical transcriben preferencialmente estos genes. Así, desde hace varios años, las proteínas E6 y E7 del HPV de alto riesgo han atraído especial atención, dado que representan la oportunidad de estudiar los mecanismos moleculares de oncogénesis viral en humanos ( 56 ). Actualmente, las proteínas E6 y E7 de los HPV de alto riesgo son consideradas las oncoproteínas del virus y ambas están directamente involucradas en la carcinogénesis cervical, El mecanismo molecular de acción de estas proteínas radica en su capacidad de interactuar con otras proteínas celulares involucradas en el control del crecimiento y proliferación de las células ( 57 ).

## **MECANISMOS DE CARCINOGENESIS CERVICAL: Un proceso de multiples alteraciones.**

Los HPV 16 y 18 se encuentran en forma no productiva e integrados al genoma de las células cancerosas y están generalmente amplificados en unas 5-200 copias por célula; esto parece indicar que la integración de los HPV de alto riesgo está relacionada con el proceso de malignidad de las células normales ó la progresión tumoral. Al momento de la integración el genoma de DNA viral se escinde generalmente en la región de los genes tempranos E1-E2; Sin embargo, los sitios de inserción en el DNA celular son variados y a pesar de que no existe un patrón característico ocurre en sitios frágiles (57 ). El DNA de HPV se ha encontrado en una posición muy cercana a la localización de algunos protooncogenes celulares, tales como: *c-myc*, *c-raf*, *c-src*. Además se ha demostrado que la integración no solamente puede ser en la cercanía a estos genes celulares, sino que la inserción puede ser intragénica como en el caso de *c-myc* produciendo alteración en el oncogén y presentando rearreglo y amplificaciones ( 8-11 ). Otras alteraciones génicas que han sido detectadas pueden jugar un papel muy importante, tal es el caso de la alteración en la expresión de Ha-ras y amplificación del oncogén *erbB-2* ( HER / neu ) que son asociadas con un pobre pronóstico en esta neoplasia ( 12 ). Como se mencionó anteriormente la expresión de los oncogenes E6 y E7

---

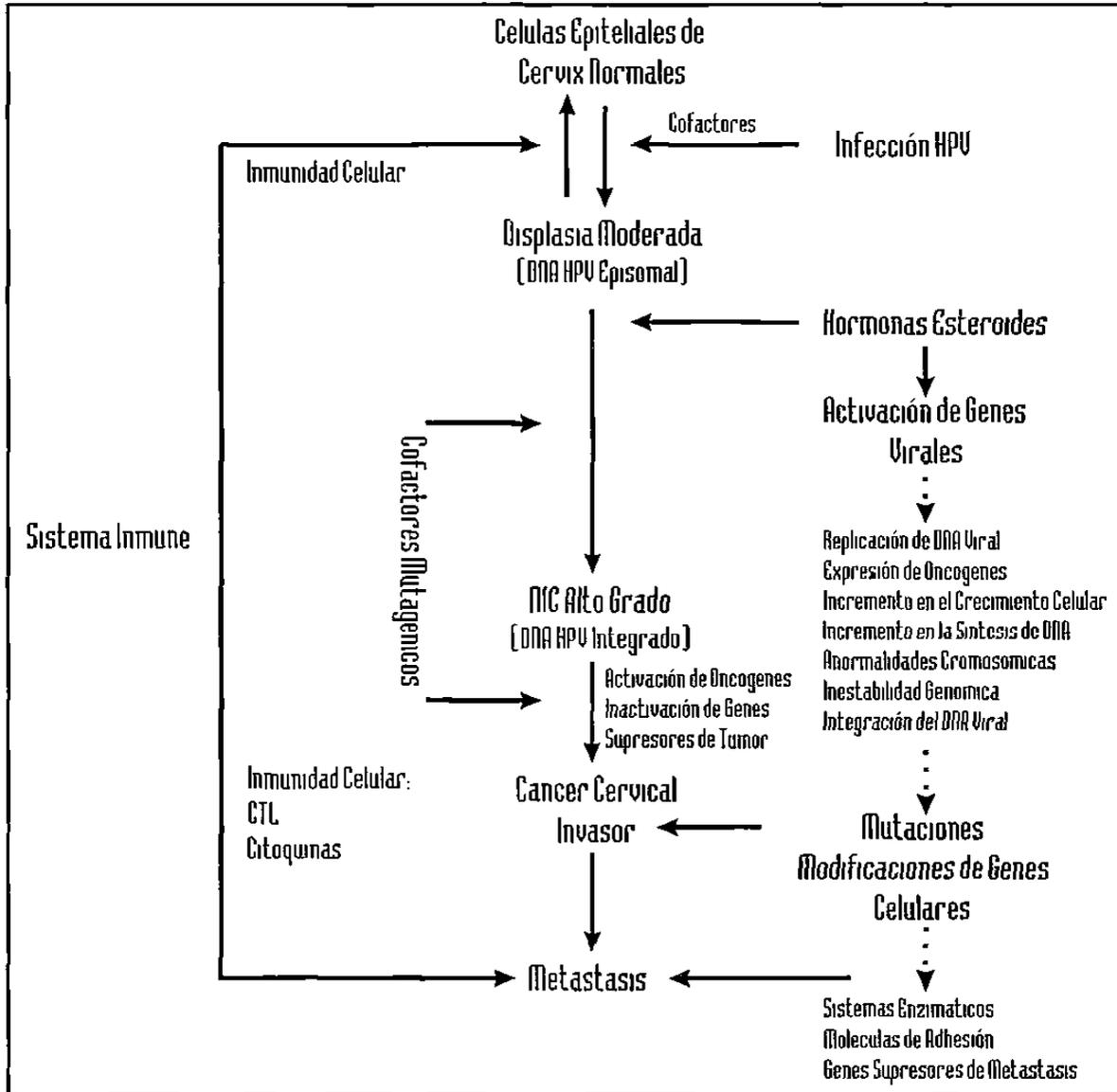
está directamente relacionada a la transformación de la célula infectada por HPV; la capacidad transformante de las proteínas E6 y E7 se debe principalmente a la propiedad de interaccionar con proteínas celulares involucradas en el control del crecimiento y proliferación celular. La proteína E6 forma complejos estables con la proteína p53, una de las proteínas supresoras de tumor más ampliamente estudiadas; la proteína E7 interacciona con la proteína pRb ( 57 ). La asociación de las proteínas virales E6 y E7 con los genes supresores de tumor mencionado produce una pérdida de la función de estas proteínas supresoras de tumor en la célula infectada ( 57 ). La pérdida de la función de genes supresores de tumor es una de las alteraciones más frecuentemente encontradas en los procesos de carcinogénesis; así, las proteínas oncogénicas de los HPV bloquean el papel regulatorio negativo en el control de la proliferación celular llevado a cabo por las proteínas supresoras de tumor ( 58 ). La proteína p53 se asocia actualmente con una función clave dentro del ciclo celular, como guardian del genoma durante este proceso, así como de algunas condiciones que representan para la célula un riesgo elevado de producir alteraciones en el genoma y además participa en el proceso de muerte celular programada ( apoptosis ) ( 59 ). Dadas las funciones de p53 en las células epiteliales infectadas por HPV, se puede

suponer que la expresión del oncogén E6 facilita las condiciones de inestabilidad genómica para que se generen subsecuentemente alteraciones en oncogenes u otros genes supresores de tumor; así mismo se puede establecer que la pérdida de la función de p53 en células infectadas por HPV puede inducir el bloqueo de un proceso de apoptosis mediado por p53 ( 60, 61 ). En resumen los oncogenes virales pueden inducir un bloqueo de los sistemas que controlan las funciones de crecimiento y proliferación, así como un bloqueo en las funciones celulares que controlan la muerte celular. La expresión de los oncogenes E6 y E7 es necesaria para la inducción del fenotipo transformado de la célula epitelial infectada, pero no son suficientes para la inducción del cáncer, por lo que otros factores pueden ser necesarios, tales como, las alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumor. Los factores anteriormente mencionados funcionan a nivel intracelular; para el desarrollo del cáncer es posible que existan otros niveles de control extracelular de igual importancia en el proceso de carcinogénesis cervical ( 62 ). Uno de los factores extracelulares que puede jugar un papel importante en determinar la progresión ó la regresión de neoplasias intraepiteliales cervicales es la interacción a nivel celular y molecular entre los linfocitos intraepiteliales y las células transformadas por HPV. Las interacciones en el

---

cérvix entre los elementos del sistema inmune del huésped y las células epiteliales transformadas por los oncogenes E6 y E7 de los HPV de alto riesgo es actualmente de mucha importancia para el desarrollo de una vacuna ó para la inmunoterapia del cáncer cervical ( Fig. No. 4 ) ( 63 ).

Fig. No. 4 Múltiples Alteraciones en el Proceso de Carcinogénesis Cervical.



## LA RESPUESTA INMUNE EN CANCER CERVICO- UTERINO.

### RESPUESTA INMUNE HUMORAL:

Datos históricos de regresiones espontáneas de lesiones cervicales han documentado que el huésped desarrolla una respuesta contra los HPV relacionados a infecciones genitales; en dicho proceso han sido implicados tanto los mecanismos humorales como celulares del sistema inmune ( 64 ). Uno de los requisitos primordiales para realizar estudios serológicos contra infecciones virales, es contar con un sistema de obtención de antígenos virales purificados; en el caso de HPV esto represento el principal obstaculo por la falta de un sistema apropiado para propagar el virus en cultivo, de tal manera que los estudios pioneros de la respuesta inmune humoral específica contra el HPV fueron realizados con viriones obtenidos por purificación en gradientes de densidad de tejido infectado ( 65 ). Los problemas con estos estudios son la pureza de las preparaciones de antígeno para determinar la respuesta serológica del huésped, la heterogeneidad de la población estudiada, tanto en edad, como estado inmunológico y tipo de infección por HPV. Estos estudios deberían ser reconsiderados en este marco conceptual con el objeto de no incurrir en apreciaciones equivocadas en relación a la respuesta inmune del huesped contra HPV ( 65 ). Los problemas mencionados llevaron al desarrollo de la tecnología

---

necesaria para producir proteínas virales específicas *in vitro*; en general los sistemas usados involucran vectores de expresión en los cuales una secuencia de DNA de HPV es clonada en una orientación apropiada para ser inducida en cultivo bacteriano; la proteína traducida es producida como una proteína de fusión, la cual al ser purificada puede ser utilizada como antígeno ó para la producción de anticuerpos específicos en animales de laboratorio ( 65 ). Otra de las tecnologías desarrolladas es la utilización de péptidos sintéticos que corresponden a epítopes de algunas proteínas virales reconocidos por linfocitos T ó B ( epítopes de T ó epítopes de B ) ( 65 ).

Uno de los primeros estudios utilizando esta tecnología, fue realizado por Jenison y cols. analizaron la respuesta serológica en mujeres con cáncer cervical a las proteínas E7 y L2 de HPV16. La seroreactividad a E7 fue del 24 % en las pacientes y 14 % en los controles, mientras que la seroreactividad a L2 fue 26 % en pacientes contra 17 % en los controles ( 65 ).

Jochmus-Kudielka y cols, estudiaron la respuesta del huésped a las proteínas E7 y E4 de HPV16 en un grupo de pacientes con lesiones precursoras de alto grado y carcinomas invasores; el 21 % de las pacientes fueron seropositivos a E7 contra el 1.6 % en los controles, mientras que la seropositividad a E4 fue igual en las pacientes como en los controles ( 66 ).

---

Koechel y cols estudiaron la seroreactividad en un grupo de pacientes con cáncer cervical y controles a las proteínas L1, L2, E4 y E7 de HPV 16 y 18, la reactividad para E4 y E7 fue del 63 % en los pacientes con cáncer cervical y del 9.8 % en los controles, mientras que la reactividad a las proteínas tardías en los dos tipos de virus fue del 57 % en las pacientes y del 44 % en los controles ( 65 ).

Dillner y cols., han realizado una serie de estudios diseñados para identificar epítopes lineares que reaccionen preferentemente con el suero de pacientes con neoplasia cervical ( 67-69 ).

En un primer estudio evaluó un epítope localizado en la región E2 de HPV 16 contruyendo un péptido sintético y determinó la seroreactividad por ELISA en el suero de pacientes con neoplasia cervical, el 78 % de las pacientes con precáncer ó cáncer invasor mostró reactividad, mientras que sólo el 21 % de los controles tenían reactividad ( 67 ).

En un subsecuente estudio examino epítopes específicos en las proteínas L1 y L2 de HPV 16 en el suero de pacientes con carcinoma cervical; por ELISA encontró que el 60 % de los pacientes reconocieron epítopes encontrados en la región L1, en contraste al 7 % en el grupo control ( 68 ).

De los los estudios para mapear epítopes específicos de cáncer cervical se pueden concluir las siguientes aseveraciones:

- 1.- En la mayoría de los casos la reactividad inmune es debida a una inmunoglobulina de tipo A.
- 2.- Las proteínas L1, E2 y E7 contienen epítopes que son fuertemente asociados con cáncer cervical; la región E2 muestra reactividad en el 87 % de los casos.
- 3.- Existe reactividad en individuos saludables a epítopes localizados en la porción carboxilo terminal de las proteínas L1 y L2.
- 4.- Las proteínas E1 y E5 son virtualmente no reactivas.

Young Son y cols, han encontrado que la reactividad a las proteínas E6, E7 y L1 de HPV 16 puede ser considerada como marcadores específicos del virus y de neoplasia cervical; el 33 % mostró seroreactividad a E6, el 36 % a E7 y el 37 % a L1, mientras que la reactividad a E2, E4 y L2 fue considerada baja ( 65 ).

Baay y cols, han encontrado recientemente que la reactividad a un epítope sintético de la proteína E7 de HPV 16 disminuye despues del tratamiento en pacientes con cáncer cervical; así la disminución de la reactividad a un epítope sintético de E7 está ligada al curso de la enfermedad y al pronóstico después del tratamiento ( 71 ).

Existen hasta este momento un sin número de estudios relacionados al análisis de la presencia en el suero de pacientes con cáncer cérvico uterino de anticuerpos contra las proteínas de los HPV de alto riesgo; de todos ellos se

pueden resaltar los siguientes aspectos que confirman el desarrollo de una respuesta inmune mediada por anticuerpos:

- a.- Identificación de epítopes reconocidos por linfocitos T y B en la proteína E7 de HPV 16 ( 71 ).
- b.- Correlación de la seroreactividad a la proteína E6 de HPV 16 y cáncer cervical ( 72 ).
- c.- Correlación de la seroreactividad a la proteína E7 de HPV 16 y cáncer cervical ( 66 ).
- d.- Seroreactividad a las proteínas E6 y E7 de HPV 16 puede ser considerada como un marcador de cáncer cervical invasor asociado a HPV 16 ( 73 -75 ).

Sin embargo, existen cuestionamientos que ponen en duda el valor de la seroreactividad a las proteínas de HPV en cáncer cervical, a continuación mencionamos algunos de ellos:

La seroreactividad es específica del tipo de HPV?
Es la población normal un control negativo a HPV?
La seroreactividad identifica la ruta de exposición?
Los estudios serológicos explican la naturaleza de expresión de los genes de HPV?
Los estudios serológicos pueden ser usados para prevenir el cáncer invasor?

La tendencia actual es desarrollar estudios serológicos con poblaciones de pacientes perfectamente controladas y homogéneas en relación al tipo de HPV

infectante determinado por metodología de PCR, diagnóstico preciso del estadio de la enfermedad, etc., así como el uso de una nueva tecnología para producir antígenos virales nativos usando el sistema de expresión de baculovirus. Esta clase de estudios con metodología más precisa y con antígenos virales mostrando epítopes naturales, quizás reflejen el verdadero significado y valor de la respuesta inmune mediada por anticuerpos contra los HPV asociados a cáncer cervical ( 76, 77 ).

## RESPUESTA INMUNE CELULAR:

Los mecanismos celulares de la respuesta inmunológica han sido considerados como los más importantes en el reconocimiento y destrucción de células infectadas por virus, así como, de células neoplásicas alteradas ( 78, 79 ). Por tales motivos ha sido importante determinar cual es el papel que juega la respuesta inmune celular en cáncer cervical. Los primeros estudios realizados fueron enfocados a analizar a nivel morfológico la presencia de linfocitos y otras células que participan en el desarrollo de una respuesta inmune en tejido infectado por HPV ( 80, 81 ).

Morris y cols., estudiaron la presencia de células de langerhans en verrugas genitales; ellos observaron que el número de células y su distribución varía considerablemente, estas células participan en el procesamiento de antígenos y presumiblemente en la activación de linfocitos infiltrantes del tejido cervical. La conclusión de este estudio explica que la variabilidad de células de langerhans observada puede reflejar las diferencias en la respuesta del huésped a la lesión asociada a HPV ( 82 ).

van Nagell y cols., han encontrado que la infiltración de linfocitos en cáncer cérvico uterino fue asociada con un pronóstico favorable del curso de la enfermedad ( 83 ).

Syrjanen y cols., así como, Chardonnet y cols., encontraron por estudios de inmunohistoquímica la presencia de infiltrados celulares en lesiones precursoras cervicales asociadas a HPV, estos infiltrados están formados principalmente por linfocitos T y linfocitos B ( 84, 85 ).

Cauda y cols., evaluaron el estado inmunológico de pacientes con condiloma acuminado, con el objeto de conocer el estado general de respuesta inmune del huésped en lesiones asociadas a HPV. Ellos encontraron en los pacientes una disminución en el número de células cooperadoras/células supresoras y demostraron también una reducción en la actividad de células asesinas naturales ( NK ), una disminución en la producción de interleucina-2 y de interferón- $\gamma$  ( 86 ).

Nakano y cols., han encontrado que la infiltración de células de langerhans en cáncer cérvico uterino tiene un significado pronóstico positivo ( 87 ).

Nakano y cols. han estudiado el papel de las células de langerhans y los linfocitos T infiltrados en cáncer cérvico uterino y han demostrado que la infiltración de linfocitos T debe ser considerada de importancia para un pronóstico favorable en cáncer cervical, mientras que la infiltración por linfocitos B no debe ser considerada de esta forma ( 88 ).

Los estudios anteriormente mencionados comprueban que el estado de la respuesta inmune celular de los pacientes ó la infiltración de linfocitos en el tejido tumoral juegan un papel importante en cáncer cervical. Así, se ha encontrado que el huésped desarrolla una respuesta inmunologica mas que inflamatoria en sitio donde se encuentra la lesión, dado que los infiltrados celulares encontrados están formados por células de langerhans, linfocitos T y B, encontrándose una mayor población de CD8<sup>+</sup>, que de CD4<sup>-</sup> ( 90-93 ).

Los estudios que se han realizado para evaluar la respuesta inmune sistémica en pacientes con lesiones de HPV indican que estos presentan profundos defectos en algunos mecanismos efectores de la respuesta inmune celular ( 93-95 ). Estos estudios indican que los pacientes infectados con HPV y con cáncer cervical presentan una profunda depresión de la respuesta inmune celular sistémica, la cual parece ser secundaria al desarrollo del cáncer, pero establece que las células neoplásicas no pueden ser eliminadas del huésped porque no existe un sistema inmune intacto capaz de realizarlo. La importancia de la respuesta inmune en el origen y el desarrollo del cáncer cervical se demuestra por la existencia de una alta probabilidad de aparición de una neoplasia genital por HPV en condiciones donde prevalece un estado de inmunosupresión en el huésped ( 96-99 ).

Otros estudios han sido dirigidos a la identificación de las proteínas virales de HPV y sus epítopes que inducen preferentemente una respuesta mediada por linfocitos T. Así por ejemplo, Strang y cols., Tindle y cols., y Comerford y cols., han identificado que en las oncoproteínas E6 y E7 están localizados los principales determinantes antigénicos que inducen una respuesta mediada por linfocitos T ( 100-102 ). Las dos oncoproteínas parecen comportarse como antígenos específicos de rechazo de tumor, dado que Chen y cols. han demostrado que tanto, E6 como E7 de HPV 16 son capaces de inducir la activación de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> que pueden inducir la regresión de tumores *in vivo* ó la destrucción específica *in vitro* de células transformadas por estas oncoproteínas virales (103-105 ).

Se ha estudiado la capacidad de los péptidos sintéticos para inducir la activación de los linfocitos T citotóxicos con excelentes resultados, los péptidos sintéticos utilizados corresponden a epítopes de T presentes en la oncoproteínas E6 y E7 de HPV 16. Estos estudios generan la posibilidad de desarrollar estrategias de vacunación basadas en péptidos inmunogénicos en pacientes con cáncer cervical ( 106- 110 ).

Actualmente una de las estrategias para el desarrollo de vacunas contra el cáncer se basa en la identificación de antígenos, específicos de tumor que sean

eficientemente reconocidos por los linfocitos T; estos antígenos pueden representar una variedad muy amplia; una de las categorías de antígenos potencialmente importantes es representada por los oncogenes celulares rearrreglados ó mutados, los oncogenes virales y los genes supresores de tumor mutados, que se presentan con mucha frecuencia en los tumores humanos; algunos estudios para el diseño de vacunas ó estrategias de inmunoterapia en cáncer usando esta alternativa están en desarrollo ( 111-112 ).

Pocos estudios de evaluación de la respuesta inmune celular local se han realizado y no se conocen detalles de las interacciones celulares y moleculares entre los linfocitos intraepiteliales infiltrantes en el cérvix y las células transformadas. Sin embargo, existen algunos datos donde se manifiesta la importancia del papel que juegan las interacciones entre las células intraepiteliales transformadas por HPV y los linfocitos intraepiteliales ( 113,114 ), por ejemplo, algunos grupos han encontrado una aberrante expresión de moléculas de clase II de MHC y una pérdida total ó alelo específica de moléculas de clase I en células epiteliales neoplásicas ( 115-118 ). La pérdida de expresión de moléculas de clase I de MHC parece ser debida a un mecanismo post-transcripcional originado por la pérdida de las proteínas transportadoras TAP1 y TAP2 en el tumor ( .119 ). Considerando el papel

biológico de las moléculas de MHC en la regulación de las funciones de los linfocitos T, B, macrófagos y células de langerhans de epitelios, se puede establecer que la modificación en la expresión de moléculas de MHC en células epiteliales transformadas por HPV tienen una profunda repercusión en la activación de linfocitos intraepiteliales.

En resumen, estos datos parecen indicar que los papilomavirus también regulan la expresión de genes o proteínas relacionadas con el funcionamiento local de los linfocitos, es decir, modulan algunos eventos inmunológicos en el tumor posiblemente como un mecanismo de escape de la respuesta inmune del huésped.

## PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN CANCER CERVICAL:

Otros estudios remarcan que las interrelaciones entre células transformadas por HPV con macrófagos y linfocitos intraepiteliales pueden jugar un papel en la progresión del tumor; por ejemplo, la producción local de algunas citoquinas como el TGF- $\alpha$  e IL-6 por HPV ( 120, 121 ).

Tabla No.4 Citoquinas que Inhiben la Expresión de los Oncogenes de HPV.

TNF- $\alpha$
INF- $\gamma$
IL-1
INF- $\alpha$
TGF- $\beta$ 1 y 2
EGF
PDGF

Por otro lado, algunas citoquinas producidas por macrófagos como la IL-1, TNF- $\alpha$  y la proteína quimioattractante de monocitos ( MCP-1 ) pueden regular la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV ó interferir en la transcripción viral ( 122,

123 ). Algunas citoquinas producidas en el tumor, como el INF- $\alpha$  y  $\gamma$ , el factor de crecimiento epidérmico ( EGF ), los factores de crecimiento transformante ( TGF- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 ) tienen la capacidad de regular negativamente la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 ( 124-128 ). Aunque los datos anteriores han sido obtenidos de estudios *in vitro* con líneas derivadas de cérvix ó queratinocitos transformados con HPV, pueden sugerir que la producción en el tumor de citoquinas por células transformadas ó células

infiltrantes del sistema inmune pueden jugar un papel importante en el origen ó progresión del proceso de carcinogénesis cervical.

### **PERSPECTIVAS PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA O INMUNOTERAPIA EN CÁNCER CERVICAL:**

Considerando que el factor viral ( HPV's oncogénicos ) es uno de los elementos importantes en el desarrollo de cáncer cervical, existe la posibilidad de desarrollar una vacuna antitumoral ó de implementar una estrategia de inmunoterapia adoptiva basada en linfocitos T citotóxicos específicos en esta neoplasia ( 129 ). Toda estrategia de desarrollo de una vacuna ó de inmunoterapia específica en cáncer debe estar basada en identificar antígenos tumorales específicos que permitan eliminar exclusivamente las células tumorales e ignorar las células normales. Existen en forma general dos tipos importantes de antígenos tumorales que pueden ser seleccionados para desarrollar una vacuna en cáncer ó una estrategia en inmunoterapia, ellos son: **a.- los oncogenes y antioncogenes celulares** frecuentemente alterados en las células neoplásicas. **b.- los oncogenes virales** expresados en células transformadas por virus oncogénicos ( 111-112 ). Los oncogenes celulares expresan proteínas alteradas que pueden ser reconocidas como antígenos tumorales por el sistema inmune del huésped y

activar sistemas citotóxicos antitumorales, tal es el caso de las proteínas celulares derivadas de los oncogenes *ras*, *p53* y *HER/neu* que pueden ser reconocidas por linfocitos T citotóxicos y eliminar células neoplásicas que expresan estos oncogenes ( 130-136 ). Como se mencionó anteriormente, en cáncer cervical el oncogén *ras* es frecuentemente mutado y los oncogenes *erb-B2*, *HER/neu* son amplificados y sobreexpresados en esta neoplasia, por lo que representan blancos potenciales que pueden ser utilizados para el desarrollo de estrategias antitumorales en cáncer cérvico-uterino. Por lo que respecta a los oncogenes virales, estos expresan proteínas exclusivamente en células infectadas y/o transformadas y son por ende candidatos igualmente viables para el desarrollo de una vacuna ó una estrategia de inmunoterapia en neoplasias con una etiología viral asociada ( 137 ). Como se mencionó anteriormente en cáncer cervical los oncogenes E6 y E7 de HPV16 son requeridos para el proceso de transformación y son altamente expresados en carcinomas cervicales, por lo que, representan blancos potenciales para enfocar la respuesta inmune específica hacia estas proteínas oncogénicas y poder distinguir las células infectadas y/o transformadas de las células normales ( 105 ). Las proteínas E6 y E7 de HPV16 han sido reconocidas como antígenos tumorales altamente específicos dado que son capaces de

inducir la generación de linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$  y estos a su vez pueden eliminar células tumorales expresando estos oncogenes ( 103, 104, 108, 138 ). Basado en los datos anteriores resulta muy importante identificar antígenos virales expresados en las células transformadas por HPV que puedan estimular en forma específica subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , considerando el papel que juegan en los procesos virales ( 139 ) y por la posibilidad de utilizar estos linfocitos en procesos de transferencia adoptiva de inmunidad celular ( 137,140, 141 ). La capacidad de activar linfocitos T citotóxicos y cooperadores con péptidos sintético correspondientes a fragmentos de proteínas virales ha estimulado la posibilidad de desarrollar vacunas basadas en péptidos sintéticos ( 142-145 ), además la activación de linfocitos T citotóxicos antivirales ofrece la ventaja de producir una memoria de largo plazo y no requiere la persistencia del antígeno, características muy importantes en una vacuna ( 146, 147 ). Como se mencionó anteriormente se han identificado epítopes de linfocitos T y B en los dos oncogenes E6 y E7 de HPV16, así como en las dos principales proteínas de la capsida L1 y L2 ( 100-102, 104, 108, 138 ), los epítopes de T han sido definidos mediante ensayos de proliferación y los epítopes de B por pruebas serológicas.

Sin embargo, no se han caracterizado bien cuales de estos epítopes inducen la generación de linfocitos T citotóxicos y a cuales antígenos de histocompatibilidad de clase I se asocian.

Recientemente se han identificado epítopes que inducen la activación de linfocitos T citotóxicos en los oncogenes E6, E7 y son candidatos para usarse como una vacuna en lesiones cervicales producidas por HPV 16 ( 148-152 ).

En general el perfil de respuestas proliferativas y citotóxicas obtenidas con los epítopes de T identificados varía grandemente entre haplotipos individuales, lo cual tiene importantes implicaciones cuando se considera que epétopes son reconocidos en poblaciones abiertas. Actualmente es necesario realizar estudios encaminados a identificar epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos y activadores de linfocitos TH1 asociados a los haplotipos de mujeres mexicanas que tienen lesiones causadas HPV 16. Una alternativa que también se está considerando para utilizarse como vacuna son las partículas virales formadas por el autoensamblaje de proteínas de cápside recombinantes, las cuales son altamente inmunogénicas, pero se desconoce si tiene la capacidad de estimular respuestas celulares mediadas por linfocitos TH y T citotóxicos ( 153-156 ). Los estudios realizados a la fecha indican que existen candidatos viables para desarrollar una vacuna contra las lesiones

producidas por HPV 16 ( 129, 157 ), pero para realizar los primeros ensayos preliminares en una pequeña población es necesario caracterizar las respuestas inmunológicas sistémicas e intralesión con respecto a los haplotipos de mujeres mexicanas con cáncer cervical y lesiones de bajo grado.

## **BASES PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA PROFILACTICA PARA PREVENIR LA INFECCIÓN POR HPV.**

La infección natural de los papilomavirus oncogénicos ocurre en la superficie de la mucosa genital, la cual se caracteriza por ser un área de muy pobre inmunogenicidad para el huésped; esto es reflejado en parte por la falta de una infección productiva, las limitaciones de los queratinocitos para funcionar como células presentadores de antígeno y la co-evolución del virus y el huésped, dado que los papilomavirus han evolucionado para evadir la respuesta del huésped más que para inducirla ( 129 ). Una estrategia de vacunación profiláctica debe superar estos problemas de inmunogenicidad y establecer una barrera inmunológica en el epitelio anogenital dirigida a las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral ( 129 ). Dos de las grandes dificultades para producir antígenos de la cápside viral para una vacuna profiláctica radica esencialmente en que los viriones de HPV no pueden ser propagados fácilmente in vitro y tampoco se pueden obtener cantidades razonables de viriones de las lesiones ( 129 ). Recientemente se han desarrollado estrategias para producir partículas virales ( VLP ) libres de DNA en levaduras y en otros tipos de células usando como vectores virus vaccinia, baculovirus y virus de semliki forest ( 159-162 ). Aunque parecen

existir diferencias antigénicas entre este tipo de partículas virales y los viriones nativos, las VLP pueden representar una fuente adecuada de epítopes conformacionales naturales para estimular una respuesta inmune contra las proteínas de la cápside viral ( 162 ). En algunos sistemas experimentales en animales y humanos se ha observado la necesidad de usar epítopes conformacionales en los antígenos para inducir una respuesta óptima de neutralización contra los papilomavirus, lo que apoya el uso de antígenos vacunales con conformaciones nativas ( 163-165 ). Así mismo, estos epítopes conformacionales son generalmente específicos del genotipo viral, lo que obviamente obstaculizará el desarrollo de una vacuna múltiple contra los genotipos de HPV asociados a lesiones anogenitales de alto riesgo ( 166 ).

Existen los suficientes datos experimentales que muestran que las partículas virales ( VLP ) formadas por proteínas de cápside L1 y L2 de papilomavirus usadas como antígenos vacunales son efectivas en producir una inmunidad sistémica y en mucosas : dichas VLP confieren protección a las lesiones inducidas por papilomavirus infecciosos ( 163-165 ). Una nueva estrategia para producir inmunidad específica en mucosas contra las proteínas de cápside viral de papilomavirus radica en la inyección de plásmidos que controlan la expresión de proteínas heterólogas, en el sitio de la inoculación ;

esta estrategia ha recibido el nombre de “Inmunización con DNA” y ha demostrado que induce protección contra las lesiones inducidas por papilomavirus ( 167 ). Esta estrategia puede ofrecer la posibilidad de desarrollar una vacuna polivalente combinando el DNA que codifica para las proteínas de cápside viral de varios genotipos de HPV.

## **BASES PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS TERAPEUTICAS PARA ELIMINAR LA REPLICACION INTRACELULAR DE HPV :**

La prevención de la infección es una estrategia difícil, debido a las complicaciones de generar una inmunidad que esterilice al huésped del virus, principalmente por que los anticuerpos neutralizantes no pueden localizar a los viriones de HPV intracelulares. Para lograr eliminar a los virus replicantes, una vacuna debe de inducir la activación de linfocitos T citotóxicos específicos de epítopes derivados de proteínas virales procesadas intracelularmente y presentadas en el contexto de cualquiera de las moléculas de MHC clase I del huésped ( 129 ). Las proteínas de HPV L1, L2 y E4 son principalmente expresadas en las células diferenciadas de la capa superior del epitelio infectado por HPV. Enfocar la respuesta de linfocitos T citotóxicos a estas células sería de poco beneficio terapéutico, porque estas células son terminales y no se dividen, a menos que las células de la capa basal que se autorenewan también fueran eliminadas ( 129 ). Las proteínas blanco mas adecuadas serian las proteínas E1 y E2, dado que son las principalmente expresadas en las células epiteliales suprabasales. Estas proteínas podrían ser expresadas a tan bajos niveles que de unos 100-500 epítopes virales podrían ser presentados por moléculas de clase I, por lo, que el nivel de exposición de

epítopes sería insuficiente para convertir a estas células en blanco del ataque de los linfocitos T citotóxicos. Las vacunas que estén diseñadas para inducir una respuesta celular dirigida a células diferenciadas y células suprabasales infectadas con HPV deberían de ser más efectivas ( 129 ).

## **BASES PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS TERAPEUTICAS PARA CONTROLAR CELULAS TUMORALES:**

Como se ha mencionado anteriormente la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 son necesarias para mantener a las células epiteliales del cérvix en un estado transformado. Estas proteínas han sido detectadas como antígenos específicos de tumor y por ende representan blancos adecuados para una vacuna dirigida a controlar tumores inducidos por HPV. Las células tumorales podrían ser eliminadas por una vacuna que estimule linfocitos T citotóxicos específicos para E6 y E7 aun con la presión selectiva predominante en el huésped inmunocompetente donde se han creado condiciones para minimizar la presentación de proteínas oncogénicas de HPV; dichas condiciones inhiben la activación de los mecanismos efectores de la respuesta inmune. como por ejemplo, la pérdida de expresión de alelos de HLA clase I, mutaciones puntuales en epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos y la inhibición de la expresión de proteínas de la maquinaria que procesa péptidos endógenos derivados de antígenos virales ( 115, 119, 152 ). Usando algoritmos predictivos y ensayos de unión a moléculas de HLA clase I vacías, se han identificado epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos en las proteínas E6 y E7 de HPV 16 que se unen a los haplotipos de HLA clase I

más comunes ( 148-150 ). Esta estrategia abre la posibilidad de construir una vacuna de “poliepítopes” formada por múltiples epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos arreglados en un polipéptido lineal y presentados por los alelos de HLA expresados por el paciente con cáncer cervical ( 129 ). Una vacuna “poliepítope genérica” podría ser desarrollada usando múltiples epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos que se asocian a los haplotipos de HLA más comunes de una población abierta ( 129 ).

Actualmente se vislumbran varias estrategias para potenciar la respuesta inmune específica contra el tumor, todas basadas en el control inmunológico del cáncer cervical :

- Vacunación con péptidos conteniendo epítopes inductores de linfocitos T citotóxicos ( 129.157. 158,168 ).
- Inmunización con proteínas recombinantes E6 y E7 expresadas en sistemas bacterianos como proteínas de fusión ( 129 ).
- Vacunación con células de tumor autólogas modificadas genéticamente *ex vivo* para secretar citoquinas ( 169. 170 ).
- Administración de linfocitos T citotóxicos específicos de tumor modificados genéticamente *ex vivo* para producir citoquinas ( 171, 172 ).
- Dirigir el inmunógeno ( proteína E7 ) a los compartimentos endosómicos y lisosomales de la vía de presentación de MHC clase II, usando una secuencia señal de distribución intracelular de la proteína de membrana asociada a lisozoma ( LAMP ). La inmunización con el virus vaccinia con un gene quimérico E7/LAMP-1 produce más anticuerpos y mayor respuesta de linfocitos T citotóxicos capaces de generar una protección contra tumores establecidos y contra el reto del tumor epitelial expresando E7 ( 173 ).

- Infusiones subcutáneas múltiples de células dendríticas autólogas cargadas con antígeno tumoral ( E7 ), las cuales son capaces de inducir linfocitos T citotóxicos *in vivo* e inducir respuestas clínicas parciales ó totales en otros tipos de tumores ( 151 ).
- Inmunización con virus vaccinia recombinante expresando las proteínas oncogénicas E6 y E7. Esta estrategia se basa en la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos contra las células tumorales transformadas por HPV ( 174 ).
- Inmunización con plásmidos desnudos para inducir la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV. La expresión de las proteínas oncogénicas puede potencialmente inducir linfocitos T citotóxicos específicos para el tumor.

## ENSAYOS CLÍNICOS CON VACUNAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER CERVICAL

Las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV 16 y 18 ó péptidos de ellas son los principales antígenos hacia los cuales se han enfocado los primeros ensayos clínicos ( Tabla No.7 ). Una vacuna basada en un vector de virus vaccinia recombinante que expresa E6 y E7 de HPV ha sido administrada en una sola dosis a ocho pacientes con cáncer cervical avanzado en el Reino Unido. Todos los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpos IgG antivaccinia y solamente tres generaron anticuerpos específicos contra HPV debido al proceso de vacunación ; mientras que la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos fue primeramente detectada a las nueve semanas de vacunación pero desapareció a las 14 y 20 semanas ( 129 ). En otro estudio que se está llevando a cabo en Australia, cinco pacientes con cáncer cervical avanzado fueron inmunizadas tres veces con varias dosis de la proteínas E7 de HPV 16 como proteína de fusión asociada a la glutatión-s-transferasa en el adyuvante algammulin ( 129 ). Todos los pacientes desarrollaron anticuerpos contra la proteína E7 y dos de los tres pacientes evaluables presentaron respuestas linfoproliferativas de linfocitos T a la proteína GST-E7 y a péptidos de E7. Un último protocolo se esta llevando a cabo en Holanda usando dos péptidos conteniendo epítopes inmunogénicos de la proteína E7

inductores de linfocitos T citotóxicos que es presentado por moléculas de HLA A\*0201 y un péptido cooperador en mujeres con HLA A\*0201 ( 129 ). En este momento no se conocen datos de este estudio, aunque en seis pacientes que fueron vacunados no se ha podido demostrar una respuesta de memoria de linfocitos T citotóxicos en sangre periférica.

**Tabla No. 7 Primeros Protocolos Clínicos de la Utilización de Vacunas en Cáncer Cervical.**

<p><b>Ieszec Borysiewicz.</b> University Hospital of Wales. Protocolo Fase I 8 mujeres CaCU Tipo de Vacuna :Virus Vaccinia Recombinante E6 y E7 de HPV 16 y 18 Cantab, Cambridge, England.</p>	<p><b>Ian Frazer.</b> Princess Alexandra Hospital, Queensland, Auatralia. Protocolo Fase I 5 mujeres CaCu Tipo de Vacuna : proteína E7 recombinante de HPV 16 en Algammulin.</p>	<p><b>Martin Kast y Cornelius Melief.</b> University Hospital Leiden. Holanda. Protocolo Fase I 15 mujeres HLA A0201 Dos péptidos sintéticos de E7 de HPV 16 en Montanide. Cytel Corp. San Diego, Cal.</p>
--	--	--

## MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE TEJIDO CERVICAL :

Para este estudio se obtuvieron 30 especímenes de biopsias de tejido cervical, todos los pacientes tenían carcinoma escamoso invasor, el cual fue confirmado por histopatología de acuerdo a los estatutos establecidos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia ( FIGO ). Dos biopsias fueron clasificadas como NIC III y el resto como tumores invasores estadios del I al IV. De igual forma se obtuvieron 10 biopsias de tejido cervical normal. Los tejidos fueron inmediatamente transportados al laboratorio y congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta las extracciones de RNA, DNA y proteínas.

### CULTIVO DE LINEAS CELULARES : Hela, SiHa, Caski, Jurkat y U-937:

Las células Hela, SiHa y Caski fueron cultivadas en RPMI 1640 con 10 % de suero fetal en 5 % de atmosfera de  $\text{CO}_2$  y fueron recuperadas para su utilización hasta que alcanzaron un 90 % de confluencia. Las células Jurkat y U-937 fueron cultivadas en DMEM con 10 % de suero fetal en 5 % de  $\text{CO}_2$  y se utilizaron cuando alcanzaron un 90 % de confluencia.

## OBTENCIÓN SIMULTÁNEA DE RNA, DNA Y PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE TRIZOL :

Las extracciones de RNA, DNA y proteínas fue realizada de acuerdo al método de TRIZOL ( Gibco, BRL, Gaithersburg, MD ) basado en la técnica previamente descrita por Chomczynski ( 175 ), Las muestras fueron homogenizadas en un Polytron ( Brikmann Instrument Inc., Westbury, N.Y. ) en presencia de 1 ml de TRIZOL, al homogenizado se le agregó 200 ml de cloroformo y se agitó suavemente en el vortex. Cada muestra fue centrifugada a 10,000 rpm / 15 min. La fase acuosa superior fue transferida a otro tubo para precipitar el RNA agregando 500 ml de isopropanol. El RNA precipitado fue lavado con etanol 75 % y después resuspendido con 30 ml de agua tratada con DEPC. El RNA fue mantenido en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El DNA fue precipitado de la fase orgánica con 300 ml de etanol, lavado y redisolto en 8 mM NaOH y luego neutralizado con la adición de 0.1 mM HEPES. Las proteínas fueron precipitadas de la fase fenol-etanol con 1 ml de isopropanol, el paquete de proteínas fue disuelto en 1 % de SDS y luego dializadas y congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El DNA y el RNA fue cuantificado en un espectrofotometro DU-40 y 3 mg de cada muestra fueron utilizados para analizar la integridad del RNA y DNA en geles de Urea-poliacriamida y agarosa respectivamente.

## ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA [ PCR ] PARA PAPILOMAVIRUS DE ALTO RIESGO.

I.º PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

A.º OBTENCIÓN DE PLASMIDO CON GENOMA DE HPV CLONADO:

Se llevó a cabo usando un sistema comercial “Wizard Miniprep” ( Promega Corporación, Madison ), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se inicio con 3 ml de un cultivo de 18 hrs. de la bacteria. Se obtuvo un paquete de celulas por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min, el paquete celular se resuspendió con 200 ml de la solución de resuspención. Se agrego 200 ml de la solución de lisis y se mezcló por inversión varias veces. Luego se agregó 200 ml de la solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante clarificado a un nuevo tubo. Se unió una jeringa de 3 ml sin embolo a una minicolumna Wizard. Se transfirió la solución de la resina-DNA a el barril de la jeringa, empujando lentamente el embolo de la jeringa para pasar la solución por la minicolumna. Se desensamblo la minicolumna de la jeringa y se quito el embolo de la misma, se unió el barril de la jeringa a la minicolumna y se colocaron 2 ml de solución de lavado de la columna, y suavemente se paso la solución por la minicolumna. La minicolumna se transfirió a un tubo de

microcentrifuga de 1.5 ml, y se centrifugó a 13,000 rpm por 20 seg, para secar la resina. La minicolumna se colocó en un tubo nuevo y se agregó 50 ml de agua ó amortiguador TE 1x a 65°C. El plásmido fue eluido centrifugando a 13,000 rpm durante 20 seg. Finalmente se checo la calidad del plásmido en un gel de agarosa 1%.

**B. • OBTENCIÓN DE DNA DE LINEAS CELULARES TRANSFORMADAS CON HPV [ HeLa, SiHa, CasHi ]:**

El DNA de las líneas celulares fue obtenido apartir de  $20 \times 10^6$  de células, las cuales fueron lisadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de TRIzol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIzol descrito anteriormente.

**C. • OBTENCIÓN DE DNA DE RASPADOS PARA CITOLOGIA CERVICO VAGINAL [CCV]:  
TRATAMIENTO a 100°C:**

Un volumen de 500 ml- 1 ml de cada uno de los raspados cervico vaginales fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 min. Los paquetes de células fueron lavados 2 veces con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y finalmente reconstituídos con 50 ml del mismo amortiguador. Cada una de las muestras fueron colocadas a 100 °C por 3 min y los sobrenadantes usados para la reacción de PCR.

#### **TRATAMIENTO CON PROTEÍNASAS K:**

Un volumen de 500 ml- 1 ml de cada uno de los raspados cervico vaginales fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 min. Los paquetes de células fueron lavados 2 veces con amortiguador de fosfatos pH 7.2 y finalmente reconstituidos con 50 ml del mismo amortiguador. Las muestras fueron incubadas con 100 ml de amortiguador de digestión que contiene 100 mg / ml de Proteínasa K en 100 mM de Tris-HCl ( pH 8.5 ) a 40 °C durante 18 hrs. Posteriormente las muestras fueron incubadas a 95 °C por 5 min para inactivar la proteínasa. Las muestras fueron centrifugadas y una parte del sobrenadante ( 1-5 ml ) fue usada para la reacción de PCR.

#### **D. • OBTENCIÓN DE DNA DE BIOPSIAS DE TEJIDO CERVICAL :**

El DNA de las biopsias de tejido cervical fue obtenido apartir de 100 mg de tejido congelado, las muestras fueron homogenizadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de Trizol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIZol descrito anteriormente.

## II. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE PAPILOMAVIRUS DE ALTO RIESGO:

La detección molecular de la presencia de secuencias genómicas de los papilomavirus oncogénicos se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) usando iniciadores consenso de la región L1 para el grupo de los papilomavirus genitales ( HPV 16, 18, 33, 35, 52, 6, 11 ) ( 176 ). Cada reacción se realizó ensamblando los siguientes componentes de la mezcla de reacción en un área separada del equipo termociclador ( DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT. ).

Mezcla de reacción :

REACTIVO	VOLUMEN
Muestra de DNA	1.0 $\mu$ l
Amortiguador de PCR 10x	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 2mM	2.0 $\mu$ l
Iniciador L1C1 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Iniciador L1C2 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Mezcla de dNTP's 200 $\mu$ M	9.0 $\mu$ l
Agua ultrapura	19 $\mu$ l
Taq DNA Polimerasa 1U/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
Aceite Mineral	50 $\mu$ l

Los iniciadores utilizados son secuencias consenso para amplificar los papilomavirus genitales :

L1C1 5' CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT 3'

L2C2 5' CAATACAGAGTATTTAGGGTA 3'

De igual forma se llevaron a cabo reacciones para la amplificación del gene de  $\beta$ -globina, usando los siguientes iniciadores :

BG1 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'

BG2 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'

Todos los iniciadores utilizados fueron producidos en un sintetizador de DNA Modelo 380B ( Applied Biosystems, Foster City, CA. ) en el Lab. de Inmunología Viral del Depto. de Virología Molecular del CISEI, INSP.

El programa de amplificación usado fue el siguiente :

PASO DE LA REACCIÓN	TEMP. / TIEMPO
"Hot Start"	95°C / 5 min.
Desnaturalización	94°C / 1.5 min.
Alineamiento	48°C / 1 min.
Extensión	72°C / 2 min.
35-40 Ciclos	

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 8 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio. La presencia de un fragmento amplificado con un tamaño correspondiente a 253 pb en el gel indicó la presencia de alguno de los papilomavirus genitales en la muestra.

### III. • TIPIFICACIÓN DE PAPILOMAVIRUS GENITALES MEDIANTE EL POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN:

La identificación del tipo viral se realizó por un análisis de restricción del producto amplificado por PCR. Basado en el siguiente patrón de restricción para los papilomavirus genitales:

Tipo de Enzima	HPV 6	HPV 11	HPV 16	HPV 18	HPV 31	HPV 33	HPV 42	HPV 52	HPV 58
DdeI	-	-	169, 84	216, 37	-	-	-	180, 80	170, 90
HaeIII	207, 37	207, 37	200, 53	210, 43	122, 91	112, 91	140, 60	190, 50	200, 40
XbaI	143, 101	143, 101	-	146, 107	-	-	-	-	-
AccI	-	-	193, 60	-	196, 60	-	-	-	-

Los números en cada casilla representan los tamaños de los fragmentos, en pares de bases, que son generados por cada enzima en particular.

Representación esquemática de la tipificación de los papilomavirus genitales por el polimorfismo de los fragmentos de restricción :

Cada muestra que presentó un producto amplificado de 253 pb, fue sometida a corte con enzimas de restricción, ensamblando la siguiente reacción :

Producto amplificado \_\_\_\_\_ 10.0  $\mu$ l

Amortiguador de enzima de restricción 10x \_\_\_\_ 5.0  $\mu$ l

XbaI ó AccI ( 10 U ) \_\_\_\_\_ 1.0  $\mu$ l

Incubación a 37°C / 12 hrs.

Para monitorear los productos de corte con las enzimas de restricción, se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 8 %. La detección de los productos de corte se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio. La presencia de un fragmento de 193 pb y otro de 60 pb al corte con la enzima AccI indica la presencia de HPV 16, mientras que la presencia de un fragmento de 146 pb y otro de 107 pb indica la presencia de HPV 18. La presencia de un fragmento de un tamaño correspondiente a 253 pb en el gel indica que el producto viral no fue cortado por las enzimas correspondientes y que el HPV presente en la muestra es otro tipo viral distinto a los mencionados.

## **EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES VIRALES E6 Y E7 DE HPV 16 EN CÁNCER CERVICAL :**

### **I. • OBTENCIÓN DE RNA DE LÍNEAS CELULARES :**

El RNA de las líneas celulares transformadas con HPV 16 y 18 ( Hela, SiHa, CasKi ) fue obtenido a partir de  $20 \times 10^6$  de células, las cuales fueron lisadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de TRIzol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIzol descrito anteriormente.

### **II. • OBTENCIÓN DE RNA DE BIOPSIAS DE TEJIDO CERVICAL :**

El RNA de las biopsias de tejido cervical fue obtenido a partir de 100 mg de tejido congelado, las muestras fueron homogenizadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de Trizol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIzol descrito anteriormente.

### **III. • PRODUCCIÓN DE DNA COMPLEMENTARIO [ cDNA ] :**

La producción de la primera cadena de DNA complementario para cada una de las muestras de RNA obtenido de las biopsias y de las líneas celulares se llevó a cabo ensamblando la siguiente reacción :

REACTIVO	VOL.
3-5 µg de RNA Total	5 µl
Amortiguador Reverso Transcriptasa 5x	5 µl
RNasin (40U)	1 µl
dATP 10 mM	1 µl
dCTP 10 mM	1 µl
dGTP 10 mM	1 µl
dTTP 10 mM	1 µl
Oligo d(T)18 65µM	1 µl
M-MLV Reverso Transcriptasa (200U)	1 µl
Incubación a 37°C	1.5 hrs
Inactivación a 95°C	5 min

**IV. • MÉTODO DE REVERSO TRANSCRIPCIÓN-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETERMINAR LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7:**

La determinación de la expresión de los oncogenes virales de HPV 16 se realizó mediante la técnica de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa ( RT-PCR ) usando iniciadores para la región E6 y E7. Cada reacción se realizó ensamblando los siguientes componentes de la mezcla de reacción :

REACTIVO	VOLUMEN
Muestra de cDNA	3.0 $\mu$ L
Amortiguador de PCR 10x	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 2mM	2.0 $\mu$ l
Iniciador E6E7 5' 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Iniciador E6E7 3' 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Mezcla de dNTP's 200 $\mu$ M	9.0 $\mu$ l
Agua ultrapura	19 $\mu$ l
Taq DNA Polimerasa 1U/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
Aceite Mineral	50 $\mu$ l

Los iniciadores utilizados son secuencias de la region E6-E7 de papilomavirus  
16 :

E6E7 5' CAAGCAACAGTTACTGCGACGTG 3'

E6E7 5' TCCGGTTCTGCTTGTCCAGCTGG 3'

Estos iniciadores estan diseñados para diferenciar los transcritos de los oncogenes E6 y E7 producidos por el proceso de maduración diferencial, el transcrito inmaduro E6-E7 se detecta como un producto de 527 pb, mientras que los transcritos E6 y E7 son amplificados con un tamaño de 321 y 204 pb

respectivamente. De igual forma se llevaron a cabo reacciones para la amplificación del gene constitutivo G3PDH, usando los siguientes iniciadores :

G3PDH1 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'

G3PDH2 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTCA 3'

El programa de amplificación usado fue el siguiente :

PASO DE LA REACCIÓN	TEMP. / TIEMPO
"Hot Start"	95°C / 5 min.
Desnaturalización	94°C / 1 min.
Alineamiento	60°C / 45 seg.
Extensión	72°C / 45 seg.
35 Ciclos	
Extensión Final 72°C / 7 min.	

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 8 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio.

## EXPRESIÓN DE CITOQUINAS TH1 Y TH2 EN BIOPSIAS DERIVADAS DE CÁNCER CERVICO-UTERINO Y EN LÍNEAS CELULARES TRANSFORMADAS CON HPV.

### I. = OBTENCIÓN DE RNA DE LAS LÍNEAS CELULARES : JURKAT, U-937, HELA, SiHa, CASKI :

El RNA de las líneas celulares transformadas con HPV 16 y 18 ( Hela, SiHa, CasKi ) fue obtenido a partir de  $20 \times 10^6$  de células, las cuales fueron lisadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de TRIzol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIzol descrito anteriormente. Las células U-937 fueron tratadas con 1 mg/ml de LPS durante 1 hr. y las células Jurkat fueron tratadas con 100 ng/ml de PMA durante 1 hr., después fueron procesadas para la obtención de RNA.

### II. = OBTENCIÓN DE RNA DE BIOPSIAS DE TEJIDO CERVICAL :

El RNA de las biopsias de tejido cervical fue obtenido a partir de 100 mg de tejido congelado, las muestras fueron homogenizadas directamente en presencia de 1 ml del reactivo de Trizol. Posteriormente se realizó de acuerdo al método de TRIzol descrito anteriormente.

### III. • PRODUCCIÓN DE DNA COMPLEMENTARIO ( cDNA ):

La producción de la primera cadena de DNA complementario para cada una de las muestras de RNA obtenido de las biopsias y de las líneas celulares se llevó a cabo ensamblando la siguiente reacción :

REACTIVO	VOL.
3-5 µg de RNA Total	5 µl
Amortiguador Reverso Transcriptasa 5x	5 µl
RNAsin (40U)	1 µl
dATP 10 mM	1 µl
dCTP 10 mM	1 µl
dGTP 10 mM	1 µl
dTTP 10 mM	1 µl
Oligo d(T)18 65µM	1 µl
M-MLV Reverso Transcriptasa (200U )	1 µl
Incubación a 37°C	1.5 hrs
Inactivación a 95°C	5 min

La determinación de la expresión de citoquinas TH1 y TH2 se realizó mediante la técnica de reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa ( RT-PCR ) usando iniciadores específicos para cada una de las citoquinas. Cada reacción se realizó ensamblando los siguientes componentes de la mezcla de reacción :

REACTIVO	VOLUMEN
Muestra de cDNA	3.0 $\mu$ L
Amortiguador de PCR 10x	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 2mM	2.0 $\mu$ l
Iniciador Citoquina 5' 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Iniciador Citoquina 3' 100 ng/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
Mezcla de dNTP's 200 $\mu$ M	9.0 $\mu$ l
Agua ultrapura	19 $\mu$ l
Taq DNA Polimerasa 1U/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
Aceite Mineral	50 $\mu$ l

Los iniciadores utilizados son secuencias específicas para cada una de las citoquinas :

GENE	SECUENCIA DE LOS INICIADORES	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
63PDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTCA 3'	452
CD4	5' GTGACCCTGGTGGTGTGAGAGC 3' 5' GGGGCTACATGTCTTCTGAACCCGGTG 3'	438
CD8	5' TTTCGGCGAGATACGTCAACCCTGTGC 3' 5' TTAGCCTCCCCCTTTGTAAACGGGCG 3'	379
IL-2	5' CATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCA 3' 5' CGTTGATATTGCTGATTAAGTCCCTG 3'	305
INF- $\gamma$	5' GCATAGTTTTGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC 3' 5' CTGCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGG 3'	427
IL-12	5' CCTCAGAGCTAACCATCTCCT 3' 5' CAGCCATGAGCAGGTGACCCGT 3'	398
IL-4	5' ATGGGTCTCACCCTCCCAACTGCT 3' 5' CGAACACTTTGAAATATTCTCTCTCAT 3'	456
IL-5	5' ATGAGGATGCTTCTGCATTTG 3' 5' TCAACTTTCTATTATCCACTCGGTGTTGATTAC 3'	414
IL-7	5' ATGTTCCATGTTTCTTTAGGTATATCT 3' 5' TGCATTTCTCAAATGCCCTAATCCG 3'	681
IL-10	5' ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA 3' 5' TCTCAAGGGGCTGGTCAAGCTATCCCA 3'	426
INF- $\alpha$	5' GAGTGAACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA 3' 5' GCAATGATCCCAAGGTAGACCTGCCCAGACT 3'	444
IL-6	5' ATGAATCCTTCTCCACAGGCGC 3' 5' GAAAGCCCTCAAGGCTGGCCTG 3'	628
TGF- $\beta$ 1	5' GCCCTGGACACCAACTATTGCT 3' 5' AGGCTCCAAATGTAGGGCCAGG 3'	161

El programa de amplificación usado fue el siguiente :

PASO DE LA REACCIÓN	TEMP. / TIEMPO
"Hot Start"	95°C / 5 min.
Desnaturalización	94°C / 45 seg.
Alineamiento	60°C / 45 seg.
Extensión	72°C / 2 min.
35 Ciclos	
Extensión Final 72°C / 7 min.	

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 8 %. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio.

#### **IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA PARA LA DETECCIÓN DE IL-10 EN PROTEÍNAS TOTALES DERIVADAS DE BIOPSIAS DE CERVIX:**

La electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo bajo el procedimiento descrito por Laemmli ( 177 ), mientras que la transferencia fue realizada de acuerdo al procedimiento estandar descrito

por Towbin ( 178 ). 50-100 mg de las proteínas totales de cada una de las biopsias fue mezclada con 10 ml amortiguador de muestra y luego cada una fue aplicada a geles de poliacrilamida al 12 %, después de la electroforesis, los geles fueron equilibrados con amortiguador de transferencia ( Glicina 0.76 M, 20 % Metanol y Tris 2.5 mM pH 8.0 ). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 0.5 amp/100 V a 4°C de 2-3 horas. Las membranas fueron bloqueadas a temperatura ambiente en TBST conteniendo 10 % de leche en polvo baja en contenido de grasa, posteriormente la membrana se incubo con una dilución 1 :100 de un anticuerpo monoclonal anti-IL-10 humana ( Genzyme, Boston, MA ) durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas durante 10 min en TBST y luego incubadas con un anticuerpo anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina durante 1.5 hrs. Finalmente las membranas fueron reveladas por incubación con 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina y nitroazul de tetrazolio ( Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA ).

#### **DETECCION DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 POR INMUNOHISTOQUIMICA EN BIOPSIAS DE CERVIX :**

Las biopsias de tejido cervical fueron fijadas en 10 % de formalina neutra amortiguada a pH 7.2. procesadas para inclusión en parafina mediante los

métodos convencionales de histología. Se obtuvieron cortes de cada biopsia de 6-8 m, los cuales fueron colocados en laminillas recubiertas con poli-L-lisina 0.01 %. Los cortes fueron desparafinados en xilol e hidratados por pases sucesivos en etanol ( 100, 95,90,80,75,50 y 30 % ) y agua destilada. Para inhibir la peroxidasa endógena los cortes fueron incubados con 0.3 % de peróxido de hidrogeno en metanol durante 30 minutos. El paso de bloqueo fue llevado a cabo usando 5 % de suero normal de conejo durante 30 min a temperatura ambiente. El procedimiento de inmunotinción fue realizado usando el método ABC ( ABC-Elite, Vectastain, Vector, Burlingame, CA. ) Los tejidos fueron incubados con un monoclonal anti-IL-10 humana ( Genzyme, Cambrige, MA ) durante una hora a temperatura ambiente, y posteriormente con un anticuerpo anti-IgG biotinilado durante el mismo tiempo. Los tejidos fueron lavados en PBS y luego incubados con una solución ABC por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente la reacción fue desarrollada usando diaminobencidina en Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 conteniendo 0.1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5-10 minutos y luego los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. Se realizaron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario.

## RESULTADOS

Las biopsias de tejido de cáncer cérvico uterino obtenidas para la realización de este estudio fueron sometidas a un análisis histopatológico para la certificación del estadio clínico de acuerdo a los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia. Se determinó que todos los tumores fueron carcinomas escamosos avanzados estadios I-IV con excepción de dos neoplásias intraepiteliales cervicales grado III (Tabla 1).

**Tabla No. 1 BIOPSIAS DE TUMORES DE CÁNCER CERVICAL**

BIOPSIA	ESTADIO CLÍNICO
AMO EUG	NIC III NIC III
AS MJRO MUB	I B I B I B
NRA GEB TPA SECC ROU GGU ARA	II B II B II B II B II B II B II B
MC ACL MCAB CVA JCA AGS VCH	III B III B III B III B III B III B III B

CML	IV A
ARG	IV B
EMD	IV A
JUG	IV A

Las características de las alteraciones histopatológicas típicas del NIC III y de los estadios avanzados de cáncer cervical II, III y IV son representadas en los cortes histológicos de cuatro de las biopsias incluidas en este estudio ( Fig. No. 1 y 2 ).

### **DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE HPV 16 CLONADAS EN PLÁSMIDOS POR PCR**

La primera fase de estandarización de la detección de secuencias genómicas de papilomavirus genitales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa fue establecer las condiciones de amplificación de HPV 16 usando secuencias clonadas en plásmido de este tipo viral y los iniciadores consenso para la región L1. De esta forma teniendo purificado y cuantificado el DNA se optimizaron las condiciones de reacción en relación al número de ciclos, cantidad de enzima y la concentración mínima de DNA que puede ser amplificada. Se analizó el efecto de 1, 2 y 4 U de enzima en 35, 40, 45, 50 ciclos de amplificación. Se determinó como parámetros óptimos bajo estas condiciones que 2 U de enzima y 35 ciclos de amplificación generan un producto específico de amplificación de 235 pb de buena concentración en el gel ( Fig. No. 3A ). Usando estos parámetros se procedió a determinar bajo estas condiciones cual es la cantidad mínima de DNA que puede ser amplificado, usando diversas concentraciones que van desde 2 ng hasta 2 pg. Se encontró que 2 pg pueden ser perfectamente amplificados bajo estas condiciones ( Fig. No. 3B ).

## **DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE HPV 16 y 18 EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE EPITELIO CERVICAL POR PCR.**

La segunda fase de estandarización de la detección de secuencias genómicas de papilomavirus genitales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa fue aplicar las condiciones previamente establecidas para la amplificación de HPV 16 y 18 a partir de DNA total obtenido de tres líneas celulares de epitelio cervical transformadas con estos virus. Se determinó que bajo las condiciones anteriores se amplifica óptimamente HPV 16 a partir del DNA de células HeLa y HPV 18 de células SiHa y CasKi, además se encontró que la concentración del producto amplificado guarda relación con el número de copias que tiene integrado cada línea celular, por ejemplo, usando la misma cantidad de DNA, la concentración del producto amplificado fue mayor en la línea CasKi que tiene mayor número de copias de HPV 16 que SiHa ( Fig. No. 4A ). La cantidad mínima que se amplifica a partir del DNA obtenido de estas líneas es de 10 ng y el producto de 253 pb puede ser perfectamente restringido por enzimas para permitir la identificación del tipo viral, como se muestra para la determinación de HPV 16. ( Fig. No. 4B y C ).

## **DETECCIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE HPV 16 y 18 EN RASPADOS CÉRVICO VAGINALES POR PCR.**

La fase final de estandarización de la detección de secuencias genómicas de papilomavirus genitales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa fue aplicar las condiciones previamente establecidas para la amplificación de HPV 16 y 18 a partir de DNA total de raspados cérvico-vaginales obtenidos para citología. Tomando en cuenta la naturaleza de las muestras y la necesidad de procesar un número amplio de ellas. se analizaron dos métodos rápidos para la extracción del DNA, calentando las muestras a 100°C y tratando las muestras con Proteínasa K. Los dos métodos resultaron igualmente efectivos para la amplificación del

producto específico de HPV de 253 pb, sin embargo cuando se sometieron a extracción por los dos métodos diferentes números de células, se encontró que el número de células guarda una relación inversa a la cantidad del producto amplificado vista en el gel, dado que la cantidad del producto amplificado fue mayor con 20 células que con 5000 en ambos métodos ( Fig. No. 5A ). Usando el método de extracción de DNA con proteínasa K se puede determinar la presencia de HPV en los raspados cérvico-vaginales ( Fig. No. 5B ). El producto amplificado de 253 pb en cada una de las muestras fue extraído de la mezcla de reacción y sometido a corte con dos enzimas de restricción, para determinar el tipo viral presente. Se encontró que el patrón de corte producido con AccI y XbaI corresponde a la presencia de HPV 16 en todos los raspados cérvico-vaginales ( Fig. No. 6 A y B ).

### **DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SECUENCIAS GENÓMICAS DE HPV POR PCR EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO AVANZADO**

Una vez que se estandarizaron a diferentes niveles las condiciones para la detección de secuencias genómicas de HPV por PCR, se procedió a determinar la presencia del virus en 30 biopsias de cáncer cérvico uterino avanzado de células escamosas. Para determinar la calidad para PCR del DNA obtenido de todas las biopsias, se amplificó el gene de  $\beta$ -globina en todas las muestras, indicando la ausencia de algún tipo de inhibidor de PCR ( Fig. No. 7A ). Posteriormente el DNA se amplificó con los iniciadores de la region L1 para diversos tipos de HPV de alto riesgo. En 26 muestras se detectó un producto específico de la amplificación de HPV de 253 pb ( Fig. No. 7B y 8A ). Este producto fue extraído y digerido con dos enzimas de restricción XbaI y DdeI para determinar el tipo de virus de acuerdo a su patrón de restricción, si el fragmento de 253 pb es cortado por DdeI produce dos fragmentos de 169 y 84 pb, el tipo viral en cuestión será

HPV 16, mientras que si es cortado por XbaI el tipo será HPV 18. De esta forma se tipificó el tipo viral presente en todas las biopsias, de las cuales 25 fueron positivas para HPV 16, siendo el tipo prevalente, alrededor del 90 % en la población estudiada ( Fig. No. 8B ). Un total de 25 biopsias de lesiones cervicales producidas por HPV 16 y adecuadamente caracterizadas en cuanto a su estadio clínico fueron seleccionadas para posteriores estudios para la expresión local de citoquinas y de los oncogenes virales ( Tabla No. 2 ).

**TABLA No. 2 TUMORES DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO, ESTADIO CLÍNICO Y PRESENCIA DE HPV 16 POR PCR**

BIOPSIA	ESTADIO CLÍNICO	PCR HPV 16
AMO	NIC III	+
EUG	NIC III	++
AS	I B	+
MJRO	I B	+
MUB	I B	+
ARA	II B	++
GEB	II B	+
TPA	II B	++
SGCC	II B	+
ROU	II B	++
GGU	II B	++
ARA	II B	+
INC	III B	+
ACL	III B	+
MICAB	III B	+
CUR	III B	++
JCA	III B	++
AGS	III B	++
UCB	III B	+

CML	IV A	+
ARG	IV B	+
EMN	IV A	+
JVB	IV A	++

La clave de una cruz (+) o dos cruces (++) han sido asignadas arbitrariamente de acuerdo a la intensidad del producto amplificado observado en los geles de poliacrilamida al 8 %.

### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES VIRALES E6 Y E7 DE HPV 16 EN CÁNCER CERVICAL

A fin de determinar el estado de expresión de los oncogenes virales E 6 y E7 de HPV 16 en las biopsias de cáncer cervical, se estableció primeramente un método de RT-PCR para analizar la expresión de los oncogenes en una línea celular derivada de tejido cervical transformada con HPV 16. Mediante este método se lograron detectar los mensajeros de los tres tipos de transcritos que se generan a partir del procesamiento diferencial de E6 y E7, el transcrito de 527 pb de E6/E7, el de 321 pb denominado E6 I\* y el E6 II\* de 204 pb ( Fig. No. 9 A y B ). Cuando se analizó mediante este método la expresión de E6 y E7 en los tejidos de cáncer cervical, se encontró una expresión heterogenea de los tres transcritos mencionados en los tumores, dado que se pueden determinar claramente que hay grupos de tumores que expresan únicamente el transcrito E6/E7, otros sólo expresan dos transcritos ( E6I\* y E6II\* ) y otros tumores expresan los tres transcritos ( Fig. No. 10 A y B ). Al asociar los tumores de acuerdo a su estado de expresión de E6 y E7 y su estadio clínico se observa que la expresión de los transcritos de E6 y E7 se presenta en el estadio mas avanzado de cáncer cervical ( IVa y IVb ) ( Tabla No. 3 ).

**TABLA No. 3 CORRELACION ENTRE EL ESTADO DE EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES DE HPV 16 Y EL ESTADO CLÍNICO**

<b>Expresión de los Oncogenes E6 y E7</b>	<b>Biopsia / Estado Clínico</b>
<b>E6/E7</b>	AMO / NIC III EVG / NIC III A / I ROV / IIb
<b>E6/E7, E6 y E7</b>	CVA / IIIb ACL / IIIb EMN / IVa
<b>E6 y E7</b>	AS / Ib      39 / IVa JCA / IIIb    EHG / IVb VCH / IIIb    ERH / IVb MRB / IVb    12 / IVa B / Iva        TPA / IVb IS / IVb       JVB / Iva HGS / IVb     RRM / IVa

**ANÁLISIS DE LA EXPRESION DE CITOQUINAS POR RT-PCR EN LAS LÍNEAS CELULARES JURKAT Y U-937**

Con el propósito de estandarizar las condiciones para analizar la expresión de citoquinas por medio de RT-PCR usamos dos líneas celulares una de linfocitos ( JURKAT ) y una de macrófagos ( U-937 ) que con estímulos apropiados pueden producir varios tipos de citoquinas. El RNA obtenido de células JURKAT y U-937 estimuladas con esteres de forbol ( PMA ) y LPS respectivamente fue usado para optimizar la producción de DNA complementario y las condiciones de amplificación por PCR de varios genes de citoquinas. Se determinó que usando las condiciones de reacción estandar para la producción de la primera cadena de DNA complementario a partir de 1 mg de RNA total en un volumen final de 30 ml y usando un decimo de la reacción se pueden amplificar varios genes de citoquinas. Bajo estas condiciones se determinó la expresión de los genes G3PDH, IL-2 e INF-g en las células JURKAT y G3PDH, TGF-b, IL-6 y TNF-a en las células U-937 ( Fig. No. 11 ).

## **EXPRESION DE LOS GENES CD4 Y CD8 EN LINFOCITOS INFILTRANTES EN CÁNCER CERVICAL**

Los tumores de tejido cervical tienen la característica de presentar infiltración abundante de linfocitos, por tal motivo en primera instancia estudiamos la expresión local de marcadores de superficie que identifican las dos subpoblaciones más importantes de linfocitos ( CD4 y CD8 ). Comparativamente los tumores analizados presentaron una mayor expresión del gene CD8 y una menor expresión del gene CD4, lo que sugiere que la especie celular más frecuente en estas neoplasias son los linfocitos T citotóxicos y una menor población los linfocitos T cooperadores ( Fig. No. 12 B y C ).

## **EXPRESION LOCAL DE CITOQUINAS TH1 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO CON HPV=16**

Con el propósito de determinar cual es el patrón de expresión local de citoquinas TH1 o TH2 en tejido de cáncer cervical con HPV-16, se analizó la expresión de RNAm de estos genes por RT-PCR, en 20 biopsias. Para analizar la expresión del RNAm de estas citoquinas en pequeños especímenes de tejido de cáncer cervical humano, se obtuvo el RNAm total y se transcribió en forma reversa a cDNA. Para tener una significativa comparación entre diferentes muestras de tejido, las cantidades de cDNA fueron normalizadas mediante la amplificación de G3PDH ( Fig. No.12 A ). Para analizar la expresión del RNAm de las citoquinas TH1, amplificamos IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ . De las 20 muestras analizadas, 16 no expresaron IL-2 y sólo 4 de las muestras expresaron IL-12, mientras que todas ellas expresaron INF- $\gamma$  a niveles muy bajos ( Fig. No. 13 A,B y C ). En resumen la baja expresión de INF- $\gamma$ , y la falta de expresión de IL-2 e IL-12 en los tejidos de cáncer cervical avanzado con HPV-16, sugiere que hay una ausencia de expresión local de los genes de citoquinas TH1 ( Tabla 4 y 5 ).

## **EXPRESION LOCAL DE CITOQUINAS TH2 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO CON HPV-16**

Posteriormente se analizó la expresión local de citoquinas TH2 en los tejidos de cáncer cervical. Con el objeto de tener una apropiada comparación entre la expresión de los genes de citoquinas en diferentes muestras de tejido, las cantidades de cDNA fueron normalizadas mediante la amplificación de G3PDH ( Fig. No.12 A ). La expresión de IL-4 fue detectada en 17 de las 20 muestras estudiadas, mientras que únicamente 3 y 4 muestras expresaron IL-5 e IL-7 respectivamente ( Fig. No. 14, Tabla No. 4 y 5 ). Otra de las citoquinas que fue muy significativa su expresión es la IL-10, dado que se encontró su expresión en 14 de las 20 muestras estudiadas ( Fig. No. 15 ). En resumen las biopsias estudiadas de cáncer cervical con HPV 16 expresan preferencialmente citoquinas del tipo TH2 ( Tabla No. 4 y 5 ).

## **EXPRESION LOCAL DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO CON HPV-16**

Para investigar la producción local de citocinas pro-inflamatorias en biopsias de cáncer cérvico uterino, se analizó la expresión del RNAm de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y TGF- $\beta$  en los tejidos. La expresión del RNAm del TNF- $\alpha$  no se detectó en la muestras estudiadas. Mientras que 4 de los 20 tejidos expresaron IL-6, en contraste, todos los tejidos expresaron TGF- $\beta$  en niveles muy significativos ( Fig. No.16 ). Estos datos indican que los estadios avanzados de cáncer cervical no parecen expresar citoquinas inflamatorias, la expresión local de TGF- $\beta$  mas que promover funciones inflamatorias, puede estar relacionada con inhibir funciones inmunológicas.

## ASOCIACION DE LA EXPRESION DE CITQUINAS TH1 Y TH2, ONCOGENES VIRALES Y ESTADIO CLÍNICO

Previamente habiamos establecido que los estadios de cáncer cérvico uterino mas avanzados expresan unicamente los transcritos de los oncogenes E6 y E7, por lo que tratamos de establecer si existe una asociación con el tipo de citoquinas TH1 ó TH2 expresadas localmente. Para establecer esta asociación asignamos un patrón TH1 ó TH2 a aquellos tejidos que hayan expresado cuando menos dos citoquinas de cada tipo y asignamos un patrón no determinado a aquellos tejidos que expresaron citoquinas de ambos tipos. Se encontró que los estadios mas avanzados expresan preferencialmente un patrón de citoquinas de tipo TH2, con una total ausencia de un patrón indeterminado ó de citoquinas tipo TH1 ( Tabla No. 6 ).

**TABLA No. 6 ASOCIACION ENTRE LA EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES, ESTADIO CLÍNICO Y EXPRESION DE CITOQUINAS.**

Expresión de los Oncogenes E6 y E7	Biopsia	Estadio Clínico	Citoquinas
E6/E7	AMO	NIC III	TH2
	EVG	NIC III	**
	A	I	**
	ROV	IIb	TH2
E6/E7, E6 y E7	CVA	IIIb	TH2
	ACL	IIIb	TH2
	EMN	IVa	TH1
E6 y E7	AS	Ib	TH2
	JCA	IIIb	TH1
	VCH	IIIb	TH2
	PFT	IVb	TH2
	MRB	IVb	TH2
	B	IVa	TH2
	IS	IVb	**
	39	IVa	TH2
	EHG	IVb	TH2
	ERH	IVb	TH1
	12	IVa	TH2
	TPA	IVb	TH2
	JVB	IVa	TH2
	HGS	IVb	TH2
RRM	IVa	TH2	

## **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE IL-10 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

Con el fin de determinar la expresión de IL-10 en cáncer cérvico uterino avanzado con HPV-16. Se analizó la expresión del RNAm de esta citoquina por RT-PCR. Para investigar la expresión del RNAm de IL-10 en pequeñas biopsias de cáncer cervical humano, se obtuvo el RNAm total de los tejidos y después se produjo el cDNA. 14 de las 20 muestras fueron positivas para la expresión de RNAm de IL-10, y de estas 7 mostraron una alta expresión de IL-10 ( Fig. No. 15 A y B ). Estos datos indican una frecuente expresión de IL-10 en los tumores avanzados de cáncer cérvico uterino.

## **DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA IL-10 EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO POR MEDIO DE IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

Para determinar si la expresión del RNAm de IL-10 correlaciona con la presencia de la proteína IL-10, se obtuvieron las proteínas totales de 5 biopsias positivas a IL-10, y se detectó la proteína IL-10 con un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal identificó una proteína de 35 kD en dos de las cinco tejidos de cáncer cervical. ( Fig. No. 17 ). La presencia de la proteína IL-10 se detectó en los tejidos que mostraron altos niveles del RNAm de IL-10 por RT-PCR. Estos datos indican que la detección de la proteína IL-10 por inmunolectrotransferencia mostró una alta correlación con la expresión del RNAm de IL-10 determinado por RT-PCR. La ausencia de la proteína IL-10 en algunas muestras, en las que el RNAm para IL-10 fue positivo, se debe a que la sensibilidad de la técnica es menor que el RT-PCR, y por lo tanto, no es posible detectar niveles de proteína por debajo del límite que permite la técnica.

## **ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA IL-10 EN CARCINOMAS HPV-16 POR INMUNOHISTOQUÍMICA**

Para identificar en los tejidos cuales células producen IL-10, se analizó las muestras de tejido con alta expresión de RNAm por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal contra la IL-10 humana. En dos muestras, las células neoplásicas fueron inmunoreactivas para IL-10, mas aún en las mismas biopsias, las células coilocíticas displásicas también mostraron una intensa inmunoreactividad citoplásmica ( Fig. No. 18 A y B ). En contraste, en los infiltrados linfocitarios, ninguna de las cinco biopsias fueron positivas para IL-10. Nosotros encontramos una alta correlación entre la inmunotinción de IL-10 y la expresión de RNAm de IL-10, debido a que dos carcinomas inmunoreactivos para IL-10, también mostraron altos niveles de expresión de RNAm para esta citoquina por RT-PCR. Estos resultados indican que las células epiteliales infectadas y transformada por HPV-16, son las que producen IL-10.

## **EXPRESION DE CITOQUINAS EN LÍNEAS CELULARES DE CÉRVIX TRANSFORMADAS CON HPV**

Los datos anteriores muestran que las propias células tumorales del cérvix producen IL-10 y dado que algunas células epiteliales pueden producir algunas citoquinas decidimos analizar su expresión en líneas celulares derivadas de cérvix transformadas con HPV ( Hela, SiHa y CasKi ). Se encontró que las líneas celulares epiteliales expresan unicamente INF- $\gamma$  de las citoquinas TH1 ( Fig. No. 19A ), mientras que de las citoquinas TH2, las células epiteliales expresan niveles considerables de IL-10 y IL-7 ( Fig. No. 19B ). Por lo que respecta a las citoquinas inflamatorias se encontró una considerable expresión de IL-6, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  ( Fig. No. 19C ). Estos datos confirman lo encontrado en los tumores en relación a que las células epiteliales transformadas por el HPV expresan IL-10, aunque las líneas epiteliales expresan citoquinas inflamatorias que no fueron detectadas en los tumores, como el caso del TNF- $\alpha$  y la IL-6 ( Tabla No. 7 ).

Tabla No. 7 EXPRESION DE CITOQUINAS EN LINEAS CELULARES TRANSFORMADAS CON HPV 16 Y 18

LÍNEA CELULAR	IL-4	IL-5	IL-7	IL-10	INF- $\alpha$	IL-2	IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$	TGF- $\beta$
Hela	-	-	+	+	+++	-	-	++	+++	++
SiHa	-	-	+	+	+++	-	-	++	+++	++
CasKi	-	-	+	++	+++	-	-	++	+++	++

TH-2

TH-1

Inflamatorias

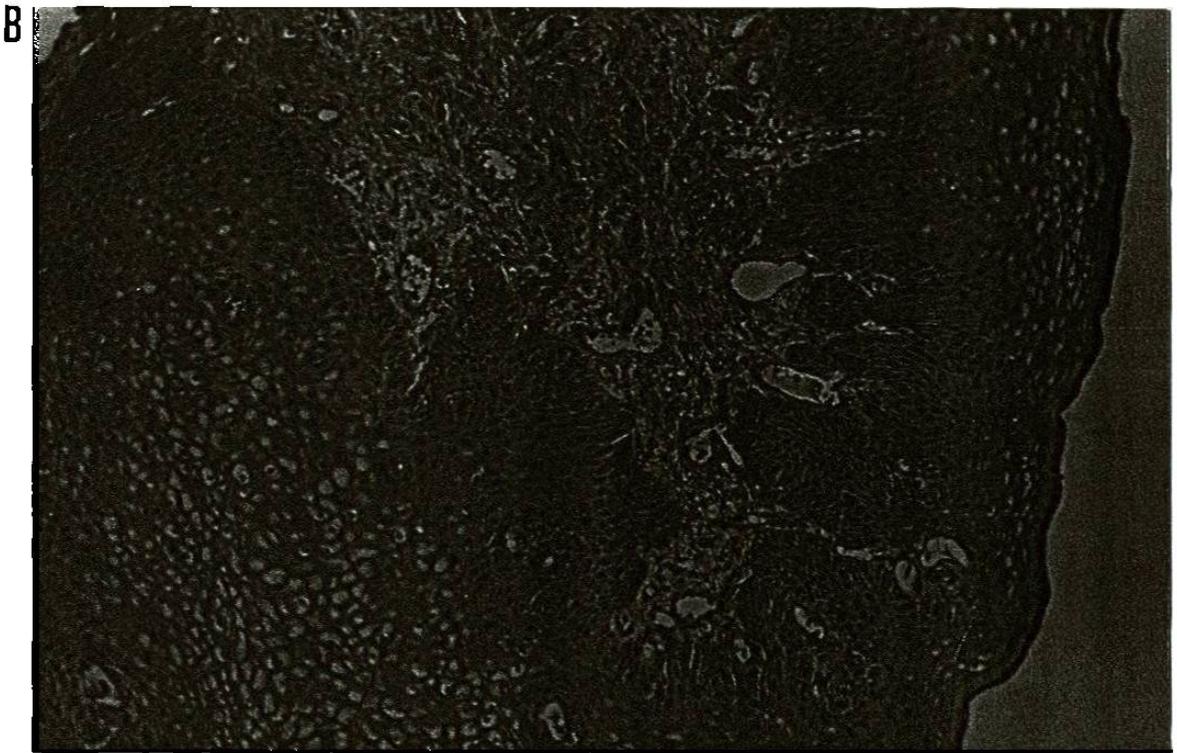
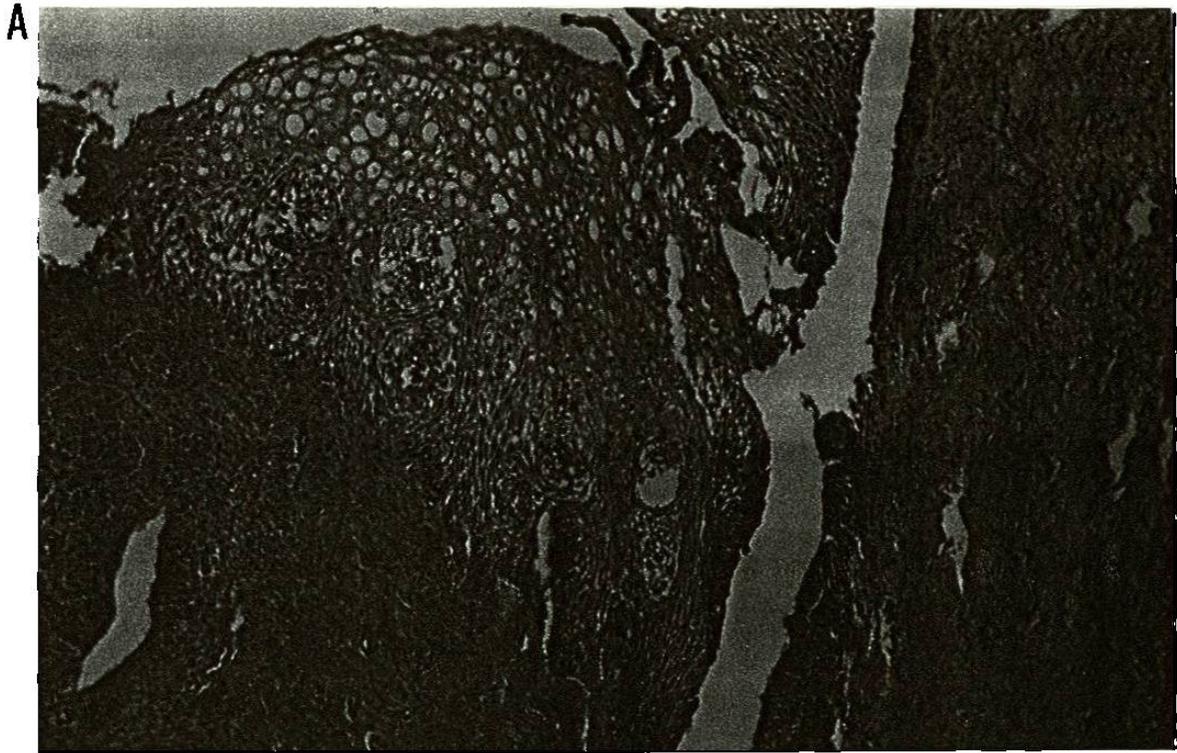


Figura No. 1 Fotografía de un corte histológico obtenido de una biopsia con neoplasia intraepitelial cervical grado III ( A ) y cancer cervical grado IIIb ( B ) teñido con hematoxilina y eosina.

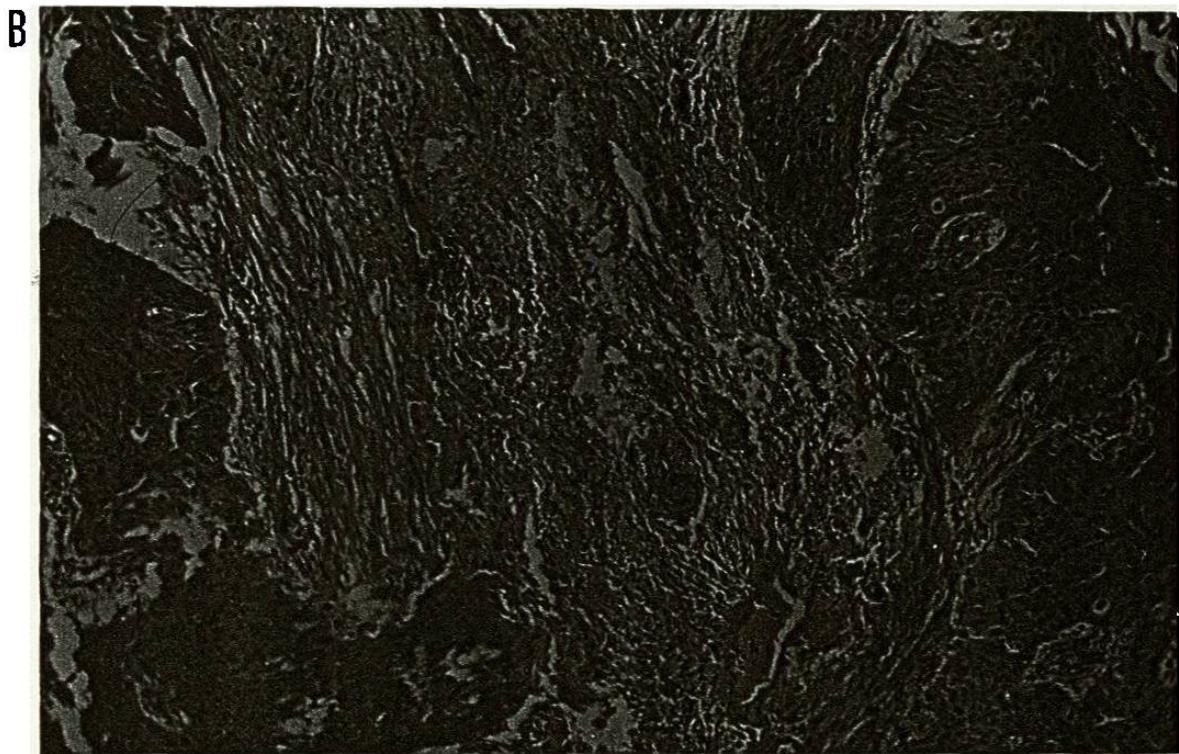
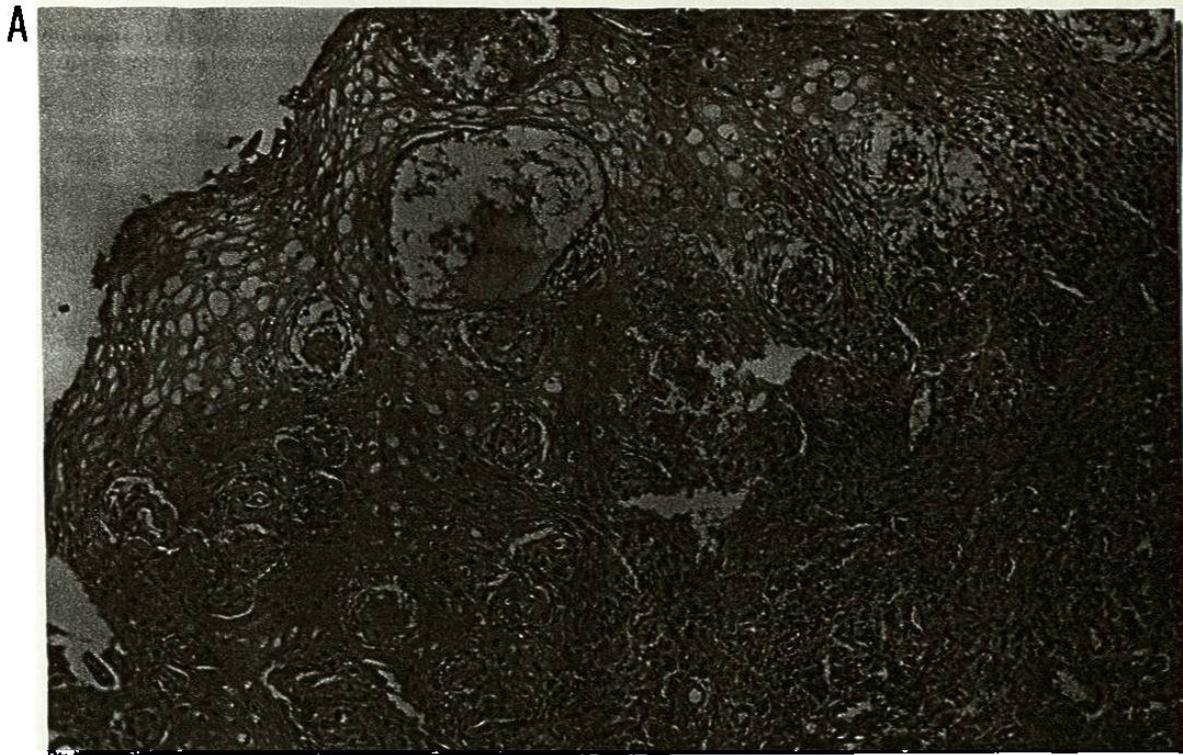
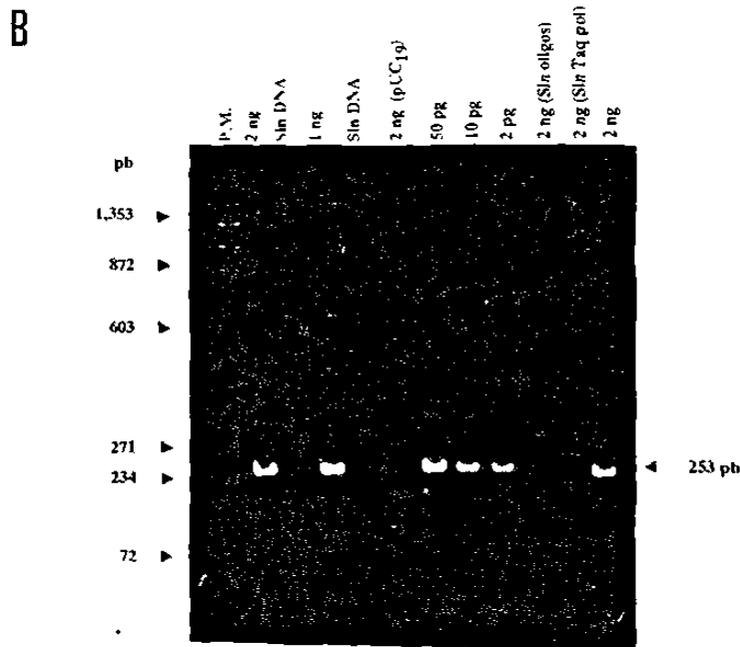
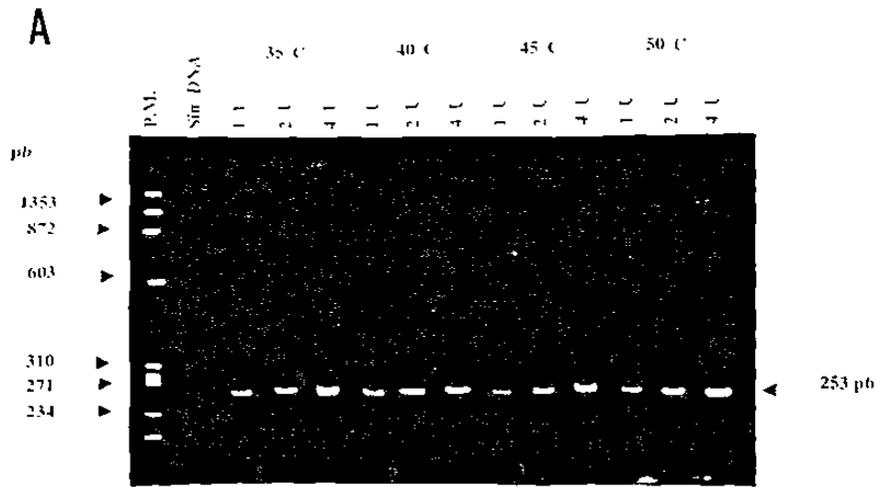
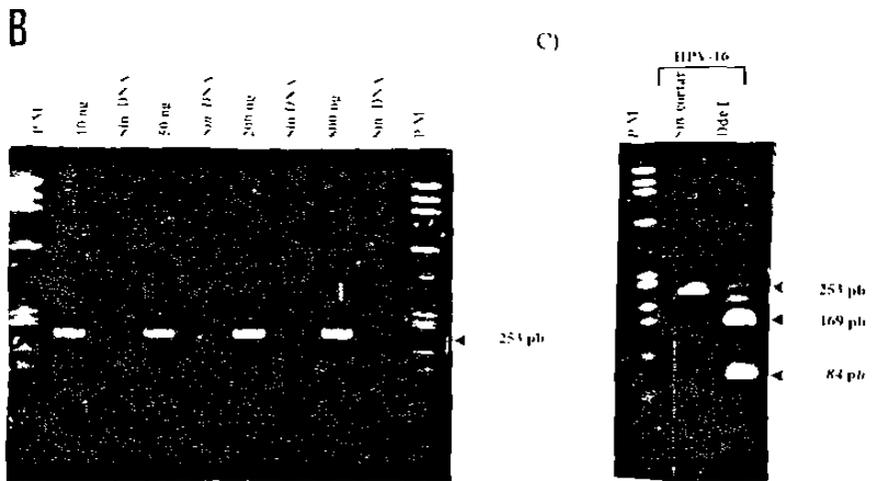
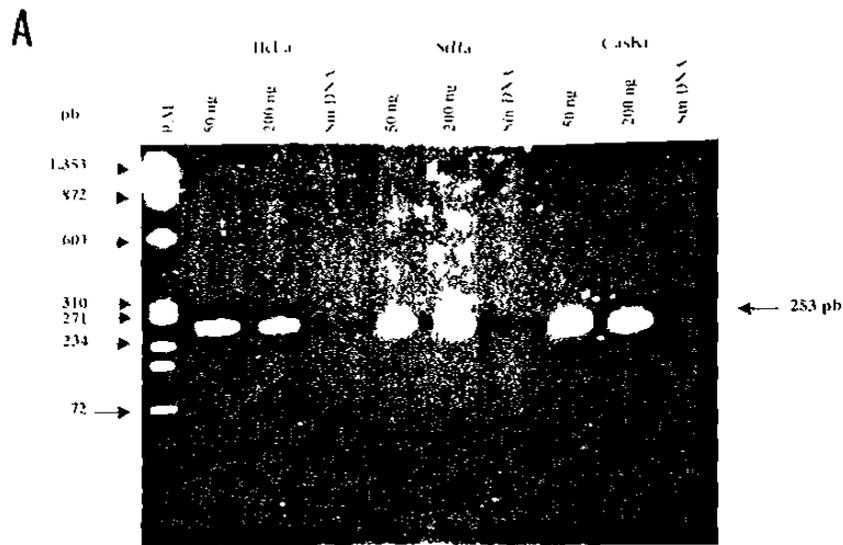


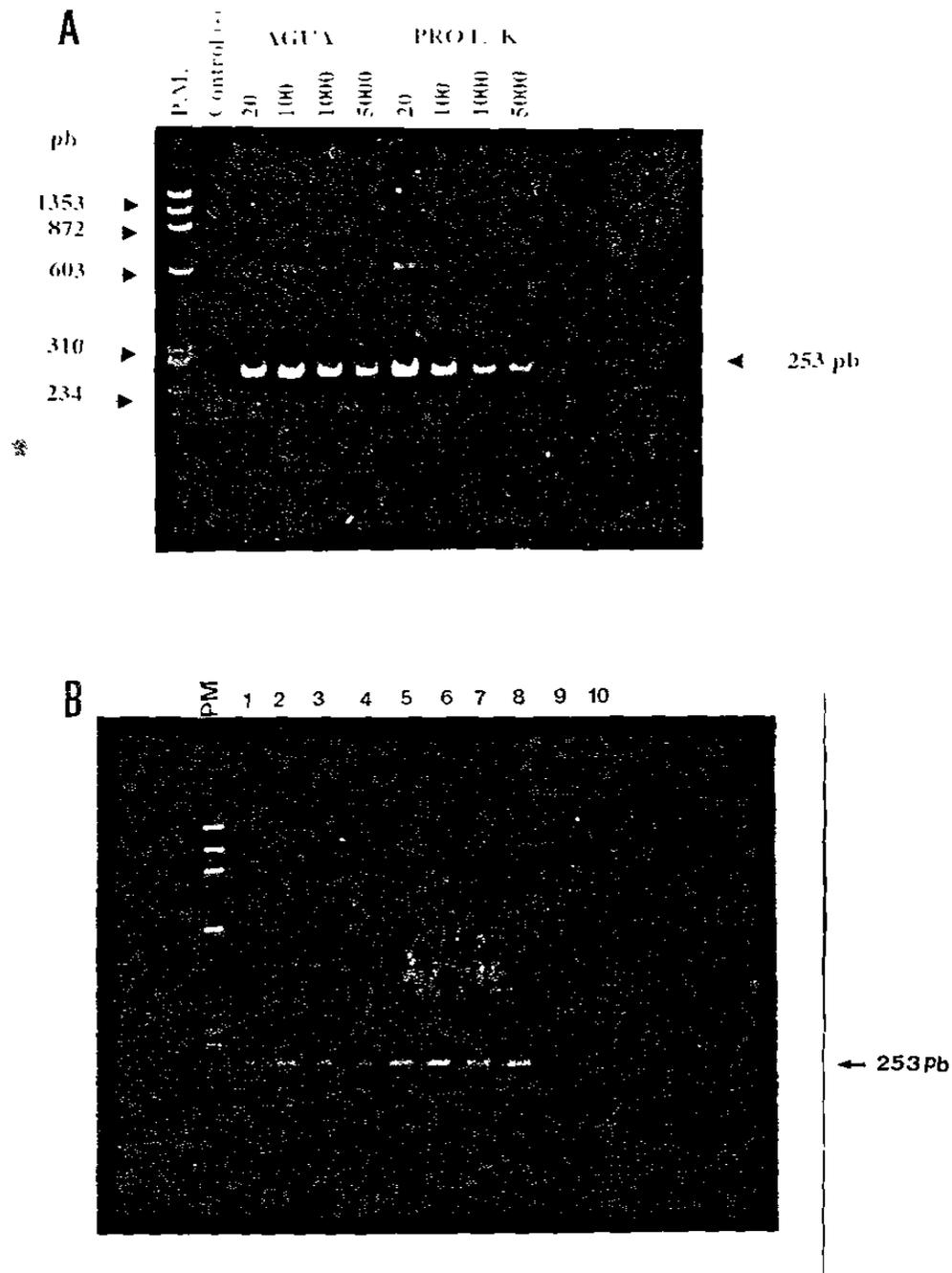
Figura No. 2 Fotografía de un corte histológico obtenido de una biopsia con cancer cervical grado IIb ( A ) y cancer cervical grado IVb ( B ) teñido con hematoxilina y eosina.



**Figura No. 3** Detección de secuencias genómicas de papilomavirus mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la region L1. Analisis del efecto de varias concentraciones de enzima y el numero de ciclos en el proceso de amplificación ( **A** ), Concentración mínima de DNA de HPV en plasmido que puede ser amplificada ( **B** ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 4** Detección de secuencias genómicas de papilomavirus 16 y 18 en líneas celulares derivadas de cervix mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la región L1. Amplificación de HPV en HeLa, SiHa y CasKi ( A ), Concentración mínima de DNA de HPV en células HeLa que puede ser amplificado y restricción del producto amplificado de 253 pb con DdeI ( B ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 5** Detección de secuencias genómicas de papilomavirus en raspados cervico-vaginales mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la region L1. Amplificación de HPV en muestras tratadas con agua a 100°C y proteinasa K ( **A** ), Amplificación de HPV apartir del DNA obtenido por tratamiento con proteinasa K en diversas muestras de raspados cervico-vaginales ( **B** ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

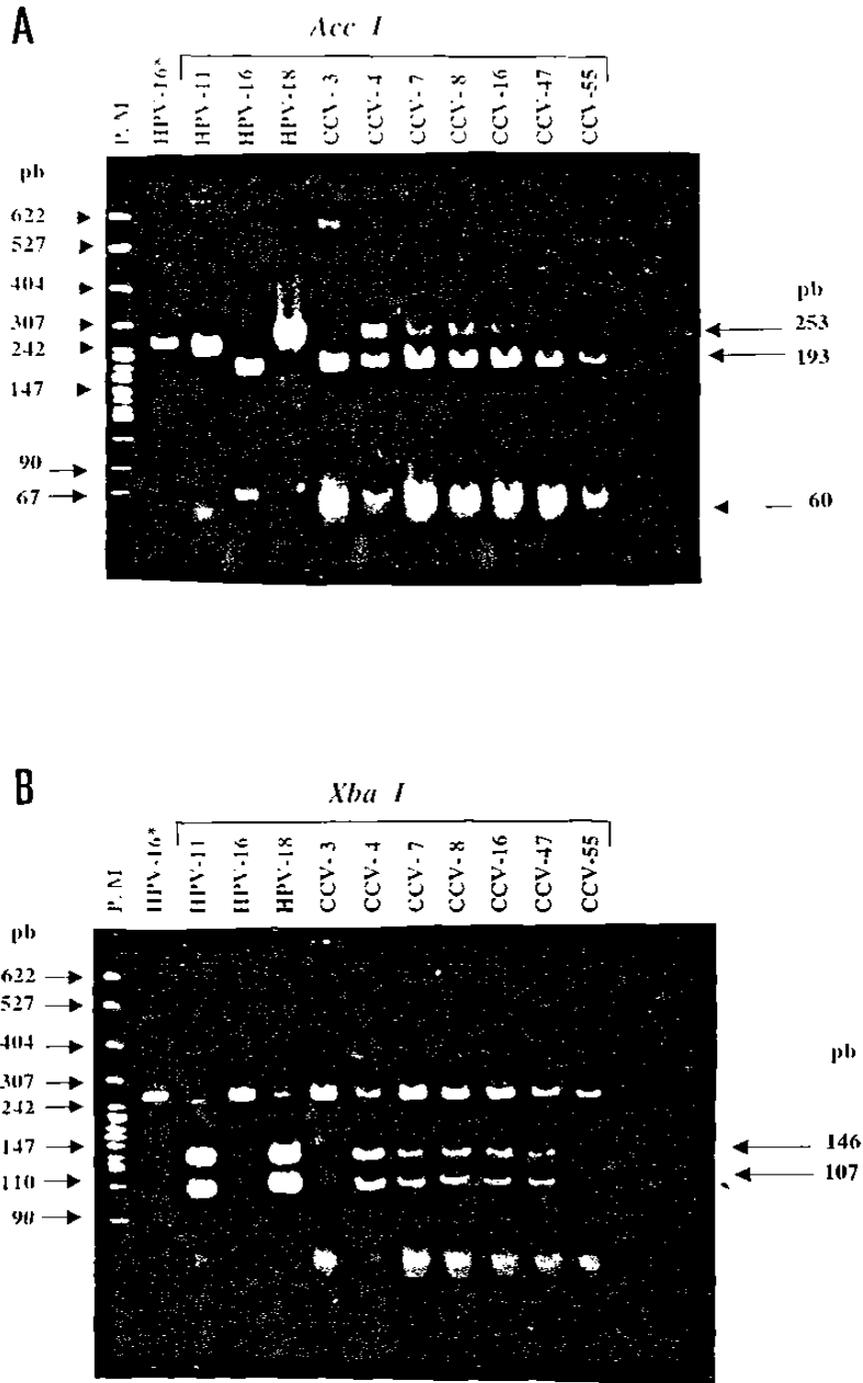
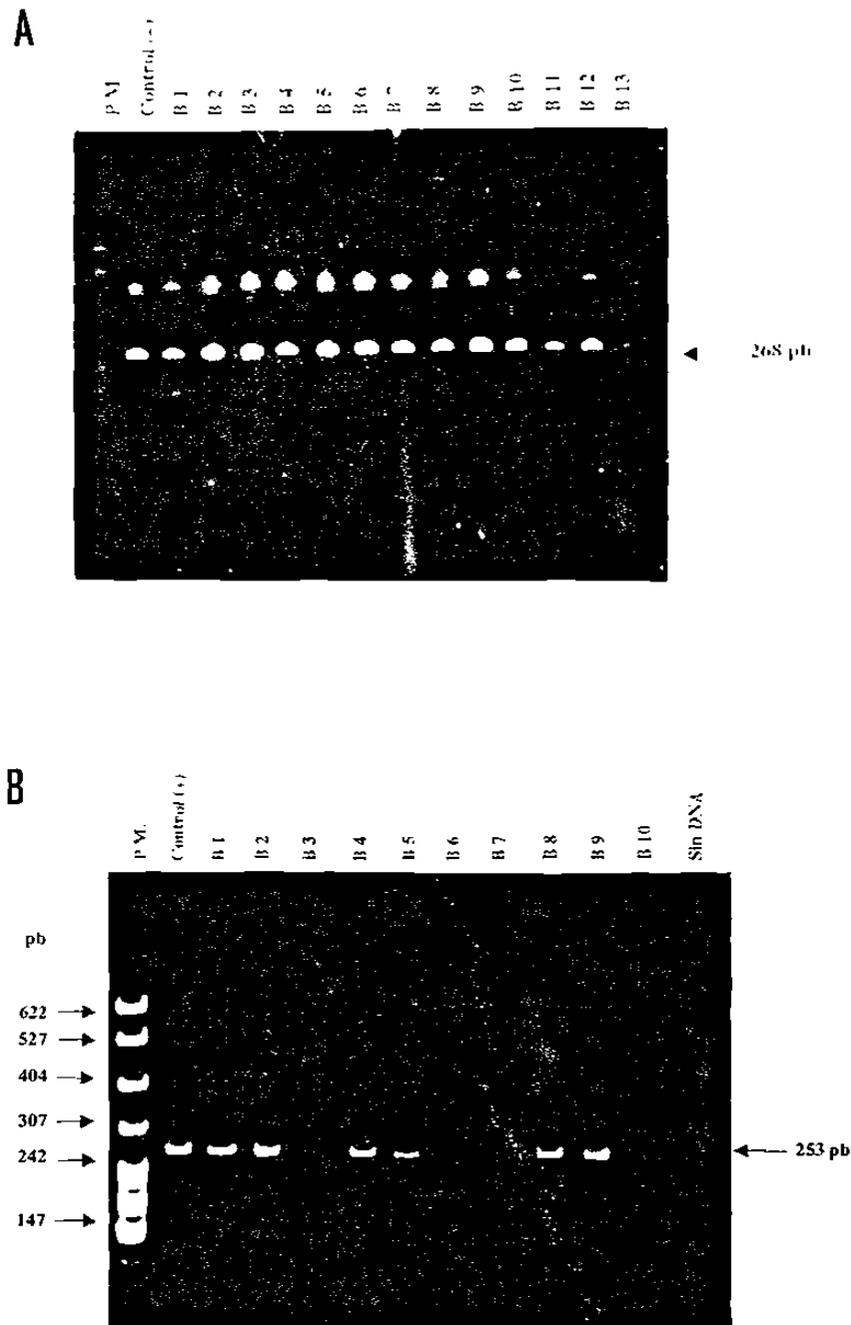
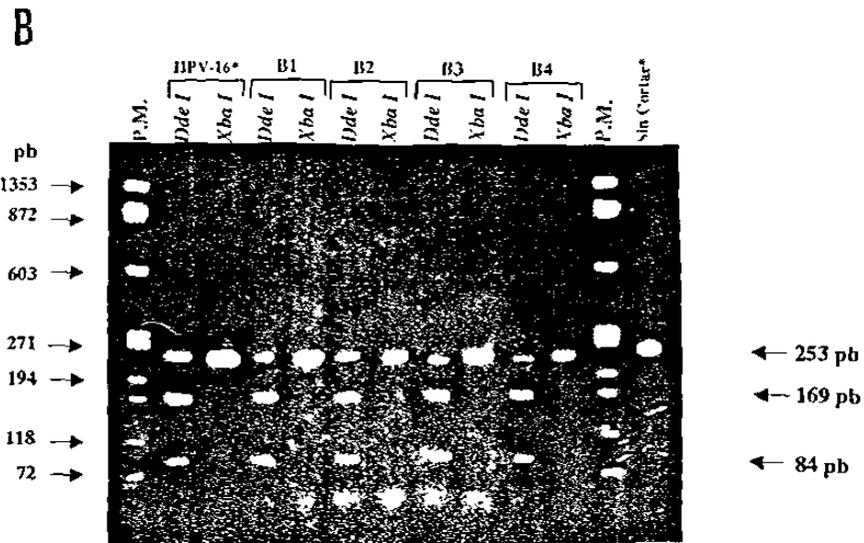
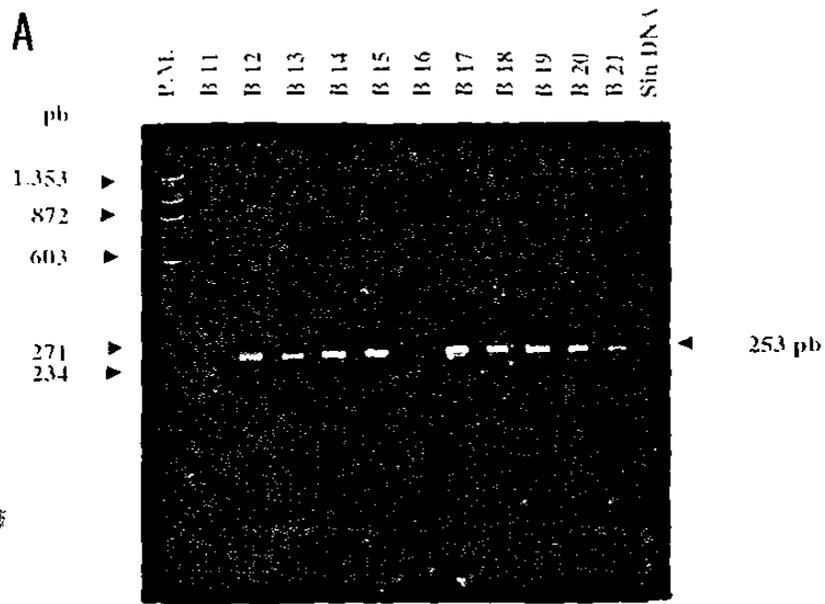


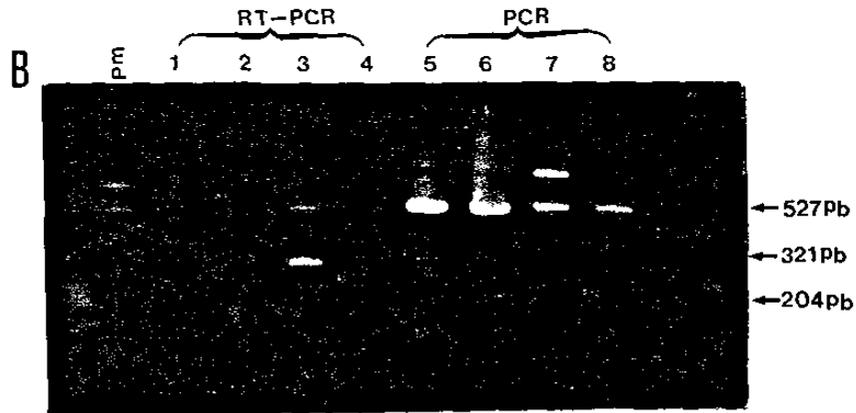
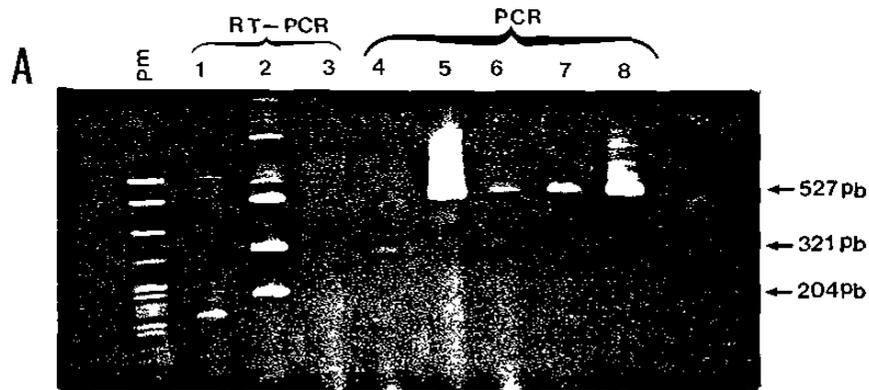
Figura No. 6 Detección de secuencias genómicas de papilomavirus en raspados cervico-vaginales mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la region L1. Identificación del tipo viral mediante restricción del fragmento de 253 pb con la enzima *AccI* ( A ), identificación del tipo viral mediante restricción del fragmento de 253 pb con la enzima *XbaI* ( B ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



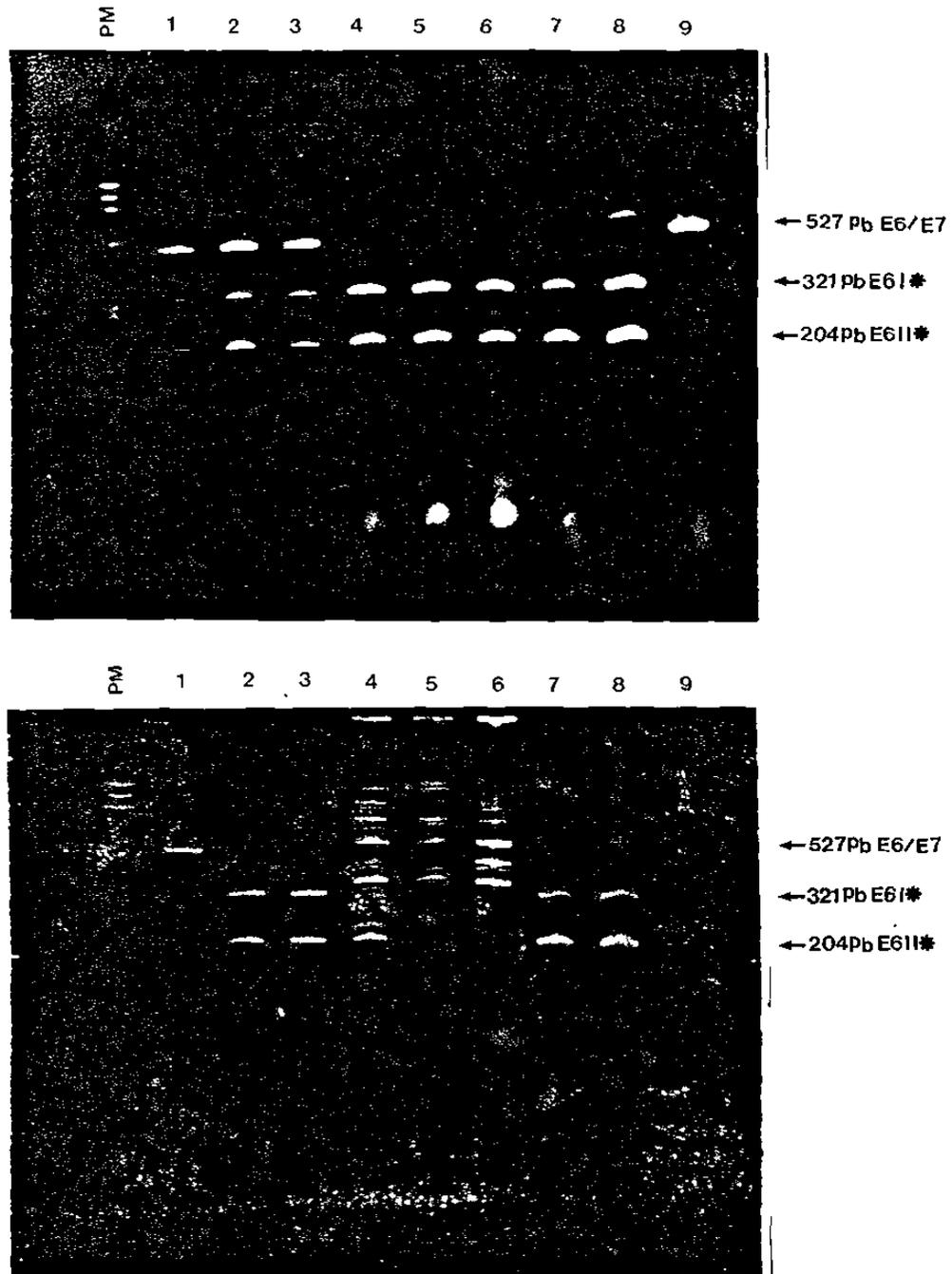
**Figura No. 7** Detección de secuencias genómicas de papilomavirus en biopsias de tejido cervical mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la region L1. Amplificación del gene de  $\beta$ -globina en biopsias de la 1-13 ( fragmento de 268 pb ) ( **A** ), Amplificación de HPV en biopsias de la 1-10 ( fragmento de 253 pb ) ( **B** ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 8** Detección de secuencias genómicas de papilomavirus en biopsias de tejido cervical mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando iniciadores consenso para la region L1. Amplificación de HPV en biopsias de la 11-21 (fragmento de 253 pb) (A), identificación del tipo viral mediante restricción del fragmento de 253 pb con las enzimas DdeI y XbaI (B). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gels de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 9** Expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 en líneas celulares epiteliales de cervix mediante RT-PCR. ( **A** ) Expresión de E6/E7, E6 y E7 en células Hela (2), SiHa (3), CasKi (4) y PCR en plásmidos conteniendo la región E6/E7 de HPV 16, pGEM E6/E7 (6), pUCHPV16 (7), pGEM HPV16/1.7 (8), pUCE6/E7 (9). ( **B** ) Expresión de E6/E7, E6 y E7 en células U-937 (2), Jurkat (3), SiHa (4), Hela (5) y PCR plásmidos conteniendo la región E6/E7 de HPV 16, pGEM E6/E7 (6), pUCHPV16 (7), pGEM HPV16/1.7 (8), pUCE6/E7 (9). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 10** Expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de E6 y E7 en ocho biopsias de tejido cervical, las biopsias en carriles 2,3,4 y 9 presentan expresión de los tres transcritos y las biopsias en los carriles 5,6,7 y 8 solo expresan los transcritos de E6 y E7. ( B ) Expresión de E6 y E7 en nueve biopsias de tejido cervical, las biopsias en carriles 2,5, y 9 presentan expresión de los tres transcritos y las biopsias en los carriles 3,4 y 8 solo expresan los transcritos de E6 y E7. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

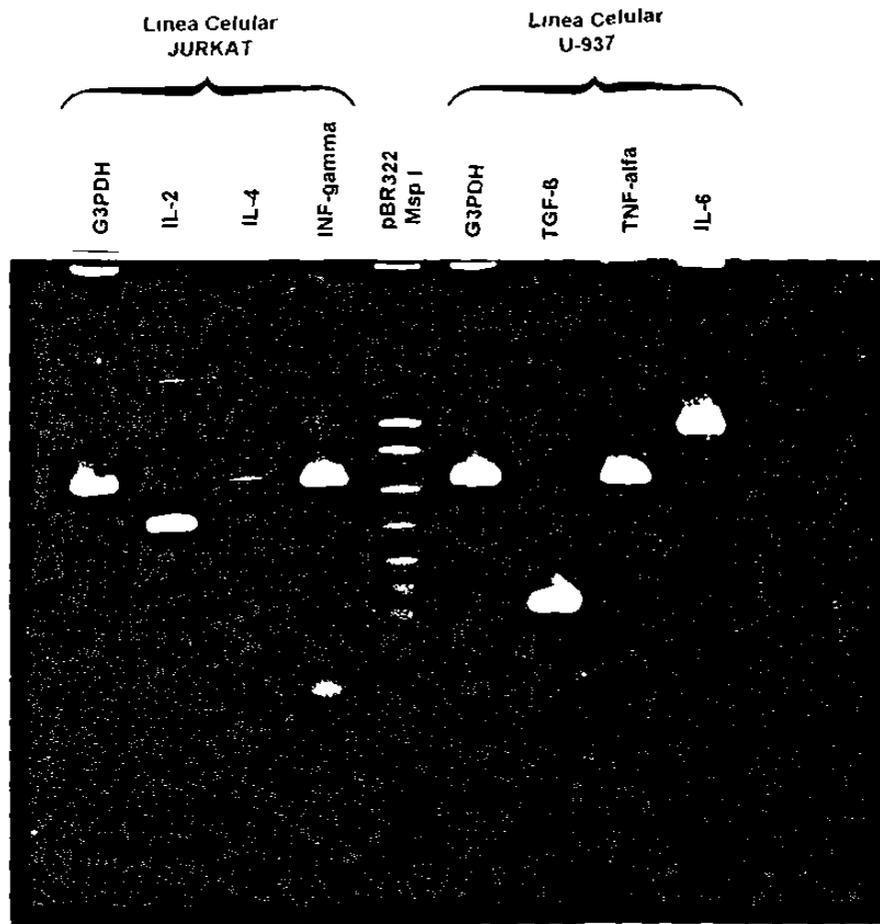
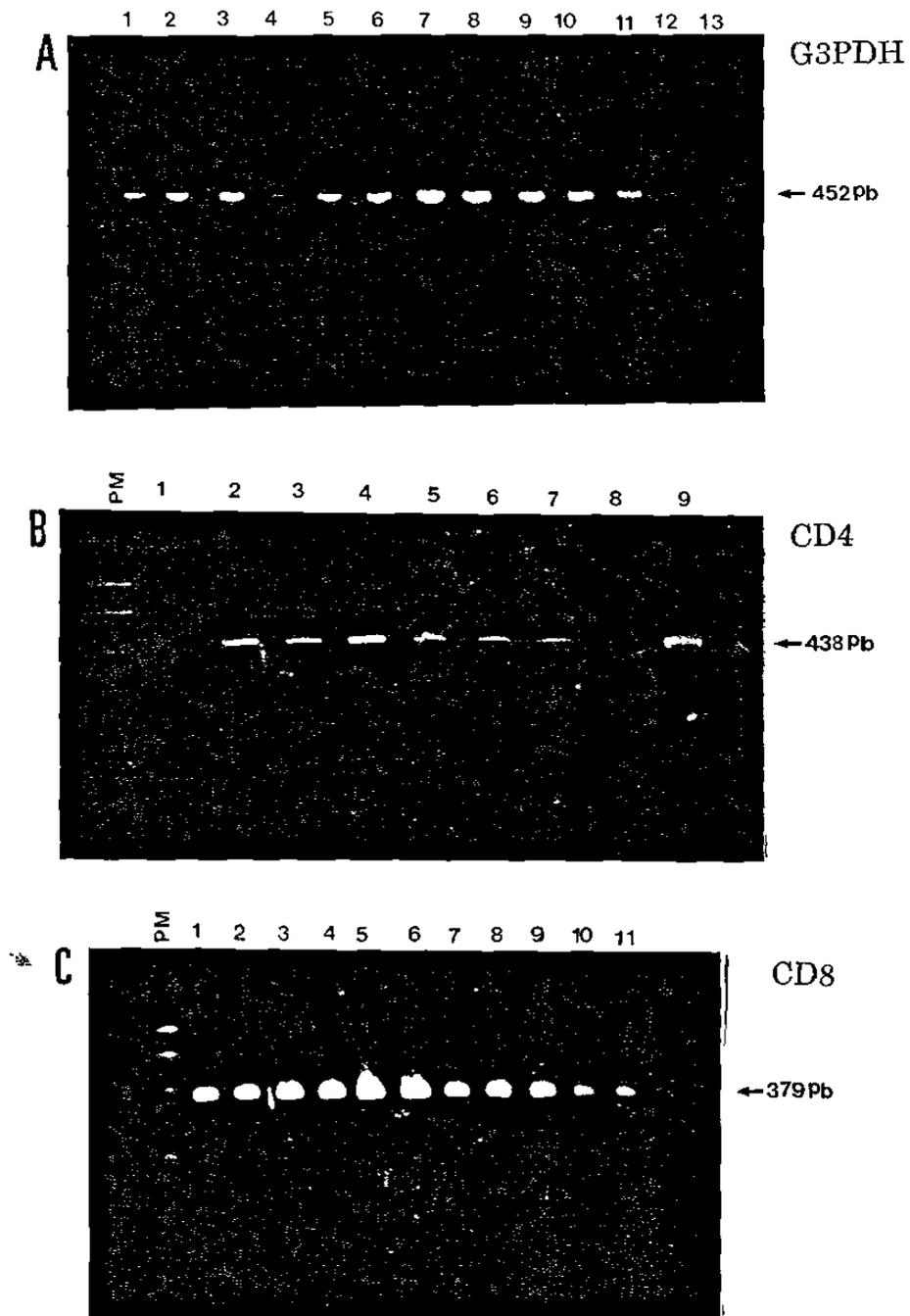


Figura No. 11 Expresión de citoquinas en las líneas celulares Jurkat y U-937 mediante RT-PCR. Expresión de G3PDH, IL-2 e INF- $\gamma$  en células Jurkat y expresión de G3PDH, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6 en células U-937. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 12** Expresión de marcadores de linfocitos T en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de G3PDH ( 452 pb ), ( B ) Expresión de CD4 ( 438 pb ), ( C ) Expresión de CD8 ( 379 pb ) en biopsias de cancer cervical. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

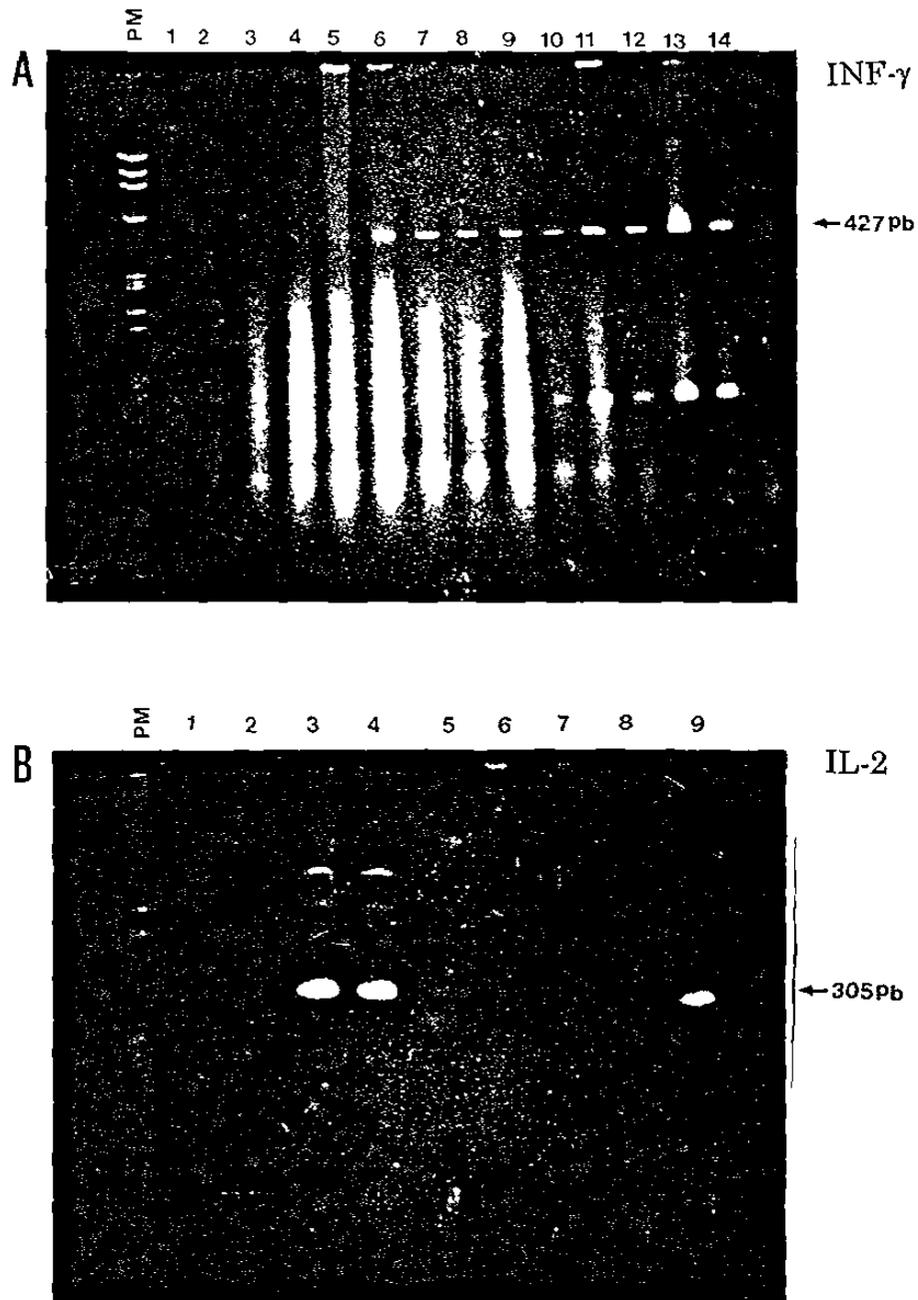


Figura No. 13 Expresión de citoquinas TH1 en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de INF- $\gamma$  ( 427 pb ), ( B ) Expresión de IL-2 ( 305 pb ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

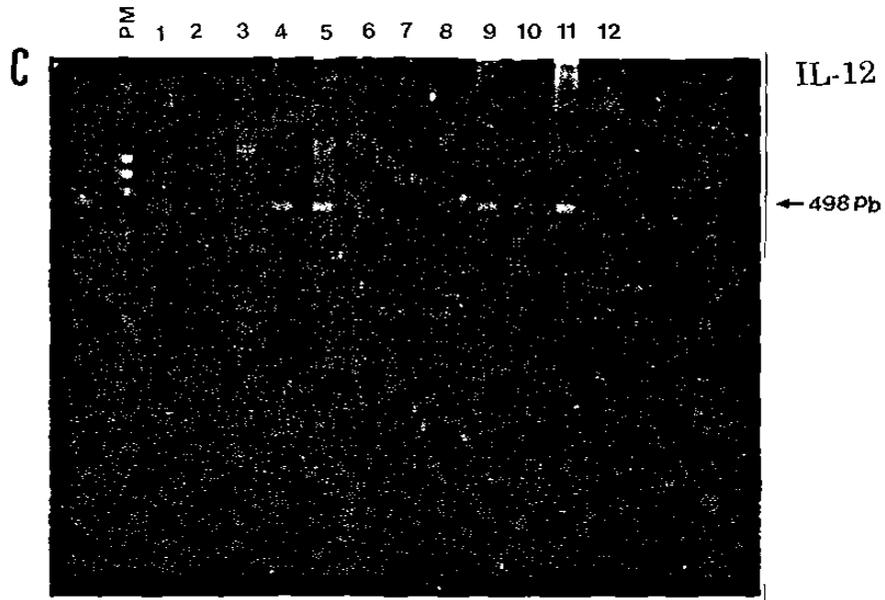


Figura No. 13 Expresión de citoquinas TH1 en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( C ) Expresión de IL-12 ( 498 pb ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

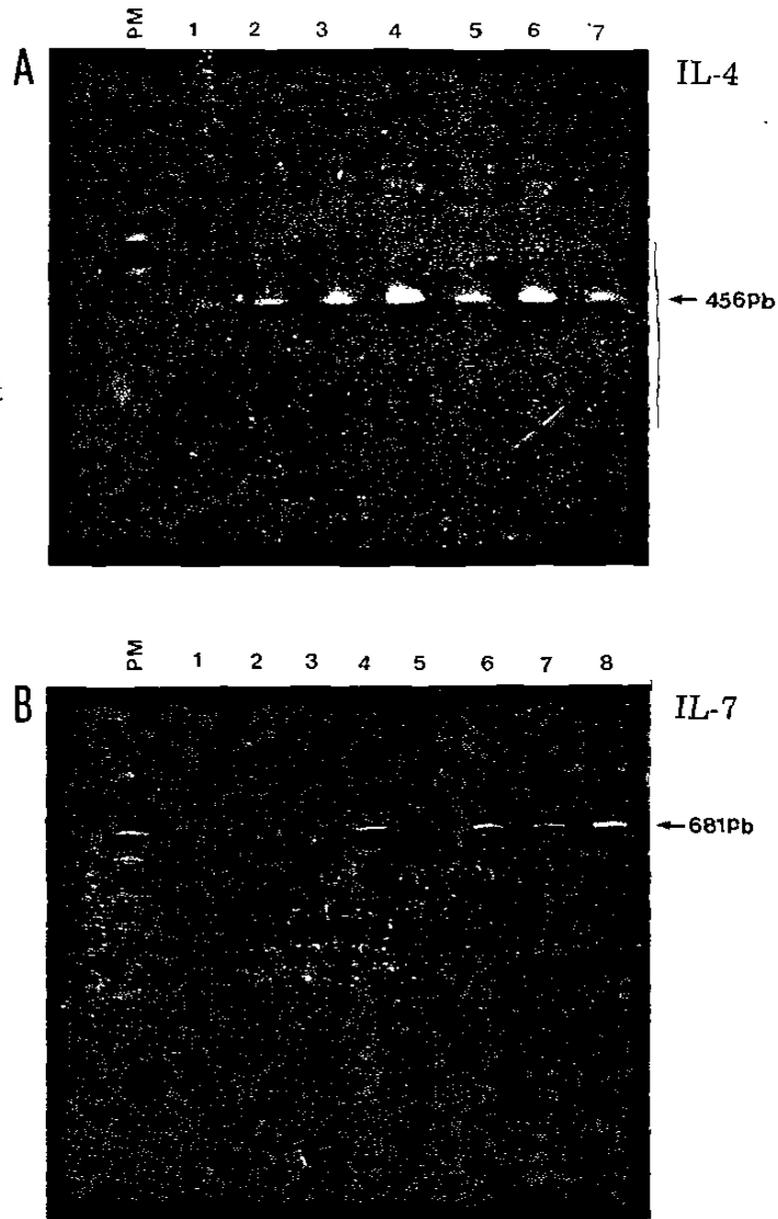
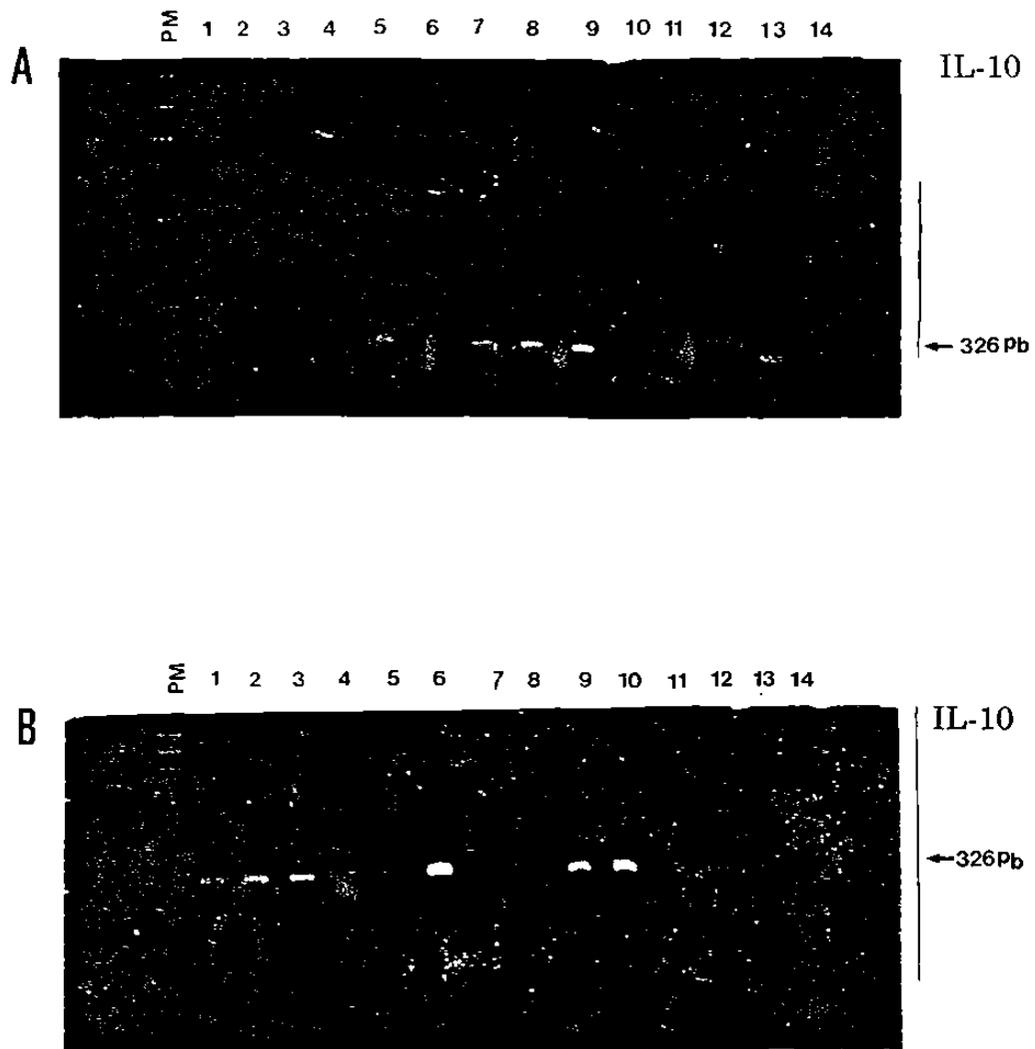
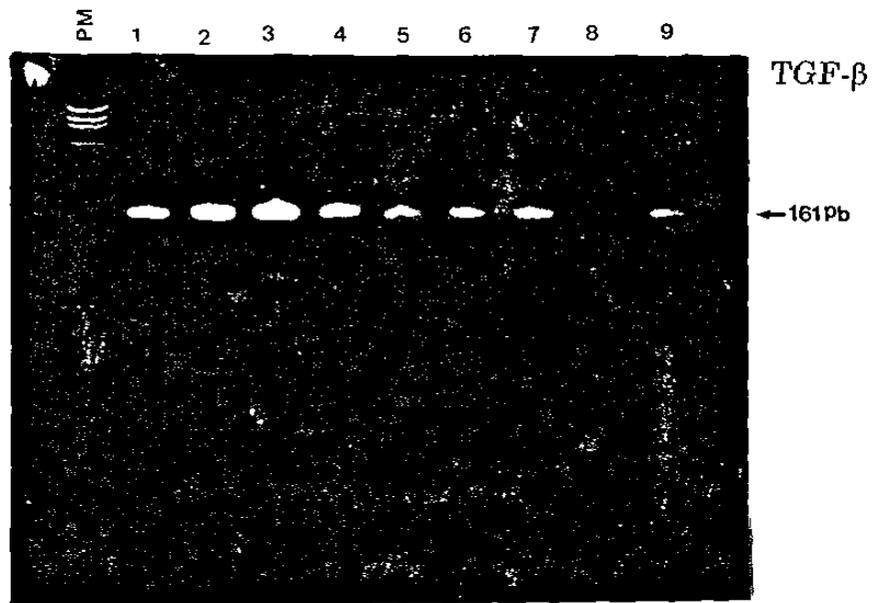


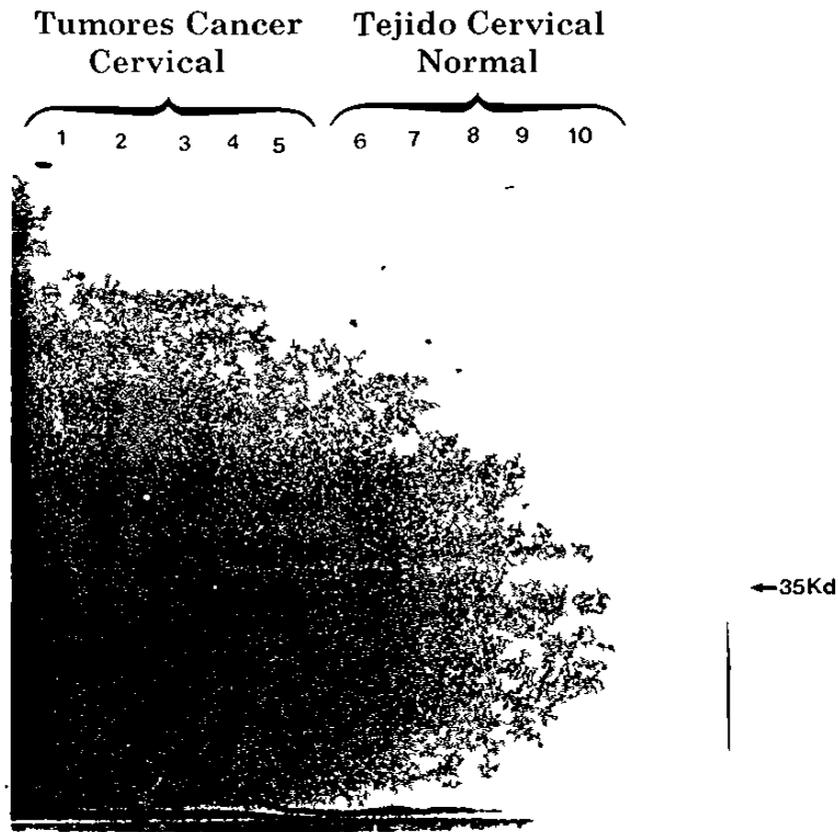
Figura No. 14 Expresión de citoquinas TH2 en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de IL-4 ( 456 pb ), ( B ) Expresión de IL-7 ( 681 pb ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gels de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 15** Expresión de citoquinas TH2 en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) y ( B ) Expresión de IL-10 ( 326 pb ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 16** Expresión de citoquinas inflamatorias en biopsias de cancer cervico-uterino mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de TGF- $\beta$  ( 161 pb ). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.



**Figura No. 17** Detección de la proteína de IL-10 por inmunoelectrotransferencia en biopsias de cancer cervico-uterino. Las proteínas totales obtenidas de las biopsias fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12 % y transferidas a membranas de nitrocelulosa. La detección de IL-10 con un anticuerpo monoclonal mostro una sola banda de 35 Kd. Del carril 1-5 son muestras de cancer cervical y del carril 5-10 son muestras de tejido normal de cervix.

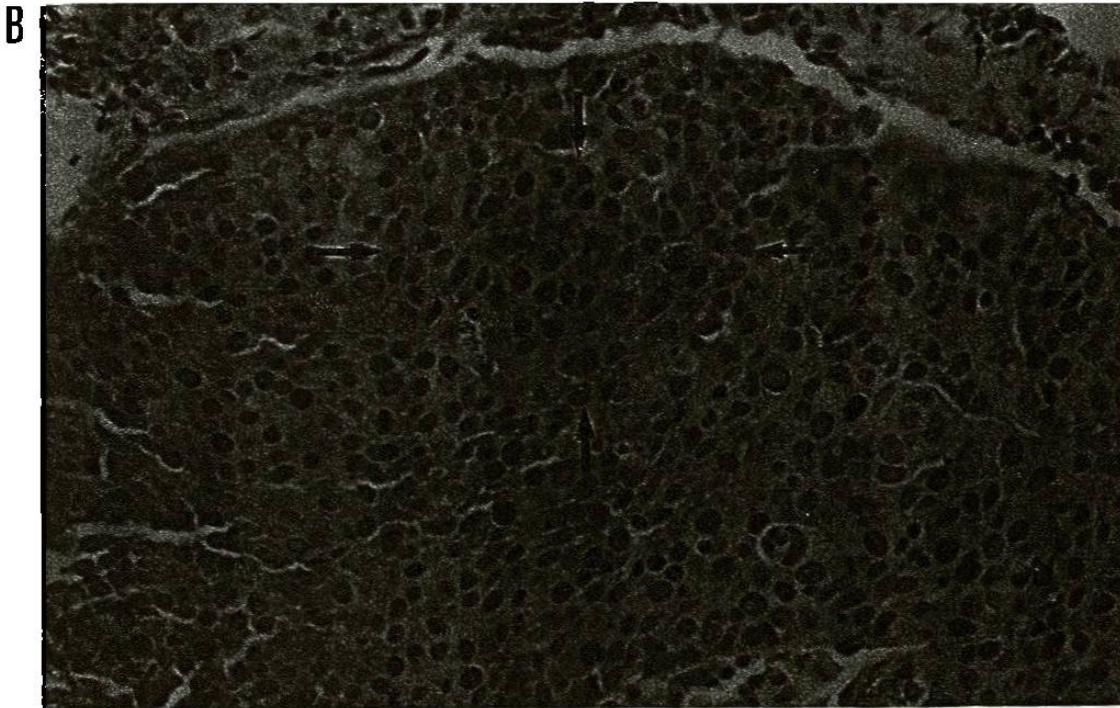
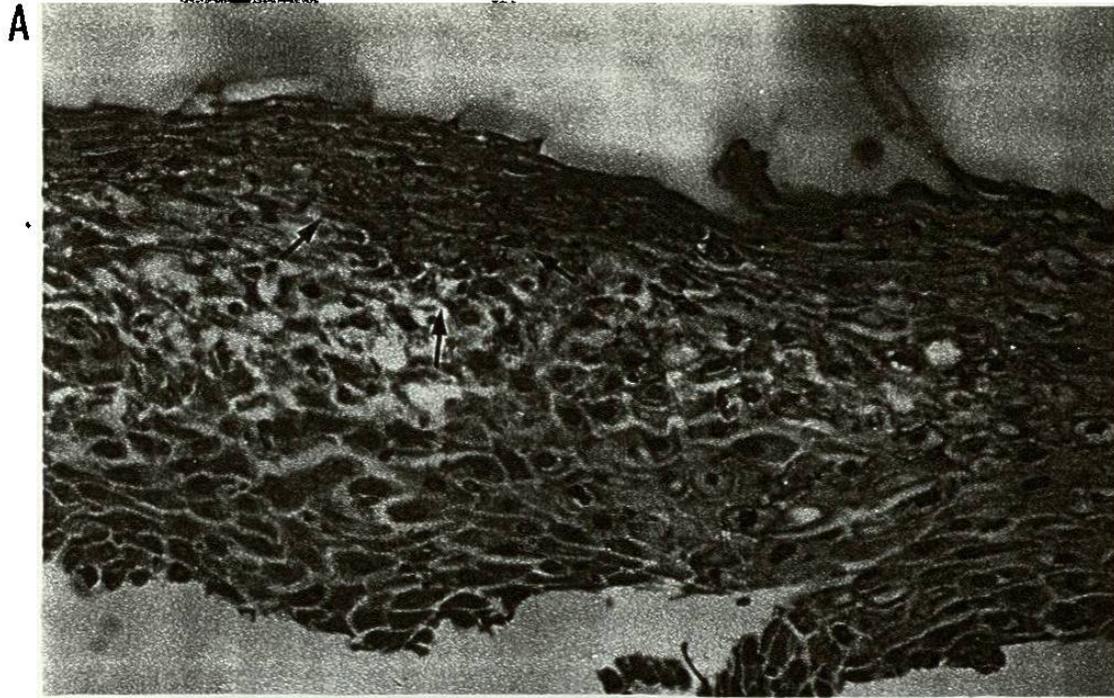
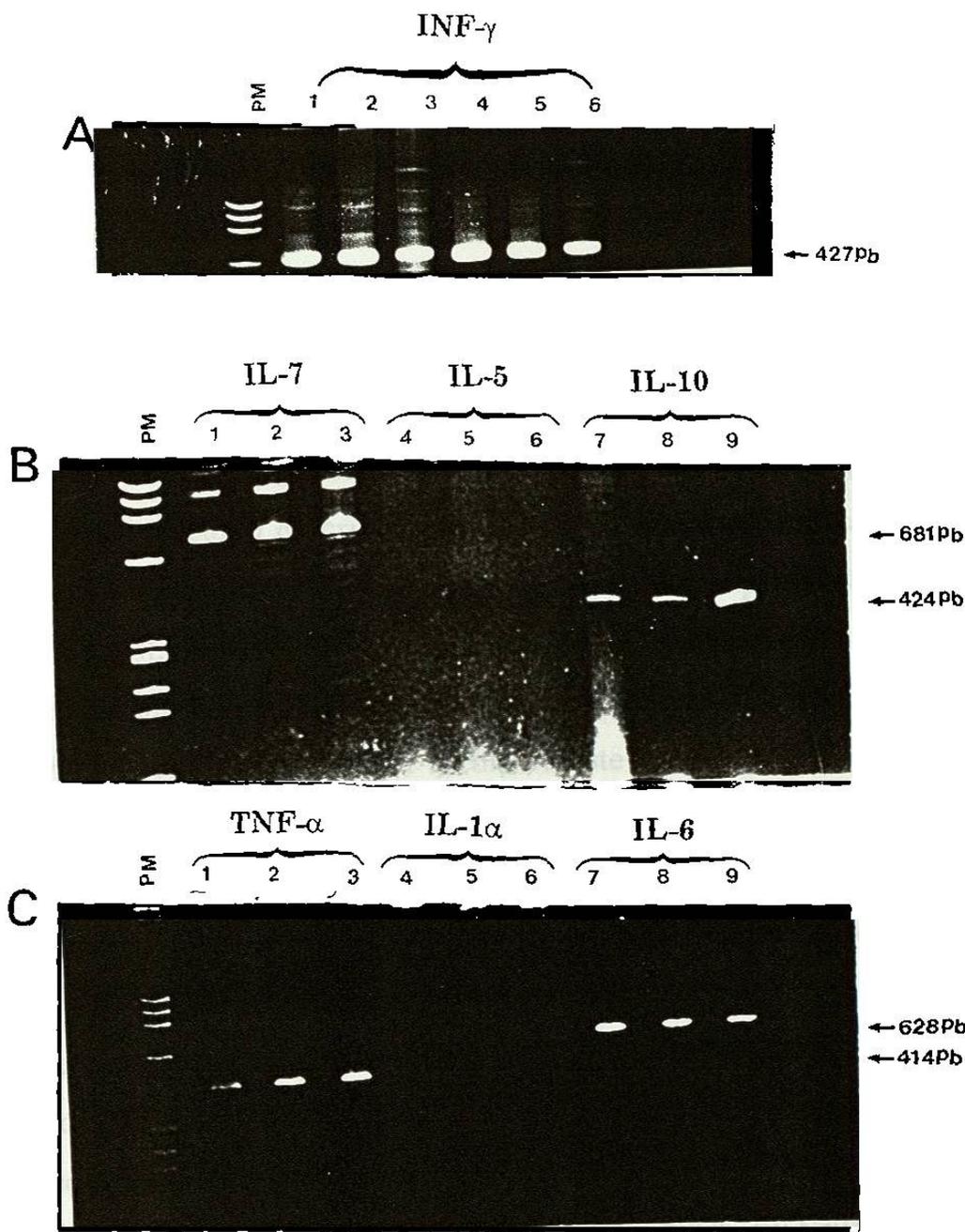


Figura No. 18 Detección de la proteína de IL-10 mediante inmunohistoquímica en dos biopsias de cáncer cervico-uterino. ( A ) tinción citoplasmática de IL-10 en células coilocíticas. ( B ) Tinción citoplasmática de IL-10 en células tumorales, las flechas señalan la presencia de un grupo de células tumorales con mayor tinción.



**Figura No. 19** Expresión de citoquinas en las líneas celulares derivadas de cervix transformadas con HPV 16 y 18 mediante RT-PCR. ( A ) Expresión de  $INF-\gamma$  en células HeLa (carriles 2 y 5), SiHa (carriles 3 y 6) y CasKi (carriles 4 y 7). ( B ) Expresión de IL-5, IL-7 e IL-10. ( C ) Expresión de  $TNF-\alpha$ , IL-1 e IL-6. En B y C los carriles 2, 5 y 8 son células HeLa, los carriles 3, 6 y 9 son células SiHa y los carriles 4, 7 y 10 son CasKi. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % y teñidos con bromuro de etidio.

## DISCUSION

Para la fase inicial del estudio fue necesario establecer un método altamente sensible y específico que requiera de una pequeña cantidad de material biológico para la detección de los papilomavirus que infectan el tracto genital. Se han descrito varias técnicas para determinar la presencia de HPV en muestras provenientes del tracto genital ( 179 ). De las opciones señaladas se escogió la técnica de PCR para llevar a cabo la determinación de secuencias genómicas de HPV en biopsias de tejido cervical, basadas en este método hay reportadas varias versiones para la detección de papilomavirus ( 180 ). Sin embargo, se determinó estandarizar un método descrito previamente en el que se utiliza un solo par de iniciadores consenso localizados en la región L1 de los papilomavirus que infectan el tracto genital, con este método la determinación del tipo viral se lleva a cabo mediante un análisis de restricción del producto amplificado obtenido con los iniciadores consenso ( 176 ). Así mediante este proceso se identifica el tipo de HPV presente en una muestra en solamente dos pasos a diferencia de otros métodos donde la identificación del tipo viral se realiza mediante un procedimiento más laborioso de hibridación con oligonucleótidos específicos (181).

Tomando en consideración que el PCR es un proceso multifactorial, que requiere de condiciones altamente reproducibles para confiar en los resultados de la técnica, se planteó una estrategia en varias fases para la estandarización de las condiciones para la amplificación de secuencias genómicas de HPV. En cada una de las fases fue necesario estandarizar las condiciones utilizando muestras de distinta naturaleza, por ejemplo, en la primer fase se usaron secuencias genómicas de HPV 16 clonadas en plásmidos con el propósito de contar con DNA purificado y cuantificado para optimizar las condiciones de amplificación enfocándose

principalmente en la cantidad de enzima, número de ciclos y concentración mínima de DNA que puede ser amplificada. Después de varios experimentos se controlaron las condiciones para lograr amplificar con éxito un fragmento de 253 pb a partir de 2 pg de DNA plásmido usando 2 U de enzima y 35 ciclos de amplificación ( Fig. No. 3A y 3B ), este orden de sensibilidad alcanzado es similar a los reportados previamente ( 179 ).

Se obtuvieron resultados similares cuando se extrapolaron estas condiciones a la siguiente fase para amplificar HPV 16 y 18 a partir de DNA total obtenido de líneas celulares de epitelio cervical transformadas con estos virus. Aunque en este caso el límite de detección de secuencias de HPV fue en 10 ng de DNA total ( Fig. No. 4B ). Así mismo se pudo observar una aparente correlación de la cantidad del producto amplificado con el número de copias de HPV que tiene integrado cada línea celular ( Fig. No. 4A ). Además el producto amplificado de 253 pb puede ser perfectamente cortado con varias enzimas de restricción ( Fig. No. 4B ).

Con el propósito de encontrar un método sencillo para obtener el DNA de las células presentes en los raspados cérvico-vaginales, se implementaron dos formas para tratar las muestras, en la primera las células fueron colocadas a 100 °C y en la segunda las células fueron tratadas con proteínasa K y los sobrenadantes de ambos tratamientos fueron utilizados para la reacción de PCR. Se logró amplificar las secuencias de HPV a partir de 20 células usando ambos métodos de tratamiento. Cuando se utilizaron mayores cantidades de células, se encontró que el producto amplificado disminuye proporcionalmente al incremento en el número de células, este comportamiento de la reacción parece indicar la presencia de un inhibidor de amplificación en este tipo de muestras. Aunque la naturaleza del inhibidor no fue caracterizada, es posible que se trate de un alto contenido de polisacáridos y hemoglobina presente en este tipo de muestras, dado que se han reportado que estos compuestos son potentes inhibidores de la reacción de PCR ( 182, 183 ). Aun

bajo estas condiciones se puede detectar secuencias genómicas de HPV por PCR ( Fig. No. 5B ), una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación con etanol puede eliminar los potenciales inhibidores de la restricción del producto amplificado de 253 pb ( Fig. No. 6A y 6B ).

Sin embargo, lo mas importante de estos experimentos radica en que un simple tratamiento a 100 °C de las muestras de raspados cérvico-vaginales es suficiente para determinar la presencia de secuencias de papilomavirus por PCR.

Este sencillo manejo de las muestras puede permitir el procesamiento de una gran cantidad de muestras en un tiempo corto lo cual es requerido para estudios de epidemiología molecular del HPV.

Debido a la presencia de potenciales inhibidores detectados en las muestras de raspados cérvico-vaginales, fue necesario llevar a cabo la amplificación del gene de  $\beta$ -globina en el DNA obtenido de las biopsias de tejido cervical, con el propósito de excluir falsos negativos en la detección de HPV ( Fig. No. 7A ), por ejemplo, las biopsias 3,6,7,11 y 16 fueron negativas a la presencia de HPV, y podrian ser consideradas falsas negativas si no se hubiera realizado previamente la amplificación de  $\beta$ -globina ( Fig. No. 7A, 7B y 8A ).

El producto de la amplificación de HPV obtenido en las biopsias fue en todos los casos de menor concentración, con respecto al tipo de muestras anteriores, por lo que para la identificación del tipo viral por el corte con enzimas de restricción fue necesario llevar acabo una concentración del producto de la reacción obtenido en 50  $\mu$ l de volumen final. solo bajo estas circunstancias se logró obtener suficiente producto de amplificación para realizar el corte con las enzimas de restricción ( Fig. No. 8A y 8B ).

Las condiciones establecidas en las diferentes etapas de la detección de secuencias genómicas de HPV, nos permitieron conocer cuales de las biopsias de cáncer cervical son HPV 16 positivas, de estas se seleccionaron 20 biopsias para

posteriores estudios en base a la positividad de HPV 16 y a la cantidad del tejido obtenido de cada una de ellas ( Tabla No. 2 ).

Después de establecer la presencia de HPV 16 por PCR en las biopsias de cáncer cervical, se llevó a cabo la determinación del estado de expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Para ello se establecieron las condiciones para el análisis de su expresión por RT-PCR, nuevamente primero se utilizaron las líneas celulares derivadas de cérvix transformadas con HPV 16.

HPV 16 genera tres transcritos policistronicos del marco de lectura abierta de E6-E7, un transcrito grande que corresponde a todo el marco de lectura abierta y dos especies de transcritos generados por procesamiento diferencial que son conocidos como E6I\* y E6II\* , por ello se usaron unos iniciadores diseñados para detectar estos transcritos generados por procesamiento diferencial (184 ).

Los iniciadores detectan por PCR un producto de amplificación de 527 pb usando como controles varios plásmidos que tienen clonados las secuencias de E6-E7 ( Fig. No. 9A y 9B ). En la línea celular SiHa se detectaron por RT-PCR tres transcritos de 527 pb, 321 pb y 204 pb, el fragmento de 321 pb corresponde al transcrito E6I\* y el de 204 pb al transcrito E6II\* ( Fig. No. 9A y 9B ).

El análisis de la expresión de los oncogenes virales en las biopsias de tejido cervical mostró que existe variabilidad en el tipo de transcritos presentes en las muestras, de acuerdo a esto, tres grupos se definieron claramente en cuanto a su estado de expresión. Un grupo pequeño presentó únicamente la expresión del transcrito grande de 527 pb, las muestras fueron dos neoplasias intraepiteliales cervicales y dos tumores de estadio I y II ( Tabla No. 3 ).

Otro grupo pequeño de muestras presentó los tres transcritos, el transcrito grande de 527 pb en una mayor concentración que los otros dos transcritos E6I\* y E6II\* ( Fig. No. 10A y 10B ) ( Tabla No. 3 ). En este grupo todos fueron tumores de

estadios avanzados y la presencia de los tres transcritos puede deberse a la detección simultánea de transcritos procesados y no procesados diferencialmente. Un grupo más amplio de 14 tumores avanzados expresaron exclusivamente los transcritos E6I\* y E6II\*, lo que correlacionó con estadios avanzados de la enfermedad ( Tabla No. 3 ).

La respuesta inmune inducida luego de la infección por papilomavirus, se manifiesta por infiltrados linfoides en la vecindad de lesiones pre-cáncerosas del cérvix, donde están presentes tanto linfocitos B como T, con una mayor proporción de CD8<sup>+</sup> que de CD4<sup>+</sup> ( 92, 93 ). La respuesta inmune celular juega un papel importante en el reconocimiento inicial de la célula neoplásica, y eventualmente en su eliminación, sin embargo se desconoce el papel de los linfocitos infiltrantes presentes en las lesiones producidas por papilomavirus. Varias líneas de evidencia sugieren que la respuesta inmune celular es importante en controlar infecciones y neoplasias inducidas por HPV, por ejemplo, se ha encontrado una mayor prevalencia de infecciones relacionadas con HPV ( infecciones y cáncer ) en receptores de trasplante y en pacientes infectados con HIV, ambos tipos de pacientes tienen afectada la respuesta inmune celular ( 96, 99 ). También se ha observado que las verrugas inducidas por HPV en pacientes que están bajo terapia inmunosupresora desaparecen cuando se suspende el tratamiento. Finalmente se ha observado una gran infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en lesiones producidas por HPV que están bajo regresión espontánea ( 113, 114 ). Recientemente se ha reconocido que la respuesta inmune local desempeña un papel muy importante en el proceso de carcinogénesis cervical, aunque se desconoce el tipo de respuesta efectora que se produce localmente ( 129 ).

La inmunidad mediada por células es regulada por citoquinas que son secretadas por los linfocitos TH y pueden ser clasificados como TH1 y TH2 en base a los

diferentes tipos de citoquinas que producen ( 185 ), la protección mediada por linfocitos T de infecciones virales, así como del control de tumores es mediada por respuestas de citoquinas tipo TH1, mientras que las respuestas de citoquinas tipo TH2 generalmente bloquean ó favorecen estos procesos, de esta forma las citoquinas TH1 y TH2 juegan un papel importante en enfermedades infecciosas y cáncer ( 186 ).

Estas citoquinas se sintetizan en pocas cantidades y se requieren cantidades en nanogramos-picogramos para ejercer su función. Su detección en tejidos es muy problemática, por el nivel de detección requerido, la presencia de inactivadores ó bloqueadores y el tamaño de la muestra, por lo que para estudios de detección de citoquinas en tejidos tumorales se recurre regularmente a analizar la expresión del RNAm que codifican para las citoquinas por medio de RT-PCR.

Las condiciones para determinar la expresión de diversas citoquinas se estandarizaron con dos líneas celulares, donde se logró amplificar eficientemente el mensaje de varias de ellas ( Fig. No. 11 ). En los tejidos la mayoría de las muestras de CaCu HPV-16+, fueron negativas en la expresión de citocinas TH1 (IL-2 e IL-12) ( Tabla No. 1 y 2 ), baja expresión de INF- $\gamma$  y mostraron expresión preferencial de citocinas tipo TH2 (IL-4 e IL-10) ( Tabla No. 1 y 2 ). La expresión preferencial de citoquinas tipo TH2 en el microambiente del tumor puede ser la responsable de regular negativamente algunos de los principales mecanismos de la respuesta inmune celular local contra HPV ( 187 ). Una desminución similar en la respuesta de citoquinas tipo TH1 con un predominante perfil de citoquinas TH2 ha sido encontrado en pacientes con varias neoplasias, carcinoma broncogenico (188 ), carcinoma de células renales ( 189 ), carcinoma de células basales ( 190 ), linfoma (191 ), glioma ( 192 ), melanoma ( 193, 194 ) y cáncer de pulmon ( 195 ), estos datos parecen asociar la presencia de un patrón de citoquinas TH2 con el desarrollo de la neoplasia, a través de un mecanismo de evasión de la respuesta

inmune en el microambiente del tumor, como fue establecido para dos tumores epiteliales ( 188, 190 ). Tomando en consideración el importante papel biológico de la IL-10 analizamos el origen celular de la expresión de IL-10 en los tumores de CaCU y los datos por inmunohistoquímica indicaron que son las propias células epiteliales transformadas por el virus ( Fig. No. 18 A y B ), se desconoce si juegan algún papel las proteínas del virus en la producción de IL-10 en células epiteliales transformadas por HPV o si la producción de IL-10 es debida a un epifenómeno posterior a la producción inducida por HPV. La consecuencia biológica de la producción en el epitelio cervical de IL-10 es mediar algunos eventos que generan alteraciones en la respuesta inmune en el microambiente del tumor, por ejemplo, puede ser la responsable de atraer en su mayoría a los linfocitos CD8<sup>+</sup> que infiltran el epitelio ( 196 ), puede inhibir algunas funciones de los linfocitos infiltrantes, como por ejemplo, inhibir la producción de citoquinas en linfocitos T ( 197 ), o a través de inhibir la presentación de antígenos específicos del tumor en células epiteliales presentadoras de antígeno ( 198 ), o inhibiendo la actividad co-estimuladora ( 199 ), puede inducir en los linfocitos T un estado de anergia local específica de antígenos de tumor ( 200 ), además, puede proteger a las propias células tumorales epiteliales del ataque de los linfocitos T citotóxicos por medio de la inhibición en la expresión de antígenos HLA clase I ( 201 ), lo cual correlaciona con la pérdida de la expresión de estos antígenos que ha sido descrita anteriormente ( 119 ). Por lo que respecta a la expresión de IL-4 en los tejidos, esta citoquina puede estar jugando un papel predominante en promover el patrón de citoquinas TH2, sola ( 202-204 ), o en combinación con otras citoquinas ( TGF- $\beta$  e IL-10 ) que fueron conjuntamente expresadas en los tumores ( 205 ). Así mismo, la IL-4 puede potenciar los efectos inhibitorios sobre algunas funciones citotóxicas producidas por la IL-10 y el TGF- $\beta$  ( 206 ). La expresión de TGF- $\beta$  en los tumores puede estar contribuyendo a acentuar los efectos inhibitorios de las funciones de

los linfocitos infiltrantes, por ejemplo, inhibiendo la actividad citotóxica de linfocitos T ( 207, 208 ), ó regular la función de los linfocitos B ( 209 ), macrófagos ( 206, 210 ), así mismo, puede modular la expresión local de citoquinas y la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II ( 211, 212 ). El TGF- $\beta$  producido por las células tumorales del epitelio cervical puede ser uno de los principales responsables de la inmunosupresión local inducida por el tumor ( 213,214 ).

Por otro lado, otros estudios a nivel de la respuesta inmune celular sistémica en pacientes con cáncer cervical indican una disminución en la producción de citoquinas TH1 a nivel de sangre periférica, por ejemplo, existe una ligera disminución en la producción de IL-2 en 38 pacientes con cáncer cervical comparado con 31 controles sanos ( 95 ). Así mismo, se observó una clara disminución en la producción de INF- $\gamma$  e IL-2 inducidas por mitógenos en linfocitos de sangre periférica en 63 pacientes con cáncer cervical, además se encontró una disminución gradual en la producción de citoquinas con respecto al crecimiento del tumor ( 94 ). También se ha encontrado una disminución en la producción de citoquinas TH1, específicamente IL-2, en linfocitos de sangre periférica en respuesta a péptidos específicos de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 ( 215 ). Recientemente se ha reportado el perfil de citoquinas en linfocitos de sangre periférica en 34 mujeres con neoplasia intraepitelial cervical y 30 con cáncer cervical, la producción de IL-2 y INF- $\gamma$  fue significativamente reducida en los pacientes con NIC y cáncer, mientras que la producción de IL-4 e IL-10 en respuesta a mitógenos fue muy elevada en ambos grupos ( 216 ).

Los datos anteriores de expresión de citoquinas en linfocitos de sangre periférica y nuestros datos de expresión de citoquinas en el microambiente del tumor indican que la producción de citoquinas TH1 que aumentan la inmunidad celular antitumoral está inhibida ó bloqueada en mujeres con infección por HPV y que la

progresión de lesiones precursoras de cáncer cervical puede estar asociada a un cambio en la producción de citoquinas TH1 a TH2. En este momento es de suma importancia determinar si este cambio de citoquinas TH1 a TH2 da lugar al desarrollo de la neoplasia por una inhibición de los mecanismos de vigilancia inmunológica, ó si este cambio de citoquinas se debe a un efecto secundario inducido por las células tumorales ó por la infección viral persistente.

Por otro lado, las células epiteliales infectadas con HPV con capaces de producir algunas citoquinas y potencialmente pueden modificar los perfiles de citoquinas en el microambiente del tumor ( Fig. No. 9 ) ( 217 ). Células de cáncer cérvico uterino pueden producir IL-6 ( 218 ) Tomando en cuenta todos estos hallazgos en combinación con nuestros resultados, sugieren que el HPV-16 es capaz de inducir la expresión de citoquinas en células epiteliales humanas que pueden modificar la respuesta inmune local y posiblemente puedan influenciar los perfiles de citoquinas sistémicos.

Tomando en cuenta que la inmunidad celular es preferencialmente activada por citoquinas TH1 y que las citoquinas TH2 tienen una acción supresora ( 219 ), es necesario buscar alternativas que puedan modificar los perfiles de citoquinas en el microambiente del tumor y a nivel sistémico. Existen varias evidencias que indican que es factible modificar un patrón preexistente de citoquinas TH2, por ejemplo, se ha encontrado que la IL-12 es capaz de restaurar la producción de INF- $\gamma$  en linfocitos de sangre periférica de pacientes seropositivos a HIV en donde la producción de INF- $\gamma$  es reducida ó ausente ( 220 ). Así mismo, el tratamiento con IL-12 recombinante a ratones con leishmaniasis produce una cura absoluta de la enfermedad y genera resistencia contra la reinfección, este efecto terapéutico de la IL-12 fue asociado a una disminución en la producción de IL-4 y a un incremento en la producción de INF- $\gamma$ , a través de un mecanismo de inversión de citoquinas TH2 a TH1 ( 221, 222 ). Además de tener la capacidad de regular las funciones de

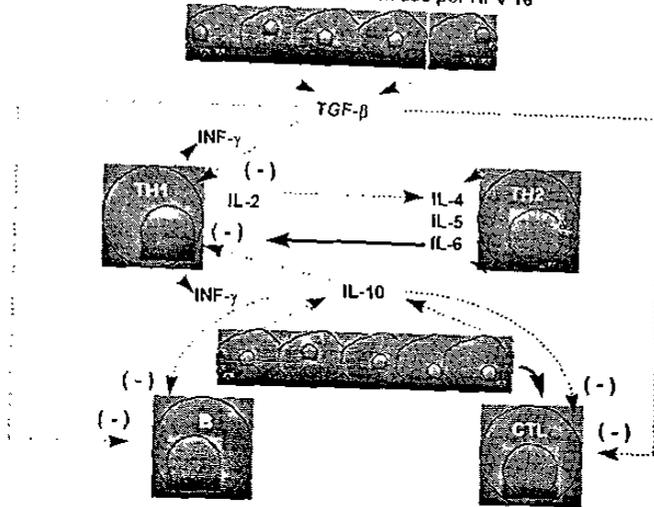
TH1, la IL-12 tiene un efecto antitumoral y antimetastático ( 223, 224 ), así también, tiene la capacidad de mejorar la inmunogenicidad de una vacuna antiviral ( 225 ). Los datos anteriores demuestran que la IL-12 previene los efectos deletéreos de las respuestas TH2 y promueve los efectos protectivos y curativos de las respuestas TH1 en enfermedades infecciosas y cáncer. Finalmente es necesario determinar el papel de las citoquinas en el paso crucial entre infección y neoplasia con el propósito de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento en la infección por HPV y cáncer cervical basadas en la terapia con citoquinas TH1.

## CONCLUSIONES

- I.-Se desarrolló un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) para detectar secuencias genómicas del grupo de los papilomavirus asociados a cáncer cervical en muestras de citología cérvico vaginal y biopsias de tejido cervical fresco.
- II.-La presencia de HPV 16 en 50 tumores analizados fue del 98 %, indicando que este fue el tipo viral mas frecuente.
- III.-Se desarrolló un método basado en RT-PCR para determinar la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16 en pequeñas biopsias ( 50-100 mg ) de tejido cervical.
- IV.-La expresión de los dos transcritos de los oncogenes E6 ( E6I\* de 321pb ) y E7 ( E6II\* de 204pb ) de HPV 16 fue asociada a los estadios mas avanzados de cáncer cervical.
- V.-El análisis de marcadores de linfocitos T en los tejidos indicó que existe una expresión diferencial de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, con una mayor expresión de CD8<sup>+</sup>, indicando que esta población de linfocitos se encuentra en mayor cantidad en los tejidos.
- VI.-Se desarrolló un método basado en RT-PCR para determinar la expresión de citoquinas TH1, TH2 e inflamatorias en pequeñas biopsias ( 50-100 mg ) de tejido cervical, que puede ser aplicada a otros tejidos tumorales.
- VII.-La mayoría de los tumores analizados ( 80 % ) no expresaron citoquinas TH1, por el contrario presentaron un perfil preferencial de citoquinas TH2.
- VIII.-La expresión de citoquinas TH2 fue asociada al grupo de tumores que mostraron unicamente la expresión de los dos transcritos de los oncogenes E6 y E7 de HPV 16.

- IX.-La expresión preferencial de citoquinas TH2 ( IL-4 e IL-10 ) puede inhibir las funciones de los linfocitos infiltrantes en el tejido cervical y contribuir a crear un estado de inmunosupresión en el microambiente del tumor.
- X.-La expresión elevada de TGF- $\beta$  en el tejido tumoral puede contribuir a acentuar el estado de inmunosupresión local.
- XI.-Las células epiteliales derivadas de cérvix transformadas con HPV 16 expresan varias citoquinas y potencialmente pueden contribuir a modificar el perfil de citoquinas en el microambiente del tumor.
- XII.-La producción de IL-10 en el tejido cervical fue detectada en células epiteliales alteradas ( células coilocíticas y tumorales ) por HPV 16, lo que puede representar una estrategia del virus para evadir la respuesta inmune celular en el microambiente del tumor.
- XIII.-La predominante expresión de citoquinas TH2 en el microambiente del tumor puede jugar un papel importante en la transición de infección a neoplasia y favorecer el proceso de carcinogenesis cervical por inhibición de los mecanismos de vigilancia inmunológica. Un modelo esquemático del papel de la citoquinas TH2 en cáncer cervical es representada a continuación :

Celulas Tumorales Transformadas por HPV 16



## PERSPECTIVAS

Una de las principales aportaciones del presente estudio es haber establecido que en el cáncer cervical avanzado predomina un patrón de citoquinas tipo TH2 y que las propias células epiteliales transformadas por HPV son las productoras de una citoquina ( IL-10 ) que puede crear un microambiente en el tumor favorable para evadir los mecanismos efectores de la respuesta inmune celular.

Estos hechos habren desde nuestro punto de vista las siguientes perspectivas :

**1.-** Analizar los mecanismos involucrados en la desregulación de citoquinas ( IL-10 y TGF- $\beta$  ) en células epiteliales transformadas por HPV.

**a.-** Estudiar el papel de algunas proteínas virales (E6 y E7) de HPV 16 en regular el promotor de IL-10 y TGF- $\beta$  en células epiteliales transformadas con HPV 16.

**b.-** Estudiar la influencia de la expresión de TGF- $\beta$  sobre la expresión de IL-10 ó viceversa en las mismas células epiteliales.

**2.-** Estudiar la expresión de citoquinas TH1 y TH2 en linfocitos infiltrantes de tumores cervicales avanzados y en líneas celulares epiteliales transformadas con HPV derivadas de tumores cervicales.

**3.-** Analizar algunas alternativas terapéuticas para el manejo del cáncer cérvico uterino avanzado basadas en la manipulación de la respuesta inmune local para eliminar el componente TH2 promoviendo la activación de los linfocitos TH1.

**a.-** Estimular la función TH1 : Una alternativa es la utilización de citoquinas recombinantes como la IL-12 y el INF- $\gamma$  (lograr la expresión in vivo de estas citoquinas mediante la administracion de plásmidos desnudos ó en liposomas.

**b.- Estimular la función TH1 y CTL :** Una alternativa es mediante la utilización de péptidos activadores de TH1 y CTL de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV 16.

A continuación se muestra una representación esquemática de las perspectivas anteriormente mencionadas :

