

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

“EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL IFN-T OVINO Y SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE CÉLULAS TRANSFORMADAS POR VPH-16, Y SU ACCIÓN ANTITUMORAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL TUMORAL MURINO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

PRESENTA

QBC. HERBEY OSWALDO PADILLA QUIRARTE

DIRECTOR DE TESIS

DR. VÍCTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES

JUNIO 2013

Créditos

Al Instituto Nacional de Salud Pública por proporcionarnos el uso de áreas adecuadas para la realización del presente trabajo, el cual fue realizado en las instalaciones del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en el laboratorio 4 planta baja, bajo la dirección del Dr. Víctor Bermúdez Morales.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca para posgrado. No. de Becario: **375463**.

Al fondo sectorial de investigación para la educación. Convocatoria de educación básica por el financiamiento otorgado al proyecto: **“Caracterización molecular del efecto anti-proliferativo, pro-apoptótico, anti-viral del interferón tau sobre células tumorales VPH positivas y su efecto anti-tumoral en un modelo tumoral murino VPH 16 positivo”**, con número de proyecto: **168817**.

Índice

Créditos.....	ii
Índice de tablas y figuras.....	v
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	v
Lista de abreviaturas	vi
Resumen.....	viii
Introducción.....	1
Pregunta de investigación	3
Antecedentes.....	4
Cáncer cervicouterino	4
Virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino.....	5
Estimulación de la proliferación celular por VPH.....	9
Respuesta inmune contra VPH y cáncer cervicouterino	10
Evasión de la respuesta inmune por el VPH.....	12
Interferones (IFN).....	14
Vía de señalización de IFN tipo I.....	17
Genes inducidos por interferón (ISG)	17
Funciones inmunomoduladoras de IFN	22
Propiedades antiproliferativas de los IFN.....	22
Apoptosis inducida por IFN	24
Interferón y VPH.....	24
Inmunoterapia con IFN en cáncer	25
Interferón tau (IFN- τ).....	26
Estructura del IFN- τ y unión al receptor de IFN tipo I.....	27
Propiedades biológicas del IFN- τ	29
Escenario molecular hipotético del IFN- τ en un modelo de cáncer cervicouterino	31
Justificación.....	34
Hipótesis	35
Objetivo general	36

Objetivos específicos.....	37
Materiales y Métodos.....	38
Cultivo celular	38
Ensayo de proliferación en células SiHa y BMK-16/myc tratadas con IFN- τ	38
Extracción de RNA total a partir de células estimuladas con IFN- τ	38
Síntesis de cDNA	39
RT-PCR en tiempo real.....	39
Ratones y modelo tumoral.....	40
Tratamiento con IFN- τ en ratonas con tumor.....	40
Resultados	41
Actividad antiproliferativa del IFN- τ en líneas celulares positivas a VPH-16.....	41
Efecto del IFN- τ sobre la expresión del RNA mensajero de los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares SiHa y BMK-16/myc.....	46
Efecto antitumoral del IFN- τ en un modelo tumoral murino VPH-16 positivo	51
Discusión.....	54
Conclusión y Perspectivas	58
Bibliografía	59

Índice de tablas y figuras

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Genes inducidos por interferón en respuesta antiviral y en cáncer	20
Tabla 2. Efecto antiproliferativo del IFN- β e IFN- τ en células SiHa	44
Tabla 3. Efecto antiproliferativo del IFN- β e IFN- τ en células BMK-16/myc	44
Tabla 4. Efecto del IFN- τ e IFN- β en la expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células SiHa y BMK-16/myc	48

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Organización del genoma del virus de papiloma humano	6
Figura 2. Ciclo de vida del virus de papiloma humano	7
Figura 3. Vías de señalización de interferones	16
Figura 4. Estructura del IFN- τ ovino	27
Figura 5. Escenario molecular hipotético del IFN- τ en un modelo de cáncer cervicouterino	32
Figura 6. Efecto antiproliferativo del IFN- τ en células SiHa	42
Figura 7. Efecto antiproliferativo del IFN- τ en células BMK-16/myc	43
Figura 8. Expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células SiHa tratadas con IFN	46
Figura 9. Expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células BMK-16/myc tratadas con IFN	47
Figura 10. Efecto del IFN- τ sobre el volumen tumoral	50
Figura 11. Efecto del IFN- τ sobre el volumen tumoral	51

Lista de abreviaturas

APC	Célula presentadora de antígeno
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
CaCU	Cáncer cervicouterino
cDNA	DNA complementario
CENAVECE	Centro de vigilancia epidemiológica y control de enfermedades
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalitis alérgica experimental
FDA	Administración de alimentos y drogas
GAS	Sitio de activación de interferón gamma
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HSIL	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN	Interferón
IFNAR	Receptor de interferones tipo I
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
IFN- τ	Interferón tau
IL	Interleucina
IRF	Factor regulador de interferón
ISG	Genes estimulados por interferón
KIR	Receptor de células NK parecido a inmunoglobulina
LSIL	Lesión intraepitelial cervical de bajo grado
MDSC	Células supresoras de origen mielóide

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MTT	Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OAS	2',5'-oligoadenilato sintetasa
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKR	Proteína cinasa R
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _t	RNA de transferencia
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SV40	Virus del simio 40
TAM	Macrófago asociado a tumor
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP-1	Proteína de trofoblasto 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VHC	Virus de hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus de papiloma humano

Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema grave de salud pública, y debido a esto en la actualidad existen diversas estrategias enfocadas en el control y tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, diversas moléculas han llamado la atención por sus propiedades inmunoregulatoras y se han usado como inmunoterapia en diversos tipos de neoplasias. El IFN- τ , al igual que otros interferones tipo I, posee actividades antivirales y antiproliferativas, sin embargo presenta menor toxicidad y su expresión es mayor y más prologada, por lo que es muy prometedor en el tratamiento de diversas enfermedades de origen infeccioso, autoinmunes y particularmente en cáncer. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del IFN- τ sobre la proliferación y en la expresión de los oncogenes E6 y E7 en células transformadas por el VPH-16, y su acción sobre el volumen tumoral en un modelo experimental tumoral murino positivo a VPH-16. Las líneas celulares transformadas con VPH-16 BMK-16/myc (murina) y SiHa (humana) fueron tratadas con IFN- τ con concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 ng /mL. La actividad antiproliferativa del IFN- τ se evaluó mediante un ensayo de reducción de MTT y la expresión de E6 y E7 se determinó por RT-PCR en tiempo real usando sondas TaqMan. Para analizar el efecto antitumoral se inocularon 500,000 células BMK-16/myc en el dorso de ratones hembra BALB/c singénicos a la línea celular. Una vez que el tumor creció y tuvo un volumen de 20-30mm, se administraron una dosis de 50 ng y en otro ensayo dos dosis de 100 ng en PBS como vehículo. Posteriormente, se midió el volumen tumoral con un vernier cada 24 horas. Se determinó que el IFN- τ tiene efecto antiproliferativo en las células SiHa y BMK-16/myc (54 y 92% respectivamente) 72 horas posterior al tratamiento con 100 ng/mL. Además se observó que la expresión de los oncogenes E6 y E7 se inhibió con 50 ng/mL de INF- τ a las 72 horas. Sin embargo, no se observó efecto antitumoral en un modelo tumoral murino VPH 16 positivo. En conclusión, el IFN- τ tiene efecto antiproliferativo y reduce la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 *in vitro* en células SiHa y BMK-16/myc dosis dependiente, sin embargo la actividad antitumoral *in vivo* de esta citocina no fue demostrada para el esquema de tratamiento empleado.

Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública a nivel mundial. En el año 2008 se reportaron alrededor de 529,000 casos, con una tasa de mortalidad de 12.9%. En México, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) informó que en el 2009 se detectaron 6,860 casos con una tasa de incidencia de 17.34 por cada 100,000 [1].

El factor etiológico asociado al desarrollo de CaCU es la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Se han identificado más de 100 genotipos de VPH y están clasificados como virus de bajo y de alto riesgo dependiendo de su potencial oncogénico, de los cuales el VPH-16 y VPH-18 son los más importantes porque son responsables del 70% de todas las neoplasias del cérvix [2].

En la actualidad existen diversas estrategias enfocadas para la prevención, control y tratamiento de lesiones cervicales y del CaCU. En este enfoque, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en biología molecular e inmunología, diversas moléculas han llamado la atención por sus propiedades inmunoregulatoras para el tratamiento del cáncer, lo que ha permitido el desarrollo de la inmunoterapia basada en el empleo de anticuerpos, vacunas, factores de crecimiento, interferones etc. con el fin de activar a la respuesta inmune y controlar diversas enfermedades incluyendo el cáncer.

En este sentido, los interferones (IFN) son una familia de citocinas identificadas hace más de 50 años gracias a sus propiedades antivirales e inmunoregulatoras que se han utilizado para el tratamiento del cáncer. Adicionalmente, se ha descrito que los IFN tienen efectos antimicrobianos, son reguladores cruciales de la proliferación celular, diferenciación, supervivencia y muerte celular. Por sus propiedades biológicas, los IFN se han usado como agentes terapéuticos en ciertas infecciones virales tales como la del virus de hepatitis C (VHC), hepatitis B (VHB), SIDA (VIH), en neoplasias hematológicas y tumores sólidos, además en enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple [3].

Entre la familia de interferones de tipo I se encuentra el IFN- τ , una proteína inicialmente llamada proteína del trofoblasto-1 (TP-1), que tiene como principal función biológica la de señalar el reconocimiento materno de la gestación en los rumiantes. Esta molécula tiene un 45-55% de homología con la secuencia del IFN- α de humano, ratón, rata, cerdo y un 70.3% con la del IFN- ω

ovino [4]. De acuerdo con esto, el IFN- τ es capaz de unirse a los receptores de interferón tipo 1 y subsecuentemente ejercer efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores, por lo que es una molécula muy promisoriosa en el tratamiento de infecciones virales y en la terapia contra el cáncer [5].

El IFN- τ ha demostrado tener actividad antiviral muy alta en sistemas *in vitro* (aún mayor que la del IFN- α) en contra del virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana [4] y lentivirus ovino. También se ha descrito que puede inhibir a los virus de la hepatitis C, hepatitis B, virus de neumonía progresiva ovina, virus de anemia infecciosa equina, virus de encefalitis-artritis caprina, entre otros [5]. Por tal motivo, el IFN- τ es una proteína con posibles aplicaciones terapéuticas en medicina, incluyendo enfermedades asociadas a infecciones virales, en pacientes inmunosuprimidos y en el tratamiento del cáncer.

El IFN- τ al igual que otros interferones tipo I tiene efecto sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 de papilomavirus y sobre la proliferación de líneas celulares transformadas por VPH. Sin embargo, no se ha estudiado su efecto en modelos experimentales tumorales. Por ello, nos proponemos estudiar el efecto antiproliferativo y antiviral (mediante la represión de los oncogenes E6 y E7) en líneas celulares positivas a VPH-16 y su acción antitumoral en un modelo experimental tumoral murino positivo a VPH-16.

Pregunta de investigación

¿El IFN- τ tiene efecto antiproliferativo y puede inhibir la expresión de los oncogenes E6 y E7 en células transformadas por VPH-16 *in vitro*, así como reducir el crecimiento tumoral en un modelo experimental de cáncer *in vivo*?

Antecedentes

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública, y es considerado como la segunda causa más común de cáncer entre mujeres. A nivel mundial se informaron 529, 409 casos y 274, 883 muertes en el 2008. Aproximadamente el 86% de los casos ocurren en países en vías de desarrollo, representado el 13% de las neoplasias femeninas. En México, el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y el Control de Enfermedades (CENAVECE) informó que hubo 6,860 casos con una tasa de incidencia de 17.34 por cada 100,000 mujeres en el 2009 [1].

Casi todos los casos de cáncer cervicouterino (99.8%) y sus lesiones precursoras como la neoplasia intraepitelial cervical, se deben a tipos específicos de un virus transmitido por vía sexual, denominado virus del papiloma humano (VPH). La relación entre el CaCU y el VPH fue demostrada a principios de los años 80's por el Dr. Harald zur Hausen, quien manifestó que la infección es un requisito necesario pero no suficiente para el desarrollo de esta enfermedad. Además, también se sabe que la infección por VPH puede ser causa de otros carcinomas anogenitales incluyendo el de pene, vagina, vulva y ano [6]

Se ha establecido que el 90% de las mujeres sexualmente activas se infectan con algún tipo del virus de papiloma humano. Se estima que cerca de dos tercios de los individuos quienes tienen relaciones sexuales con un compañero infectado también se infectarán y alrededor del 20-30% de las mujeres infectadas con VPH portan múltiples tipos de este virus, donde en la mayoría de los casos la infección persiste de 6 a 12 meses en el tracto genital y luego se vuelve indetectable [7].

Por otro lado, se han identificado otros cofactores que junto con la infección con el virus del papiloma humano aumentan el riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino. Éstos se pueden clasificar en tres grupos: (1) cofactores exógenos o ambientales, como el uso de anticonceptivos orales, tabaquismo, dieta, trauma cervical, coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y otros agentes transmitidos sexualmente; (2) cofactores virales, como coinfección con otras variantes de VPH, carga viral e integración viral, (3) cofactores del hospedero, como hormonas endógenas, factores genéticos como el antígeno leucocitario humano y factores del hospedero relacionados a la respuesta inmune [8].

Virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino

Los virus de papiloma humano (VPH) son epiteliotróficos que infectan principalmente la mucosa anogenital, orofaríngea y la piel. A la fecha se han identificado más de 100 diferentes tipos, de los cuales un tercio de estos infectan células epiteliales en el tracto genital. Estos virus se pueden clasificar en dos categorías: de alto y de bajo riesgo. Los de alto riesgo están asociados con el desarrollo de cáncer anogenital, mientras que los VPH de bajo riesgo inducen solo verrugas genitales. Los tipos de alto riesgo incluyen al VPH-16, VPH-18, VPH-31 y VPH-45, entre otros, mientras que entre los de bajo riesgo se encuentran el VPH-6 y el VPH-11 [9]

El VPH es un virus no envuelto, con cápside icosaédrica. Su genoma consta de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8 Kb de tamaño y está dividido en una región codificante que comprende ocho genes transcritos en un RNAm policistrónico y una región larga no codificante o reguladora que contiene el origen de replicación. La región codificante está dividida a su vez en dos regiones de expresión: temprana y tardía. Los genes de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) están relacionados con la modulación de los procesos de transformación celular, replicación y transcripción viral. Los de expresión tardía (L1 y L2) codifican para las dos proteínas estructurales de la cápside (Fig. 1) [6].

La progresión del cáncer cervical asociado a la infección por el VPH, es un proceso lento que puede ser dividido en cuatro etapas. La primera etapa comprende la infección con VPH, la cual en la mayoría de los individuos es controlada. En una minoría de las mujeres infectadas, el virus puede persistir por varios años y está fuertemente ligado a un riesgo mayor para desarrollar una lesión intraepitelial escamosa de grado bajo (LSIL). Esta etapa está caracterizada por displasia leve debido a la progresión de células persistentemente infectadas a pre cáncer, la cual puede progresar a una lesión intraepitelial escamosa de grado alto (HSIL), que se caracteriza por displasia moderada a un carcinoma *in situ*. HSIL puede progresar posteriormente a la última etapa, que es el carcinoma invasor (Fig. 2) [10].

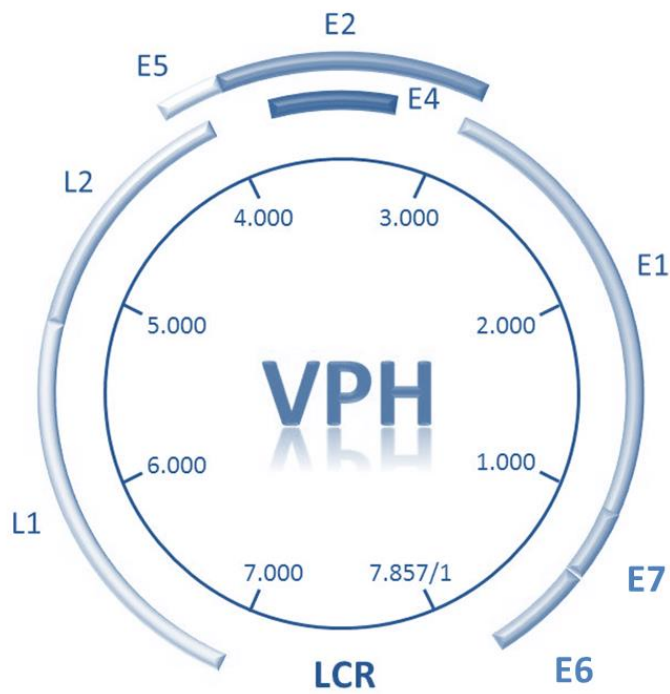


Figura 1. Organización del genoma del virus de papiloma humano

El virus de papiloma humano tiene un genoma de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8,000 pb, el cual está dividido en tres zonas: una región larga de control, una región que codifica para seis proteínas de expresión temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y una zona que contiene los genes que codifican para dos proteínas de expresión tardía (L1 y L2). Modificado de García-Paz, no publicado.

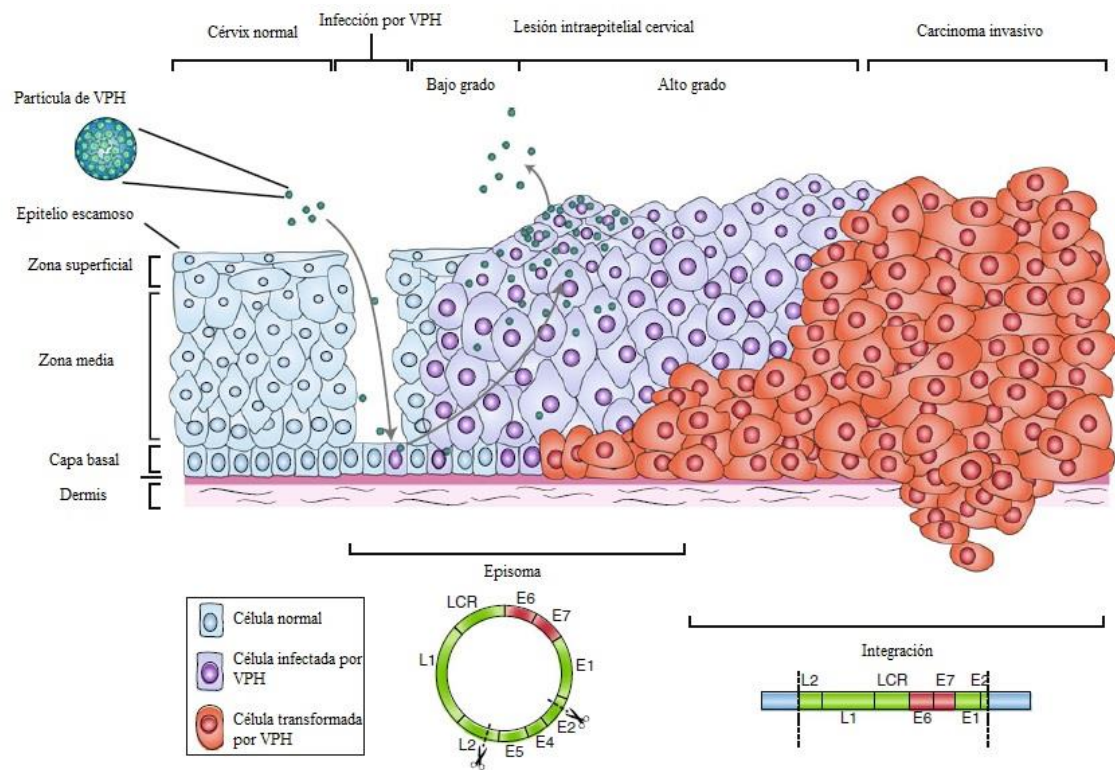


Figura 2. Ciclo de vida del virus de papiloma humano

Para que se desarrolle cáncer cervicouterino, el virus tiene que acceder a las células que están en contacto con la lámina basal del epitelio. En estas células el genoma del virus comienza a replicarse de manera episomal y sintetiza proteínas de expresión temprana (principalmente E1 y E2). Conforme se van dividiendo, las células migran a estratos superiores donde se sintetizan las proteínas tardías y se ensamblan los viriones. Un evento importante en el desarrollo de CaCU es la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedera. Cuando esto sucede se comienzan a sobreexpresar las proteínas E6 y E7, responsables de la transformación e inmortalización celular. Modificado de Woodman *et al*, 2007.

Los virus de papiloma establecen su ciclo viral productivo exclusivamente en epitelio estratificado de la piel o mucosa. Estos tejidos son complejos, compuestos de diferentes tipos celulares, la mayoría de los cuales comprenden capas de queratinocitos en varias etapas de diferenciación, la minoría restante incluye melanocitos, células de Langerhans y células Merkel. Existen dos tipos de queratinocitos: las células madre en división que no están diferenciadas, y las células capaces de proliferación transitoria en el compartimento basal [11]. Para establecer una infección, el virus del papiloma humano necesita infectar a células del epitelio basal, las cuales son todavía capaces de replicarse y diferenciarse. Algunas de estas células infectadas pierden contacto con la membrana basal y se mueven hacia el compartimento suprabasal de células en proliferación, donde establecen una infección latente. Los subsecuentes pasos en el ciclo de vida viral son estrictamente dependientes de la diferenciación del epitelio hospedero [11].

Conforme los queratinocitos se diferencian, los productos de genes tempranos son expresados e interactúan con proteínas celulares que regulan la replicación del DNA viral. En las células diferenciadas, las proteínas tardías se expresan y luego se ensamblan para formar los componentes estructurales de la cápside viral. En algunos casos, el DNA viral se integra en el genoma del hospedero o puede permanecer en forma episomal [11, 12]. El ciclo de vida del VPH está ligado al programa de diferenciación de su célula hospedera, el queratinocito. La infección por papilomavirus ocurre a través de microlesiones del epitelio producidas generalmente durante la actividad sexual, que exponen a las células a la entrada viral. La naturaleza del receptor para la entrada del VPH a la célula sigue siendo desconocida, aunque se ha sugerido la participación de la integrina $\alpha 4\beta 6$ y de proteoglicanos de heparán sulfato. El proceso de entrada a la célula parece ser diferente en distintos tipos de VPH; en el caso del VPH-16 por ejemplo, esto parece ocurrir por endocitosis mediada por clatrina, mientras que en el caso del VPH-31, se ha sugerido que el mecanismo podría ser vía caveolas. Después de la entrada, las partículas virales se desensamblan en endosomas tardíos y/o lisosomas transfiriendo el DNA viral al núcleo facilitado por la proteína menor de la cápside L2 [13, 14].

En las células que están en contacto con la capa basal, el genoma viral se replica al principio de manera episomal manteniéndose en un muy bajo número de copias, donde las primeras proteínas virales en ser expresadas son las proteínas E1 y E2, las cuales están involucradas en la replicación, y forman un complejo que se une a secuencias en el origen viral de replicación y actúan para reclutar polimerasas celulares y proteínas accesorias que median la replicación. La proteína E1 exhibe

actividad de helicasa y permite la separación de las dos cadenas de DNA adelante del complejo de replicación, mientras que E2 es una proteína de unión específica a DNA que se une a motivos ACCN₆GGT en la región no codificante viral y ayuda a reclutar a E1 al origen de replicación [9]. Un evento central durante la infección por VPH corresponde a la integración del genoma viral a la célula del hospedero. Durante este proceso se altera el marco de lectura abierto de E2, perdiéndose el efecto de inhibición de esta proteína sobre el promotor temprano (p97 para VPH-16 y p105 para VPH-18), que mantiene bloqueada la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, indispensables para la transformación celular [15]. Además, la integración viral frecuentemente ocurre en regiones cromosómicas donde se encuentran genes involucrados en tumorigénesis, tales como *MYC*, *NR4A2*, *hTERT*, *APM-1*, *FANCC* y *TNFAIP2* [16].

Estimulación de la proliferación celular por VPH

El mecanismo básico por el cual los papilomavirus estimulan la progresión del ciclo celular se conoce ampliamente; La proteína E7 se asocia con la proteína Rb, interrumpiendo su asociación con el factor de transcripción E2F, este subsecuentemente activa proteínas requeridas para la replicación del DNA viral como las ciclinas A y E. Por su parte, la proteína E7 también se asocia con otras proteínas involucradas en la proliferación del ciclo celular, incluidas las histonas desacetilasas, componentes del complejo de transcripción AP-1, e inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 [6].

La proteína viral E6 previene la inducción de apoptosis uniéndose a la proteína supresora de tumores p53 en un complejo ternario con la ubiquitina ligasa E6AP. La formación de este complejo resulta en la ubiquitinación y subsecuente degradación de p53 por el proteasoma 26S, llevando a la reducción de la vida media de p53 de varias horas a menos de 20 minutos en los queratinocitos. También E6 puede regular negativamente la actividad de p53 a través de su asociación con p300/CBP, el cual es un coactivador de p53 [9].

Independientemente de su actividad sobre p53, E6 también puede llevar a la immortalización de las células por la interacción con la familia de proteínas con dominios PDZ (Dlg y Z0-1), localizadas regularmente en áreas de contacto célula-célula como son las uniones oclusoras en células epiteliales. La unión de la región C-terminal de la proteína E6 a las proteínas con dominios PDZ lleva a su degradación, pero no son claros los mecanismos de señalización de esta interacción en la progresión al cáncer [9]. Otra importante función de E6 que es importante para la immortalización celular, es la habilidad de activar la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT), la cual adhiere repeticiones de

nucleótidos al final de los cromosomas. La actividad de la telomerasa está usualmente ausente en células somáticas y su pérdida conlleva a un acortamiento de los telómeros con divisiones celulares sucesivas que llevan a la senescencia. Aunque el mecanismo preciso por el cual E6 media la activación de hTERT no es conocido, es claro que tal función puede llevar al desarrollo de cáncer [6].

Por otro lado, la proteína E5 induce la transformación celular a través de la modulación de diversas vías de señalización como la activación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal), también interactúa directamente con la cadena pesada del MHC clase I y disminuye la expresión de p21 y p27. Otras actividades biológicas de E5 que contribuyen a la proliferación de células infectadas es la interferencia de la comunicación célula-célula inhibiendo las uniones tipo gap. Sin embargo, el marco de lectura de esta proteína se pierde en la integración del genoma, por lo que solamente contribuye en etapas iniciales de la transformación celular [17].

Respuesta inmune contra VPH y cáncer cervicouterino

La interacción de factores genéticos y estímulos ambientales provoca alteraciones en el interior de las células, que frecuentemente llevan a una proliferación celular anormal. Para eliminar estas aberraciones, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas. Sin embargo, en algunas ocasiones esta respuesta falla en controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor [18]. El sistema inmune tiene tres papeles principales en la prevención de tumores: (1) Protege al hospedero de tumores inducidos por virus mediante la eliminación de la infección viral, (2) Previene el establecimiento de un ambiente inflamatorio que conduzca al desarrollo del tumor mediante la eliminación oportuna de patógenos y la inmediata resolución de la inflamación e (3) Identifica y elimina células tumorales en base a la expresión de antígenos específicos del tumor o moléculas inducidas por estrés celular (inmunovigilancia tumoral) [19].

La respuesta inmune es mediada por dos tipos de mecanismos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La primera es considerada la primera línea de defensa en contra de las células tumorales e infectadas por virus, la cual es independiente de antígeno e involucra el reconocimiento de patrones moleculares expresados en la superficie por células como macrófagos, células dendríticas y células NK; y la segunda, es una respuesta específica, que requiere del reconocimiento de un antígeno particular asociado al tumor por medio de células efectoras de la respuesta inmune [20].

Tras la infección por VPH, se desencadena una serie de respuestas inespecíficas acompañadas de procesos inflamatorios, quimioatracción de neutrófilos, activación de macrófagos y células asesinas naturales (NK), generación de anticuerpos naturales, e incluso del sistema del complemento. Las células de Langerhans, y algunos queratinocitos funcionan como células presentadoras de antígeno, que fagocitan las partículas virales para digerirlas en endosomas y migran a los ganglios linfáticos locales, donde activan a linfocitos T y dirigen su diferenciación hacia células efectoras [21, 22].

Las células NK inducen apoptosis en células tumorales e infectadas por VPH por medio de los receptores KIR que reconocen la disminución de la expresión de MHC de clase I en dichas células; mientras que las células dendríticas son activadas por medio de receptores similares a Toll (TLR) por vía del adaptador MyD88 y activan respuestas innatas, que incluyen la producción de un número de citocinas y quimiocinas que tienen una función clave en la inducción adaptativa y en la regulación del linfocito Th1 [23, 24].

Al momento de la activación del sistema inmune innato se comienzan a sintetizar citocinas que se encargan de la coordinación de células efectoras como monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células NK para la protección del tejido mucoso. Entre ellas se encuentran las defensinas, interleucinas (IL), interferones (IFN), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales ejercen un control directo sobre las células infectadas [25, 26].

Las alfa defensinas humanas HD1, HD2, HD3 y HD5, se encuentran presentes en el tracto genital femenino y son capaces de inhibir al VPH *in vitro*, sugiriendo que pueden servir como barrera natural para la transmisión sexual. Por el contrario las beta defensinas humanas 1 y 2 tienen pobre o nula actividad anti-VPH. Asimismo el TNF y los IFN tipo I (α y β), son productos de varios tipos de células epiteliales y tienen la capacidad para inhibir la proliferación de los queratinocitos normales e infectados con VPH, así como también de inhibir la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH [27, 28].

La respuesta más importante en la eliminación de células neoplásicas es la respuesta inmune mediada por células, la cual es dependiente de la activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas que al capturar antígeno tumoral, migran hacia los nódulos linfoides para presentar péptidos antigénicos a linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos y activarlos. Los linfocitos CD4+ activados se diferencian en linfocitos T CD4+ TH1 y TH2 según las citocinas que secretan, y las citocinas pueden activar a la respuesta inmune humoral y celular. En la

respuesta inmune humoral, los linfocitos B activados producen anticuerpos específicos contra antígenos tumorales, mientras que en la respuesta inmune celular, los linfocitos T CD8+ citotóxicos activados migran al sitio del tumor para reconocer y matar a la célula tumoral [33].

Evasión de la respuesta inmune por el VPH

Durante la transformación maligna, el sistema inmune trata de erradicar a las células infectadas por el virus, pero a pesar de la presencia abundante de células T específicas contra VPH en tejido neoplásico, en ciertas ocasiones el sistema inmune es incapaz de erradicar el tumor, lo que sugiere la existencia de mecanismos que evitan la acción de la respuesta inmune [29].

En mujeres que progresan a carcinoma cervical, la persistencia viral se asocia con una evasión de la inmunidad efectiva por parte del VPH, que se refleja con ausencia de inflamación durante la replicación viral, así como la regulación negativa de la secreción de interferón, que conlleva a un retardo en la inmunidad adaptativa y a la persistencia viral. Esto se debe en parte a que el VPH es un virus no lítico y esto limita la producción de antígenos que son procesados y presentados al sistema inmune adaptativo, y su ciclo de vida tiene características que impactan en el reconocimiento y respuesta del sistema inmune [30].

Conforme las células infectadas por el virus persisten, pueden acumular tales mecanismos para evadir el control del sistema inmune, entre los que se encuentran la regulación negativa del MHC de clase I y el procesamiento de antígeno dañado; la resistencia a apoptosis; la expresión de factores inmunosupresivos y la atracción de células inmunes que son capaces de inhibir la respuesta inmune. Este es un proceso lento que puede tomar años o incluso décadas y se conoce como inmunoeedición [29].

El VPH mantiene los niveles de sus proteínas en un nivel bajo, por lo que se limita el reconocimiento de éstas por el sistema inmune. Los genes tardíos de los papilomavirus contienen codones que los mamíferos raramente usan. Esto implica que la producción de proteínas de la cápside del virus sea inhibida en células epiteliales de mamíferos por la disponibilidad restringida de los RNAt apropiados [31].

Muchos tumores inhiben moléculas que limitan el reconocimiento del sistema inmune como la expresión de MHC de clase I y de moléculas necesarias para el procesamiento de antígeno como las subunidades del proteosoma LMP2 y LMP7 y las subunidades transportadoras TAP1 y TAP2. Debido

a que la presentación de antígeno de la proteína E6 de VPH-16 depende de TAP y del proteosoma, los defectos en estas proteínas resultan en un reconocimiento disminuido de las células tumorales por células T específicas para VPH. Por otra parte la proteína E7 de VPH-16 y -18 reduce la expresión de la cadena pesada de MHC de clase I, LMP2 y/o TAP1. Además, E5 VPH-16 regula negativamente la expresión en superficie de HLA-A y -B, pero no de la expresión total de HLA de clase I [32].

Otro mecanismo de evasión inmune generado por el tumor es la atracción de células inmunes con propiedades inmunosupresoras. Los macrófagos que son reclutados por muchos tipos de tumores generalmente se diferencian en el fenotipo M2. Estos macrófagos asociados a tumores (TAMs) secretan citocinas antiinflamatorias y promueven el crecimiento del tumor. Por otro lado, también se ha visto en cáncer cervicouterino que muchas de las células dendríticas, claves en orquestar la iniciación de la respuesta inmune, se encuentran en forma inmadura y carecen de moléculas coestimuladoras, por lo que pueden inducir un estado de anergia en lugar de activar células T efectoras [33, 34].

Las células supresoras mieloides (MDSCs) son otro tipo de células del sistema inmune innato que promueven el crecimiento del tumor o la proliferación del cáncer, inhibiendo la respuesta inmune adaptativa por la secreción directa de sustancias que afectan la función de células T, sesgando así la inmunidad específica de tumor hacia una respuesta Th2. Así como por la inducción de células T reguladoras (Treg), las cuales son células T CD4+CD25+, que sobreexpresan el factor de transcripción Foxp3, el cual permite a la célula suprimir la inflamación y las respuestas inmunes específicas [25].

Estudios recientes demuestran que el VPH interfiere con mecanismos de la inmunidad innata, específicamente con la secreción de interferón. Se ha determinado que los niveles de genes inducibles por IFN se encuentran reducidos en células infectadas por VPH en comparación con queratinocitos normales. Trabajos adicionales han demostrado que las proteínas de VPH participan en este proceso: la oncoproteína E6 se une al factor regulador de interferón 3 (IRF-3), interfiriendo con su habilidad para actuar como activador transcripcional, también se une a la cinasa Tyk2 de la vía JAK-STAT e inhibe su función. De manera similar E7 bloquea las funciones de IRF-1, y es capaz de unirse a p48, un componente del complejo ISGF3, e impide su translocación al núcleo y su habilidad para activar la expresión génica en respuesta a interferón [35, 36].

Se ha establecido que en diversos tipos de cáncer, las células tumorales generan un microambiente en el que se favorece la expresión de citocinas antiinflamatorias y bajos niveles de citocinas proinflamatorias, lo que favorece el progreso del proceso neoplásico. Giannini et al (1998), demostraron que en lesiones intraepiteliales escamosas del cérvix de alto grado existe una expresión aumentada de IL-10, comparada con lesiones de bajo grado; Por otro lado, Al Saleh et al (1998), analizaron la expresión de citocinas de biopsias de epitelio cervical por inmunohistoquímica, observándose que las lesiones de alto grado presentaban mayor producción de IL-4 y menor de IL-2 comparado con biopsias de cérvix normal; y por último Bermúdez-Morales *et al* (2008), encontró que la expresión de IL-10 aumenta conforme la lesión intraepitelial cervical progresa [37, 38].

Hay dos mecanismos que pueden explicar la participación de las citocinas en el desarrollo del cáncer. 1) Es posible que las citocinas favorezcan el desarrollo tumoral al interactuar con factores de proliferación, inducir la actividad de la angiogénesis del tumor, y promover la metástasis por el incremento de la adhesión celular. 2) Las citocinas como mediadores de la respuesta inmune pueden inhibir la expresión de las moléculas y receptores, tanto de las células de la respuesta inmune como de la célula tumoral, las cuales están involucradas en la identificación y destrucción de la célula tumoral [20].

La identificación de las citocinas como inductores de la maduración, activación y migración de células efectoras ha permitido su uso como activadores de la respuesta inmune contra varios tumores. Hasta el momento, dos citocinas han recibido la aprobación de la FDA como agentes para el tratamiento del cáncer: IL-2 para carcinoma de células renales y melanoma metastático, e IFN- α como adyuvante en terapia de melanoma. Sin embargo, existen otras citocinas como IL-12, IL-18, GM-CSF y en particular los interferones que están siendo investigados en su potencial inmunoterapéutico contra el cáncer [39].

Interferones (IFN)

Los interferones (IFN) son una familia de citocinas identificadas hace más de 50 años como potentes proteínas antivirales. También son reconocidas como reguladores cruciales de la proliferación celular, diferenciación, supervivencia y muerte, así como activadores de funciones especializadas celulares particularmente en el sistema inmune y participan importantemente en enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer. Sus propiedades biológicas los han llevado a usarse como terapia en diversas infecciones virales como la hepatitis C (HCV), hepatitis B (HBV), en

combinación con terapia antiretroviral en SIDA, en cánceres hematológicos, en tumores sólidos, y en esclerosis múltiple [3].

Existen tres tipos de interferones clasificados en IFN tipo I (IFN- α , - β , - δ , - ϵ , - κ , - τ , - ω), los cuales son producidos en respuesta directa a una infección viral; los interferones tipo II (IFN- γ), que es sintetizado en respuesta al reconocimiento de células infectadas por linfocitos T y células asesinas naturales; e interferones tipo III (IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3), que también se expresan en células infectadas por virus. Cada tipo de IFN tiene similitud de secuencia, señalizan por medio de receptores en superficie (IFNAR, IFNGR, IFNLR), son producidos por células particulares en respuesta a estímulos específicos y todos median sus efectos activando la vía de señalización JAK-STAT, que culmina en la transcripción de genes estimulados por interferón específicos (ISGs), los cuales llevan a cabo los efectos antivirales, inmunoreguladores y antitumorales (Fig. 3) [3].

Los interferones tipo I son un grupo grande de citocinas estructuralmente similares y son producidos como respuesta a una infección viral o bacteriana en múltiples tipos celulares como linfocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. En los humanos existen más de 13 tipos diferentes de IFN- α , así como un gen de IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω , los cuales están agrupados en un locus en el mismo cromosoma (cromosoma 9 en humanos y cromosoma 4 en ratones), y se ha sugerido que todos ellos resultan de un ancestro común, siendo el del IFN- β el gen primordial [40].

El IFN- γ es el único IFN tipo II. Estructuralmente no se relaciona a los IFN tipo I, se une a diferente receptor, y está codificado en otro locus cromosómico (cromosoma 12 en humanos, y cromosoma 10 en ratones). Inicialmente, se sugería que era producido únicamente por los linfocitos T CD4+, T CD8+, y las células NK. Sin embargo, ahora se tiene evidencia que otras células como las células B, NKT, y células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) secretan IFN- γ . La producción de esta citocina por APCs es importante debido a que actúa localmente en la auto-activación y activación de células cercanas y en las células NK en la defensa temprana del hospedero ante una infección [41].

Los IFN tipo III, es la familia más recientemente identificada de IFN y se ha identificado como IFN- λ la cual incluye 3 subtipos, el IFN- λ 1, - λ 2 y - λ 3, también conocidos como interleucina-29 (IL-29), IL-28A e IL-28B, respectivamente. Estas proteínas están codificadas en el cromosoma 19 de los humanos y son similares a la familia de citocinas de IL-10 en su estructura, así como a los IFN tipo I, por lo que pueden representar una asociación evolutiva entre estas dos familias [42].

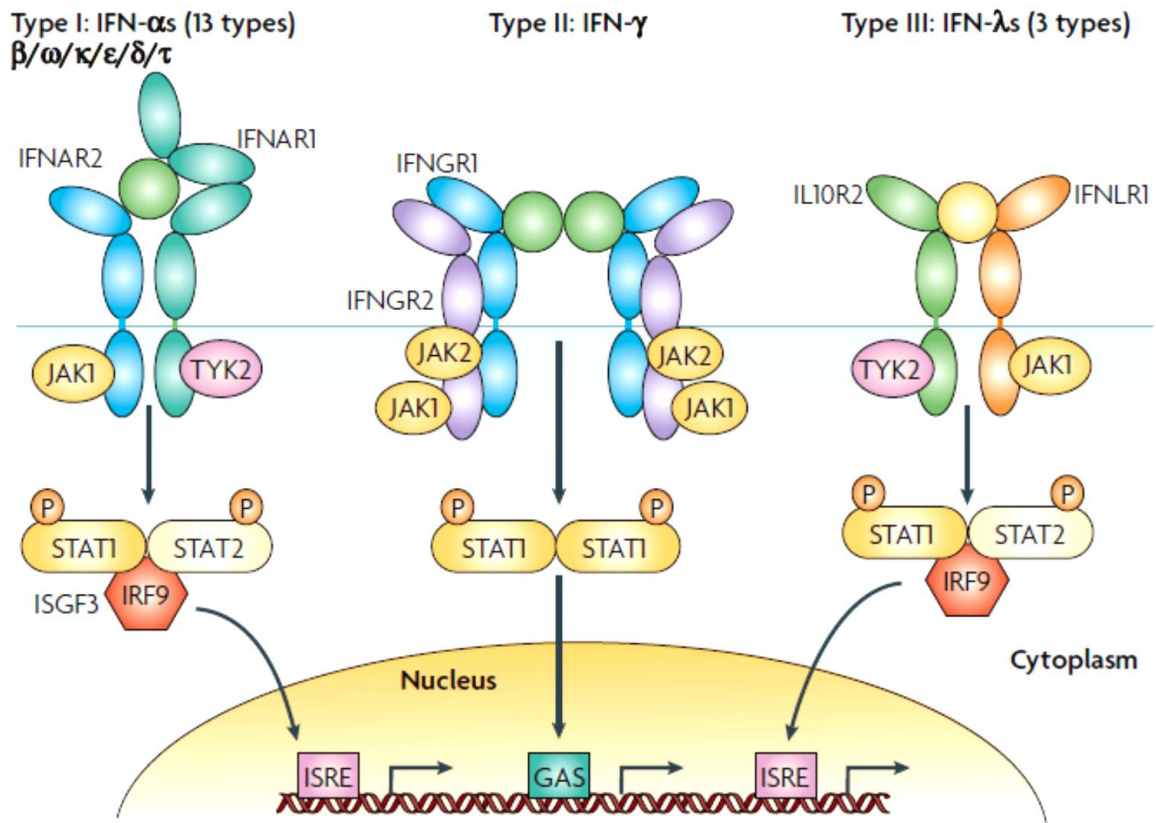


Figura 3. Vías de señalización de interferones

Los interferones señalizan por medio de la vía JAK-STAT. Al unirse el ligando se provoca un cambio conformacional en el receptor que permite la transfosforilación de las tirosina cinasas de la familia JAK asociadas a las cadenas citoplasmáticas del receptor de interferón. Posteriormente se fosforila el receptor creándose sitios de unión para los dominios SH2 de las proteínas STAT, que también son fosforiladas. Las proteínas STAT se disocian de las cadenas del receptor y forman complejos en el citoplasma que entran al núcleo y se unen a elementos de respuesta en el DNA de la célula comenzando la transcripción de múltiples genes inducidos por interferón. Modificado de Borden *et al*, 2007.

Los IFN tipo I se han convertido en los más útiles clínicamente en el tratamiento contra cáncer, son secretados por casi todas las células en el cuerpo y predominantemente están involucrados en las respuestas inmunes celulares en contra de infecciones virales. Los IFN tipo I pueden ejercer efectos antiproliferativos, apoptóticos y anti-angiogénicos en células tumorales, inducir la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I), mediar la maduración de un subgrupo de células dendríticas y pueden activar linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales y macrófagos [39].

Vía de señalización de IFN tipo I

Los interferones tipo I utilizan un receptor heterodimérico ubicuamente expresado (IFNAR) que consiste de dos subunidades (IFNAR1 e IFNAR2) asociadas con las tirosina cinasas Tyk2 y Jak1 respectivamente. La unión del IFN al IFNAR resulta en la activación de estas últimas, y en la consecuente fosforilación de residuos de tirosina en los dominios citoplasmáticos de IFNAR, creando sitios de unión para los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs), principalmente STAT2 y STAT1 [40].

Estas proteínas STAT se translocan al núcleo, donde los homodímeros STAT1:STAT1 se unen a secuencias activadas gamma (GAS), y los heterodímeros STAT1:STAT2 se asocian con IRF9 para formar el complejo ISGF3 que se une a un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE). De esta manera, los interferones tipo I activan la expresión de genes que tienen sitios GAS o ISRE, o incluso ambos. El complejo ISGF3 y sus elementos de respuesta tienen una función en la activación de genes antivirales, mientras que las secuencias GAS median la inducción de genes inflamatorios como las quimiocinas [40].

En adición al complejo ISGF3, los IFN tipo I han mostrado inducir otros tipos de complejos STAT, como los homodímeros de STAT3 o STAT5 y los heterodímeros STAT1-STAT3 o STAT5-CrkL. También se ha observado que los IFN tipo I pueden activar diversas vías de señalización no canónicas, como la asociación de la subunidad p85 de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), que culmina con la activación de AKT y PKC δ , o la activación de las cinasas MAP, ERK2 y p38 por la acción de IFN α/β [43].

Genes inducidos por interferón (ISG)

Un grupo de más de 300 genes son inducidos por interferón (ISG) y median los efectos biológicos y terapéuticos de la estimulación por éste. Entre ellos se encuentran PKR (proteína cinasa R

dependiente de dsRNA), 2',5'-oligoadenilato sintetetasas (OAS), RNasa L, y la proteína Mx, los cuales están involucrados en respuesta antiviral [44].

PKR es una proteína cinasa dependiente de RNA, la cual en células tratadas con IFN se encuentra predominantemente en el citoplasma y asociada con ribosomas. PKR se activa por autofosforilación, un proceso mediado por RNA de doble cadena. Luego de la activación, esta proteína cataliza la fosforilación intermolecular de al menos seis substratos proteicos, destacando la subunidad α del factor 2 de iniciación de síntesis de proteínas (eIF2 α), lo que lleva a una inhibición de la traducción en la célula hospedera [44].

Otra familia de ISG que tiene influencia en la traducción, son las proteínas relacionadas a p56. Dos de estas, p56 y p54, se unen a diferentes subunidades del factor de iniciación de traducción eIF3, bloqueando sus funciones [45].

Las 2'-5' oligoadenilato sintetetasas son un grupo de enzimas inducidas por IFN en células de mamíferos que catalizan la síntesis de oligómeros de adenosina unidos por enlaces fosfodiéster en la conformación inusual de 2' a 5' (2'5' A). Las moléculas 2'5' A se unen con alta afinidad a la endoribonucleasa L (RNasa L), e inducen su activación. La RNasa L activada cataliza la ruptura de RNA de cadena sencilla como el mRNA, llevando por consiguiente a la inhibición de la síntesis de proteínas [46].

Las proteínas Mx son GTPasas grandes altamente conservadas con homología a dinamina, que se han encontrado en todas las especies de vertebrados. Estas se unen a nucleocápsides virales, por lo que interfiere con el tráfico intracelular y la actividad de las polimerasas virales, inhibiendo la replicación de muchos virus de RNA como influenza y sarampión [47].

ISG15 es una proteína parecida a ubiquitina, inducida por interferón de 15 kDa. El mecanismo antiviral de ISG15 *in vivo* es desconocido pero se ha relacionado a sus propiedades parecidas a citocina o a su habilidad de conjugarse y modificar la función de proteínas celulares o virales. También se sabe que ISG15 es un gen blanco para la desregulación de p53, sugiriendo un papel adicional en tumorigénesis [48].

TRAIL/APO2L es un ISG que contribuye a apoptosis y por lo tanto probablemente a los efectos antivirales y antitumorales de los IFN. Sin embargo algunos ISGs promueven sobrevida, como G1P3,

el cual se localiza en la mitocondria y tiene acciones antiapoptóticas, incluidas la inhibición de la caspasa 3. Otros ISGs con actividades antivirales probables o confirmadas incluyen a la proteína 1 de unión a guanilato (GBP1); una 3',5'-exonucleasa codificada por *ISG20*; la proteína de leucemia promielocítica (PML); adenosina desaminasa (ADAR1); la proteína asociada a retículo endoplásmico viperina (viperina) que puede inhibir a citomegalovirus; la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS); y las nucleoporinas Nup98 y Nup96. Finalmente, muchas proteínas de la vía de señalización de los IFN son por si mismos ISGs, por lo que proveen una señal autocrina que amplifica la respuesta de IFN como IRF7, RIG-I, MDA5 y STAT1 (Tabla 1) [47, 49-53].

Tabla 1. Genes inducidos por interferón en respuesta antiviral y en cáncer

Gen	Función de la proteína	Mecanismo de Acción	Referencias
OAS, RNAsaL	Ruptura de RNA	Degrada RNA viral y celular, induce IFN- α/β	[46]
PKR	Fosforilación de EIF2 α	Bloqueo de síntesis de proteínas, señalización transcripcional	[44]
Mx	Se unen a nucleocápsides virales	Interfiere con el tráfico intracelular	[47]
P56	Se une a EIF3	Bloquea síntesis de proteínas	[45]
ISG15	Desconocido	Modificación postraduccional	[48]
TRAIL/APO2L	Ligando de receptor de muerte	Apoptosis	[49]
GBP1	GTPasa	Inhibidor de angiogénesis	[47]
ISG20	3'-exonucleasas de RNA y DNA	Antiviral	[47]
PML	Desconocido	Antiviral, antitumoral	[50]
ADAR1	Adenosina desaminasa para dsRNA	Edición de RNA, traducción alterada	[51]
iNOS	Óxido nítrico sintasa	Antiviral	[54]

<i>IRF7, RIG-I,</i>	Señalización a genes	Inducción de IFN tipo I	[52, 53]
<i>MDA5, STAT1</i>	de IFN- α/β o a ISGs		

Funciones inmunomoduladoras de IFN

Adicionalmente a sus actividades antivirales, los interferones actúan aumentando la respuesta inmune. Las proteínas del MHC son sobrerreguladas por interferones. Los IFN tipo I inducen la expresión de MHC de clase I, mientras que el IFN- γ es capaz de aumentar la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tanto de clase I como de clase II. Otros ISG incluyen a los transportadores para el procesamiento de antígeno o TAP, y a los componentes de permeabilización de membrana lisosomal del proteasoma (LMP) [55].

Los IFN también promueven la acumulación de leucocitos en sitios de invasión de patógenos; promueven la expresión de moléculas de adhesión vascular incluida la molécula I de adhesión intracelular (ICAM1). Además, inducen la producción de quimiocinas, entre las que se encuentran tres que están involucradas en la acumulación de células T activadas y macrófagos como CXCL9 (también conocida como MIG, monocina inducida por IFN- γ); CXCL10 (también conocida como IP-10, proteína de 10 kDa inducida por IFN- γ); y CXCL11 (conocida como I-TAC). Estas quimiocinas no se expresan en la ausencia de señalización por IFN [55].

El tratamiento con IFN resulta en una reducida producción del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) en células de carcinoma renal humano, así como a una disminución en la transcripción y secreción del factor de crecimiento vascular VEGF; por lo que esto puede explicar la reducción de la angiogénesis después del tratamiento con IFN en algunos tumores [55].

Finalmente, los IFN son capaces de activar células efectoras de la respuesta inmune y adaptativa como las células NK, células dendríticas, macrófagos y células T, importantes en la respuesta del hospedero contra infecciones virales [55].

Propiedades antiproliferativas de los IFN

Los efectos antiproliferativos de los IFN fueron inicialmente descritos en 1962 por Paucker, quienes mostraron que a 24 horas de exposición de células L con el virus de la enfermedad de Newcastle irradiados con UV o expuestos a interferón, el crecimiento de las células disminuía temporalmente. Este efecto se ha reportado en células malignas y no malignas de muchos linajes celulares variando el grado de respuesta en cada una de ellas [55].

Poco tiempo después, se observó que los IFN tienen la habilidad de inhibir la transformación celular de virus oncogénicos. Oxman *et al* (1967), mostraron que el pretratamiento de células con IFN y

subsecuentemente infectadas con SV40 bloquea la formación del antígeno T del virus y la transformación celular. También, este efecto se observó *in vivo* cuando en animales pre-tratados con IFN, e inoculados posteriormente con poliovirus, hubo un retardo en la aparición del tumor, así como una disminución en el tamaño y el número [56].

Los mecanismos antiproliferativos moleculares de los interferones no están descritos, pero se sabe que el IFN afecta diferentes fases del ciclo celular en diversos sistemas celulares, deteniendo principalmente en la fase G1. Asano *et al*, determinaron que macrófagos murinos tratados con IFN- α , produjeron cantidades mayores de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p19 y p21, llevando a una reducción de sus actividades de cinasa y por lo tanto arrojando el ciclo en la fase G1. También, el tratamiento con interferón induce a los inhibidores p15 y p27 [57, 58].

Otros autores indican que la actividad antiproliferativa de los IFN de tipo I puede deberse a la represión de NF- κ B, un factor de transcripción que tiene un papel importante en la proliferación celular y la respuesta inmune. En células Daudi, el tratamiento con IFN- α suprimió la activación de NF- κ B en una manera dependiente de la dosis empleada [59]

Existen otras evidencias que explican estos efectos como son: que el factor de transcripción c-myc se ha visto regulado negativamente en respuesta a interferón tipo I; que la activación del ISG RIG-G aumenta la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p21 y p27; y que inhibe la fosforilación de la proteína supresora de tumores pRb [55].

Por otra parte, se ha observado que otras rutas de señalización son activadas por el tratamiento con IFN. La unión de los IFN tipo I al IFNAR induce la fosforilación del protooncogen vav, el cual activa la GTPasa Rac1, resultando en fosforilación de p38 MAPK, el cual participa en diferenciación celular y apoptosis y es un mediador importante de progresión de tumores. También, el tratamiento con IFN tipo I y II activa la vía de señalización Crk. CrkL y CrkII son fosforilados en tirosina por Tyk2. Estas proteínas pueden interactuar con la GTPasa Rap1, la cual antagoniza la vía de Ras y puede llevar a un efecto antiproliferativo en células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea. En adición CrkL forma complejos con Stat5 y se une a secuencias GAS para inducir transcripción de genes [55].

Apoptosis inducida por IFN

El tratamiento con IFN- α/β o $-\gamma$ resulta en la regulación positiva de proteínas proapoptóticas como Fas, ligando de Fas (FasL) y TRAIL. Estas proteínas pueden interactuar con el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) o proteínas receptoras TRAIL, resultando en la iniciación de apoptosis a través de caspasa 8. Los interferones también inducen la expresión de caspasa-4 y -8 en diversas líneas celulares y puede activar a caspasas -8 y -9, así como a la caspasa-3 efectora [47].

En algunas células, el gen supresor de tumores p53, importante por sus funciones inductoras de apoptosis y arresto de ciclo celular, así como de miembros proapoptóticas de la familia de genes Bcl-2, Bak y Bax se encuentran incrementados en respuesta a IFN [47].

Además, el tratamiento con IFN tipo I lleva a la fosforilación de las subunidades del receptor de insulina I y 2 (IRS1 e IRS2), resultando en la subsecuente unión de la subunidad reguladora de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) p85, con lo que se activa a la proteína cinasa C- δ (PKC- δ) y puede actuar en la regulación negativa de la apoptosis [47].

Interferón y VPH

Estudios recientes han demostrado que las proteínas del VPH modulan la respuesta a interferón de diversas maneras. Primero, los niveles de ISGs se encuentran reducidos en células infectadas por VPH comparado con queratinocitos normales. Análisis de microarreglos han mostrado que la expresión de MxA, 2'-5'-oligoadenilato sintetasa, así como Stat1 se encontraron disminuidos en células infectadas. Sin embargo, se observó que la adición de interferón induce la expresión de estos genes y luego de 24 horas de exposición, los niveles son iguales a los observados en células normales [25].

Adicionalmente, se ha observado que las proteínas de VPH actúan contra componentes del sistema inmune innato. La oncoproteína E6 ha mostrado unirse al factor regulador de interferón-3 (IRF-3), interfiriendo con su habilidad para actuar como activador transcripcional. También E6 se une a la cinasa Tyk2 de la vía de señalización JAK-STAT inhibiendo su función. De manera similar, E7 se une a IRF-1 y a p48, un componente del complejo ISGF3, bloqueando su translocación al núcleo y su habilidad para activar la expresión génica en respuesta a interferón [35, 36].

Algunos estudios han resaltado que los interferones tienen efecto en el crecimiento de líneas celulares transformadas con VPH-16, así como en la expresión de los oncogenes E6 y E7. En 1994 Agarwal *et*

a/ observaron que el crecimiento de las líneas celulares ECE16-1 y CaSki se redujo en un 70% después del tratamiento con IFN- α e IFN- γ , y la expresión de los oncogenes E6 y E7 disminuyó hasta 90% [60].

En otro trabajo Yim *et al* (2000) examinaron los niveles de E6 y E7 después de ser tratados por 6 y 30 horas con IFN- α , IFN- β y IFN- γ en las líneas celulares positivas a VPH HeLa, SiHa, C-4II, HPK1A y CaSki. Sin embargo, ningún IFN tuvo eficacia en la represión de E6 y E7 contra todas las células probadas. En las células HeLa, las tres clases de IFN lograron un efecto de represión en el nivel de las oncoproteínas. Sin embargo, en las células C-4II y SiHa no se alteraron los niveles de los transcritos [61].

Inmunoterapia con IFN en cáncer

El IFN- α es actualmente el único tratamiento adyuvante aprobado por la FDA para pacientes con melanoma de alto riesgo. En un estudio de meta-análisis que involucró 14 estudios clínicos con un total de 8,122 pacientes en un periodo de 18 años, esta citocina se asoció con una mejoría significativa de la enfermedad. Adicionalmente al tratamiento de melanoma, el IFN- α está aprobado para el tratamiento de algunos cánceres hematológicos, sarcoma de Kaposi asociado a SIDA, y como componente en una combinación anti-angiogénica con bevacizumab para cáncer renal avanzado. El IFN- α ha sido particularmente efectivo en terapia para tricoleucemia, y leucemia mielocítica crónica, en donde con una dosis baja de 2 millones de unidades/m² subcutáneamente tres veces a la semana por un año se relacionó con una respuesta efectiva del 77% [62].

Sin embargo el perfil de efectos adversos que produce esta citocina es muy amplio y abarca síntomas muy comunes que ocurren en el 80% de los pacientes como fiebre, fatiga, dolor de cabeza, síntomas gastrointestinales y mialgias. El IFN- α también produce incrementos en enzimas hepáticas en algunos pacientes, particularmente durante el periodo de dosis alta intravenosa, por lo que deben monitorearse frecuentemente. También se han identificado trombocitopenia, leucopenia y neutropenia, así como síntomas psiquiátricos más serios como depresión (45%), confusión (10%), y manía (menos de 1%). En algunos estudios la depresión fue altamente significativa y han sido reportados incluso suicidios. Otras alteraciones a nivel de sistema inmune incluyen desarrollo de vitíligo e hipotiroidismo, sarcoidosis, lupus, artritis reumatoide, polimialgia reumática y psoriasis [63, 64].

Respecto al IFN- β , su potencial terapéutico en cáncer ha sido demostrado en varios modelos preclínicos y se ha observado que los efectos antiproliferativos son incluso más potentes que los mostrados por IFN- α . Sin embargo, a pesar de su alto potencial, el uso clínico de IFN- β en terapia contra cáncer ha sido limitado por su baja biodisponibilidad y efectos adversos sostenidos. Esta citocina está aprobada actualmente en el tratamiento de esclerosis múltiple por su reactividad de supresión autoinmune [65, 66].

Con relación al IFN- γ , numerosos modelos murinos han sugerido un papel de esta citocina en inmunidad tumoral. Ratones con una delección dirigida de IFN- γ o del receptor de IFN tipo II tienen un riesgo incrementado de desarrollar tumores comparado con los controles. Además, se ha visto que el IFN- γ es citotóxico para algunas células malignas y tiene modesta actividad anti-angiogénica. También es un importante regulador de la actividad antitumoral mediado por otras citocinas, en particular IL-12 e IL-2. Sin embargo, el IFN- γ ha demostrado una limitada utilidad clínica en terapia contra cáncer, lo cual en parte puede ser debido a su papel inmunoregulador, por ejemplo en la activación de células supresoras mieloides [67, 68].

Entre la familia de IFN tipo I se encuentra el IFN- τ , una proteína que se encarga de señalizar el proceso de reconocimiento de la gestación en los rumiantes, pero conserva las características antiproliferativas, inmunomoduladoras y antivirales de los interferones, por lo que es una molécula con potenciales aplicaciones en el campo de la inmunoterapia contra cáncer [5].

Interferón tau (IFN- τ)

El IFN- τ inicialmente fue llamado trofoblastina o proteína de trofoblasto-1 (TP-1), debido a que su principal función es la de señalizar el reconocimiento materno de la gestación en los rumiantes. Es producida por los trofoblastos durante los días 11-21 después de la concepción, y es muy importante para mantener la producción de progesterona por el cuerpo lúteo ya que impide la destrucción del mismo por acción de la prostaglandina F2 alfa (PGF2 α). [5].

Aunque no se ha encontrado que se produzca en humanos, el IFN- τ conserva las mismas actividades antivirales y antiproliferativas en ellos al igual que otros interferones de tipo I, pero a diferencia de estos no se induce por la presencia de virus. En rumiantes, a pesar de ser secretado con el propósito de la señalización en la gestación, se ha visto que induce la expresión de genes estimulados por interferón como 2',5'-OAS, ISG15 y Mx, que participan en la defensa en contra de virus [5].

Una de las características que hacen del IFN- τ una molécula con potenciales aplicaciones terapéuticas en cáncer y otras enfermedades es que presenta una reducida toxicidad en comparación con el IFN- α . Se ha visto que este último presenta toxicidad *in vitro* a concentraciones de 100 U/mL, mientras que a concentraciones de 1000 U/mL, el IFN- τ no muestra evidencia de toxicidad. Esta diferencia en la toxicidad puede deberse a la afinidad con la que se unen a sus receptores cada interferón [69].

Estructura del IFN- τ y unión al receptor de IFN tipo I

El IFN- τ tiene una estructura compuesta por 172 aminoácidos organizados de manera similar a la del IFN- α e IFN- β . Consta de cinco hélices alfa (A-E), unidas por regiones en forma de asa (AB, BC, CD y DE). La proteína tiene cisteínas en las posiciones 1, 29, 99 y 139, las cuales se unen entre sí a través de puentes disulfuro de la siguiente manera la Cys1 con Cys99 y la Cys29 con la Cys139. Se sabe que el segundo puente disulfuro entre Cys29 y Cys139 puede ser importante en la proximidad de los giros AB y DE, y es importante en las actividades biológicas y de unión. Posee un péptido señal, el cual como en otras proteínas, es una secuencia corta e hidrofóbica de aminoácidos que dirige su ubicación final. La proteína madura de IFN- τ posee 161 aminoácidos. La variación más grande con respecto a los otros interferones tipo I se encuentra en el extremo amino terminal, en la hélice A, los bucles AB1 y AB3, la hélice B y el bucle BC, las cuales se sugiere que están involucradas en la unión al receptor (Fig. 4)[70].

La unión del IFN- τ al receptor con respecto a otros interferones es diferente: el IFN- τ se une a receptores de tipo I con una constante de disociación (K_d) de $3.90 \times 10^{-10}M$, mientras que el IFN- α tiene una K_d de $4.45 \times 10^{-11}M$, es decir el IFN- α tiene una fuerza de unión 10 veces mayor que la que tiene el IFN- τ , con lo que se sugiere que estos dos interferones reconocen a su receptor en forma diferente. Experimentos en los que se han usado péptidos sintéticos sugieren que estas diferencias de unión se encuentran en la interacción del extremo amino terminal con el receptor [69].

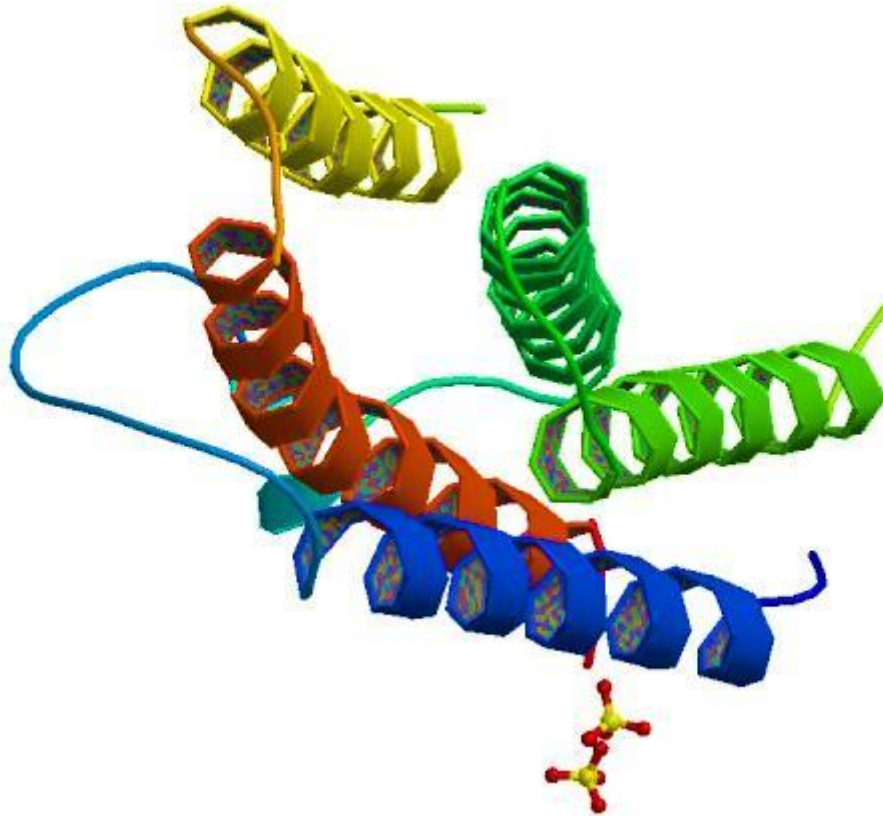


Figura 4. Estructura del IFN- τ ovino

La estructura del IFN- τ es similar a la de otros interferones tipo I, consta de 172 aminoácidos que se organizan en 5 hélices alfa (A-E) y se unen entre sí por medio de bucles (AB, BC, CD, DE). En amarillo se observa la hélice A, en rojo la hélice B, en azul la hélice C, en verde oscuro la hélice D, en verde claro la hélice E. Modificado de Protein Data Bank

Propiedades biológicas del IFN- τ

El IFN- τ tiene efectos implicados en el reconocimiento materno de la gestación en rumiantes. Previene la destrucción del cuerpo lúteo, ya que suprime el desarrollo de mecanismos luteolíticos del epitelio del endometrio, como son la inhibición de la expresión del receptor de estrógenos (ER α) de forma directa, y de forma indirecta al inhibir el receptor de oxitocina (OTR) Cuando esto ocurre se bloquea también a la enzima ciclooxigenasa (COX2) que evita la presencia de ácido araquidónico, principal sustrato de la PGF2 α [71].

Propiedades antivirales

El IFN- τ posee actividades antivirales comparables a las que presentan otros interferones tipo I, pero a diferencia de ellos su expresión no es inducida por infección viral. Se ha determinado que el IFN- τ induce la expresión de moléculas antivirales como la proteína cinasa R (PKR), la cual una vez activada, fosforila a la subunidad alfa del factor eIF-2, previniendo la iniciación de la síntesis proteica y; la 2',5'-oligoadenilatosintetasa (OAS), la cual activa a una ribonucleasa que degrada el RNAm viral y de la célula hospedera [72]. Adicionalmente, en rumiantes durante la gestación también se ha confirmado la inducción de OAS, ISG15 y Mx [73].

Ealy *et al*, (2001) demostraron que cuatro variantes de IFN- τ bovino fueron capaces de proteger a células MDBK y BEND de la infección por el virus de estomatitis vesicular. Por otro lado, el IFN- τ redujo los niveles de la actividad de la transcriptasa reversa de virus de inmunodeficiencia felina en un 98% en linfocitos felinos después de la administración de dosis de 5,000 U/mL; A una dosis menor, de 1000 U/mL redujo la actividad de la transcriptasa reversa en un 92.5% del virus de inmunodeficiencia humana en células HUT74 humanas. En macrófagos derivados de monocitos, el IFN- τ resultó ser muy efectivo inhibiendo la infección por HIV, incluso con mayor magnitud que el IFN- α [74-76].

Asimismo, los efectos antivirales fueron examinados *in vitro* e *in vivo* en células y ganado infectado con virus de leucemia bovina (BLV) por Kohara y Yokomizo (2006). Los títulos del virus disminuyeron en células FLK-BLV y en células mononucleares de sangre periférica tratados con una concentración de 1000 U/mL de IFN- τ , así como en ganado infectado tratado con 10⁶U/Kg de IFN- τ [77]. Por otro lado se ha demostrado la capacidad de este interferón en reprimir la expresión de los oncogenes E6 y E7 en queratinocitos transformados con el genoma del virus de papiloma humano-16. Los niveles

del transcrito de cada gen se redujeron 41 y 81% respectivamente con dosis de 100 U/mL de IFN- τ . [78].

Propiedades antiproliferativas:

Además de su actividad antiviral, el IFN- τ inhibe la proliferación de líneas celulares derivadas de cáncer de diversos orígenes tales como de carcinoma de pulmón humano (NCI-H460), linfoma humano (Daudi), melanoma maligno (SK-MEL-28), carcinoma de células T (ACHN), linfoma cutáneo de células T (HUT 78), adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma de colón (DLD-1), leucemia promielocítica humana (HL-60), leucemia de células T (H9). También mostró actividad antiproliferativa contra líneas celulares normales como WISH y MDBK de 100 y 1000 U/mL respectivamente [4, 79].

La actividad antiproliferativa del IFN- τ en líneas celulares transformadas por el virus de papiloma humano fue demostrada por Johnson *et al.* (1999), donde queratinocitos humanos transformados por VPH-16 (HuKc/HPV-16d-2C) se trataron con 100 U/mL tres veces por semana en un periodo de 15 días. El IFN- τ disminuyó la proliferación de estas células en aproximadamente 40%; El IFN- α 2a por su parte, redujo la proliferación de las células HuKc/HPV-16d-2C hasta aproximadamente el 50%, sin embargo presentó una citotoxicidad mucho mayor en queratinocitos normales inhibiendo su proliferación desde la administración de dosis muy bajas y alcanzando un porcentaje de reducción del 100% con 5000U/mL, mientras que el IFN- τ con esta concentración solo redujo la viabilidad en un 20% [78].

Efectos inmunomoduladores

La eficacia terapéutica del IFN- τ también ha sido comprobada en modelos animales de enfermedades autoinmunes. En 1997, Soos *et al.*, observaron que esta citocina previene la inducción y la reactivación de encefalomielitis alérgica experimental (EAE), el cual es un modelo animal de esclerosis múltiple, en ratones de las cepas NZW y SJL/J. A diferencia del IFN- β , los ratones tratados con IFN- τ no presentaron leucopenia o pérdida de peso, indicativos de toxicidad [80]. La habilidad del IFN- τ de prevenir EAE ocurre por mecanismos mediados por la respuesta inmune. Se ha mostrado que esta citocina puede reducir las respuestas de células T a un péptido antigénico específico. También puede alterar los perfiles de citocinas reduciendo la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α e induciendo la expresión de IL-4, IL-10 y TGF- β . Adicionalmente, se ha demostrado que el IFN- τ induce la función de células T con características supresoras [81].

El tratamiento con IFN- τ incrementa los niveles de β -quimiocinas, incluidas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β . Se ha demostrado que estas citocinas inhiben la replicación del VIH por unión competitiva a CCR5, el co-receptor de HIV. Adicionalmente, este interferón induce la producción de IL-4, IL-10 e IL-16 en respuesta a una infección por este virus. De estas citocinas inducidas la IL-16 tiene efectos antivirales en contra del HIV, porque promueve la actividad de 2,5-OAS, la cual degrada el RNA viral [82].

Por otro lado, Nagaoka *et al.* (2003)., identificaron que el IFN- τ favorece la expresión de IP-10 (proteína inducible por IFN- γ de 10 kDa) en células del endometrio de ovejas. IP-10 es una quimiocina de la familia CXC, la cual es inducida en una variedad de tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, astrocitos, queratinocitos, células epiteliales y células endoteliales, y regula múltiples funciones de la respuesta inmune como la activación de células NK y células T con fenotipo Th1 [83].

Escenario molecular hipotético del IFN- τ en un modelo de cáncer cervicouterino

El IFN- τ tiene potencial para el tratamiento de infecciones virales, desórdenes autoinmunes y diversos tipos de cáncer. El presente trabajo tiene como objetivo investigar las propiedades antiproliferativas de esta molécula en las líneas celulares transformadas con el virus de papiloma humano 16 SiHa y BMK-16/myc (*in vitro*), así como su acción antitumoral en un modelo tumoral murino (*in vivo*) con una perspectiva de terapia contra cáncer cervicouterino.

La prueba de concepto es que el IFN- τ al unirse a receptores de interferón tipo I, presentes en líneas celulares transformadas con el genoma del VPH-16, activa la vía de señalización JAK-STAT, transcribiéndose genes estimulados por interferón, entre ellos PKR, OAS y Mx. Estos tienen propiedades antivirales, los cuales pueden influir sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7, demostrándose de manera indirecta el efecto antiviral de esta molécula. Además, el IFN- τ puede inducir otros genes que tienen efecto sobre el restablecimiento del control del ciclo celular en estas líneas celulares como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (p19, p21, p15 y p27), p53, genes inductores de apoptosis (Fas, FasL, TRAIL, Bak, Bax, caspasas 4 y 8), y disminuir la expresión del oncogén c-myc.

Finalmente, la administración del IFN- τ en un modelo tumoral murino *in vivo* puede tener efectos directos sobre células tumorales que lleven a la inhibición de la proliferación (mencionados anteriormente), o bien efectos indirectos que contribuyen a la regresión del tumor como son inhibición de angiogénesis por medio de la disminución de la expresión de factores de crecimiento como bFGF,

VEGF e IL-8. También puede incrementar la respuesta inmune en contra de células tumorales incrementando la expresión de MHC de clase I, dirigiendo el perfil de citocinas hacia una respuesta Th1 y participando en la activación de células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y células NK (Fig. 5).

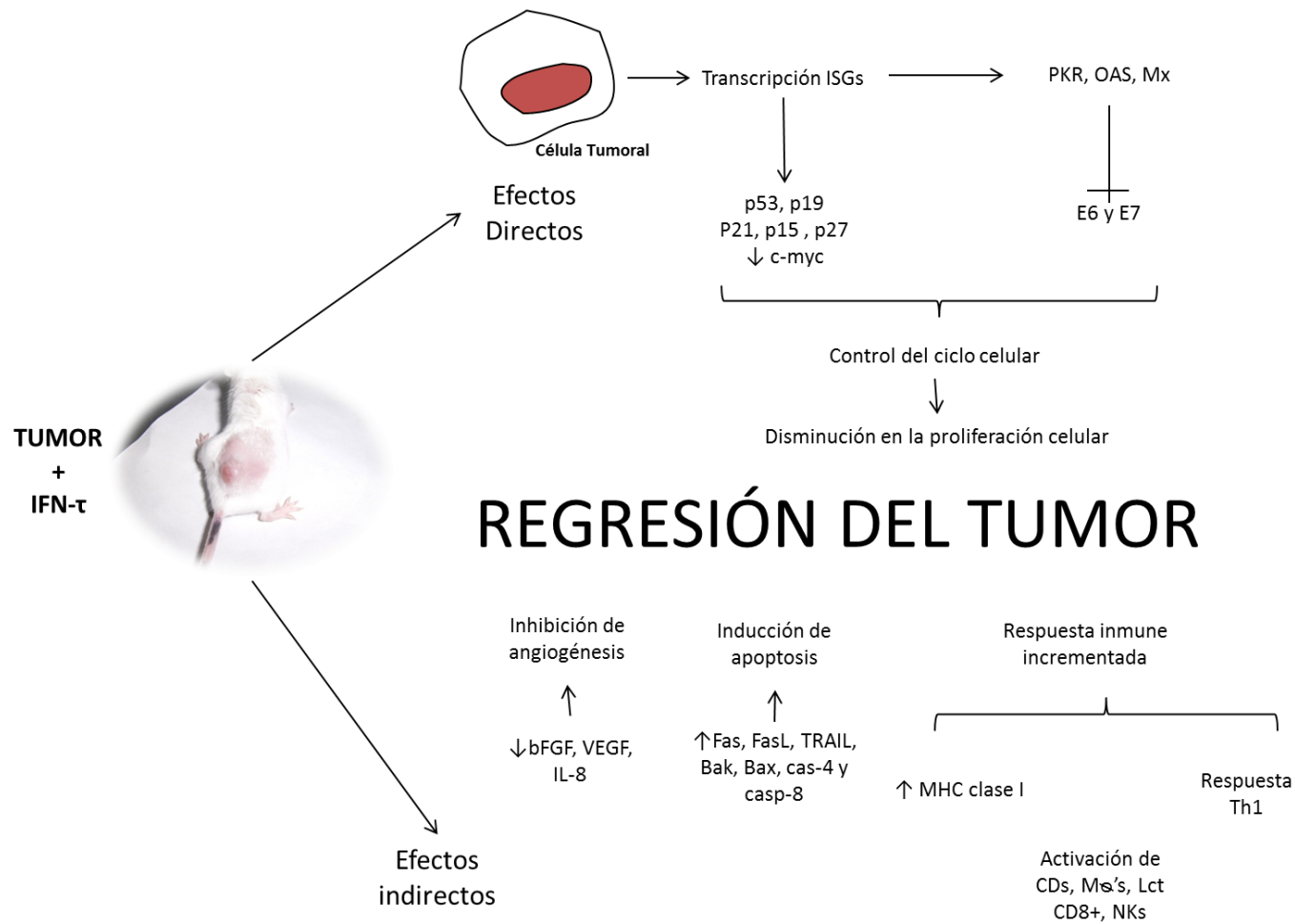


Figura 5. Escenario molecular hipotético del IFN-τ en un modelo de cáncer cervicouterino

El IFN-τ presenta efectos directos en células tumorales como la transcripción de genes antivirales que llevan a la inhibición de la expresión de E6 y E7 y otros genes que ayudan a restablecer el ciclo celular. En un modelo tumoral también presenta efectos indirectos como inhibición de angiogénesis, inducción de apoptosis e incremento en la respuesta inmune.

Justificación

- El cáncer cervicouterino es un problema grave de salud pública a nivel mundial y en la actualidad existen diversas estrategias enfocadas para su prevención, control y tratamiento. En este sentido, diversas moléculas han llamado la atención debido a sus propiedades inmunoregulatoras para el tratamiento del cáncer, como son los interferones.
- El IFN- τ es un interferón de tipo I con potencial terapéutico contra cáncer, ya que presenta menor toxicidad que el IFN- α e IFN- β y conserva la misma actividad antiproliferativa que ellos en distintas líneas celulares de cáncer.
- Hasta el momento se desconoce si el IFN- τ tiene efectos antiproliferativos y antitumorales en un modelo de cáncer cervicouterino, por lo que nos proponemos analizar su efecto *in vitro* e *in vivo* en dos líneas celulares transformadas con VPH-16 y en un modelo tumoral murino.

Hipótesis

El IFN- τ tendrá efecto antiproliferativo, reprimirá la expresión de los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares transformadas por VPH-16, e inhibirá el crecimiento tumoral en un modelo experimental tumoral murino positivo a VPH-16.

Objetivo general

Determinar el efecto del IFN- τ sobre la proliferación y en la expresión de los oncogenes E6 y E7 en células transformadas con VPH-16, así como su acción sobre el volumen tumoral en un modelo experimental tumoral murino positivo a VPH-16.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la actividad antiproliferativa del IFN- τ en las líneas celulares SiHa (humano) y BMK-16/myc (ratón), positivas al VPH-16.
- 2) Evaluar el efecto del IFN- τ sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares SiHa y BMK-16/myc.
- 3) Determinar el efecto antitumoral del IFN- τ en un modelo tumoral murino VPH-16 positivo.

Materiales y Métodos

Cultivo celular

La línea celular derivada de carcinoma cervical SiHa fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC) y contiene de 4 a 6 copias del genoma de VPH-16. Adicionalmente la línea BMK-16/myc fue amablemente donada por la Dra. Sophe Hallez (Université Libre de Bruxelles, Rhode-saint-genese, Bélgica), la cual fue estabilizada por la co-transformación del protooncogén c-myc y el genoma de VPH-16 [84]. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio Dulbeccó's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Life Technologies), 10 µg de ampicilina, estreptomycin y 2.5% de anfotericina B, a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO₂.

Ensayo de proliferación en células SiHa y BMK-16/myc tratadas con IFN-τ

El ensayo de proliferación se realizó mediante el procedimiento colorimétrico basado en la reducción de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) por la acción de la deshidrogenasa mitocondrial (Sigma). En placas de 96 pozos se cultivaron 8,000 cel/pozo por duplicado en medio DMEM al 10% de suero fetal bovino (SFB). Después de 24 horas de incubación se retiró el medio y se agregó medio fresco con 3% de SFB en un volumen de 100 µL. La concentración de SFB se redujo a 3% para evitar que factores presentes en el suero tengan efectos sobre la proliferación celular. Las células se estimularon con concentraciones de 12.5 ng/mL (125 UI/mL), 25 ng/mL (250 UI/mL), 50 ng/mL (500 UI/mL) y 100 ng/mL (1000 UI/mL) de IFN-τ ovino (American Research Products, Inc) y se comparó el efecto a las mismas concentraciones con IFN-β (Probiomed) a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 hrs. Adicionalmente, como control de crecimiento negativo se usaron células sin suero. Posterior a cada estimulación con los interferones, se agregaron 200 µL de MTT(Sigma) a una concentración de 0.456 µg/mL a cada pozo. La placa se incubó a 37°C por 4 hrs para favorecer la reacción de la enzima mitocondrial con el MTT, formando sales de formazán. Posteriormente se retiró la mezcla de reacción y se solubilizaron los cristales de formazán con 200 µL de DMSO y se midió la absorbancia a 540 nm.

Extracción de RNA total a partir de células estimuladas con IFN-τ

Aproximadamente 5×10^5 células SiHa y BMK-16/myc se cultivaron en placas de 6 pozos con medio DMEM al 10% de SFB. Cuando las células tuvieron una confluencia del 80% se retiró el medio y se estimularon con 50 ng/mL (500 UI/mL) de IFN-τ o IFN-β en medio DMEM fresco al 3% de SFB. La

concentración de SFB se redujo a 3% para evitar que factores presentes en el suero tengan efectos sobre la proliferación celular. Las células se incubaron a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas después del estímulo. Las células se lisaron con 500 μ L de Tripure y se centrifugaron en presencia de 200 μ L de cloroformo a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. La fase incolora superior (RNA) se precipitó con 500 μ L de isopropanol y se lavó con etanol al 70% tratado con dietilpirocarbonato (DEPC). El RNA total se resuspendió con agua tratada con DEPC, se cuantificó el RNA en un NanoDrop ND-1000 (PEQLAB, Biotechnology GmbH) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó con 1 μ g de RNA total y se llevó a cabo en dos pasos: La primera reacción se realizó en un volumen de 10.9 μ L a 70°C por 15 minutos y contenía 1 μ L de oligo dT. El volumen necesario para obtener 1 μ g de RNA y el resto se completó con agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregó un coctel que contenía 4 μ L de buffer 5X, 4 μ L de dNTPs a 2.5mM, 0.1 μ L de inhibidor de ribonucleasa y 1 μ L de transcriptasa reversa; se llevó a 37°C por una hora y se almacenó a -20°C hasta su uso.

RT-PCR en tiempo real

La expresión de los oncogenes E6 y E7 se evaluó por RT-PCR tiempo real usando sondas TaqMan en el equipo ABI-PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los primers y las sondas TaqMan usados (Applied Biosystems) fueron los siguientes: E6-F5'-GAGCGACCCAGAAAGTTACCA-3', E6-R: 5'-TGTTGCTTGCAGTACACATTCTAATAT, sonda E6M2FAM 5'-CAGCTCTGTGCATAACT3'-5NFQ, E7-F: 5-CCGGACAGAGCCCATTACAATAT-3 E7-R:5'GAATGTCTACGTGTGTGCTTTGT, sonda-E7FAM:5'-CTACGCTTCGGTTGTGCG-35NFQ. Las reacciones se realizaron usando 5 μ L de 2X Master Mix, 0.5 μ L de la sonda TaqMan y primers, 1 μ L de cDNA y el resto se completó con agua en un volumen final de 10 μ L. Las condiciones de reacción fueron: 5 min a 94°C; 94 °C por 15 seg, 60°C por 15 seg por 40 ciclos a 60°C por 1 minuto y un paso final de 72°C por 5 min. Para realizar el análisis de la expresión génica, se utilizó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde el valor de Ct del gen de interés se normalizo con Ct del gen constitutivo GAPDH y se utilizó como calibrador las células sin tratamiento. Los resultados se muestran cómo aumentos en la expresión comparado con el calibrador.

Ratones y modelo tumoral

El procedimiento para el desarrollo del modelo tumoral murino se realizó de acuerdo con los lineamientos contenidos en el Manual para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Bioterio realizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales. De igual manera se siguieron las medidas recomendadas en el Reglamento del Bioterio del INSP [85].

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad. Los ratones para este estudio no tenían ninguna deficiencia inmune para no alterar la estrategia terapéutica. Se obtuvieron del bioterio del INSP. La fuente de las cepas de los ratones es The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA). Previamente las ratonas fueron rasuradas en el dorso (sitio donde se administraron las células tumorales) permitiendo hacer más evidente y medible el crecimiento tumoral. Se inyectaron vía subcutánea en el dorso de los ratones hembra aproximadamente 5×10^5 células BMK-16/myc que son singénicas con haplotipo H-2^d. El crecimiento tumoral se midió con un vernier electrónico y el volumen tumoral se determinó de la siguiente manera:

$$V = \frac{(D)(d)^2}{2}$$

donde:

D es el diámetro mayor del tumor

d es el diámetro menor del tumor

Tratamiento con IFN- τ en ratonas con tumor

Una vez que el tumor en los ratones hembra alcanzó un volumen de 20-30 mm³ se realizaron dos grupos de cinco ratones. A un grupo con tumor se le administró vía intratumoral 50 ng de IFN- τ (en un volumen de 10 μ L de PBS como vehículo) y se conservó otro grupo sin tratamiento como control. El crecimiento tumoral en ambos grupos se monitoreó cada día hasta el día 15 aprox. posterior al tratamiento. El análisis del efecto antitumoral se realizó comparando las medias del volumen tumoral de ambos grupos experimentales.

Resultados

Actividad antiproliferativa del IFN- τ en líneas celulares positivas a VPH-16

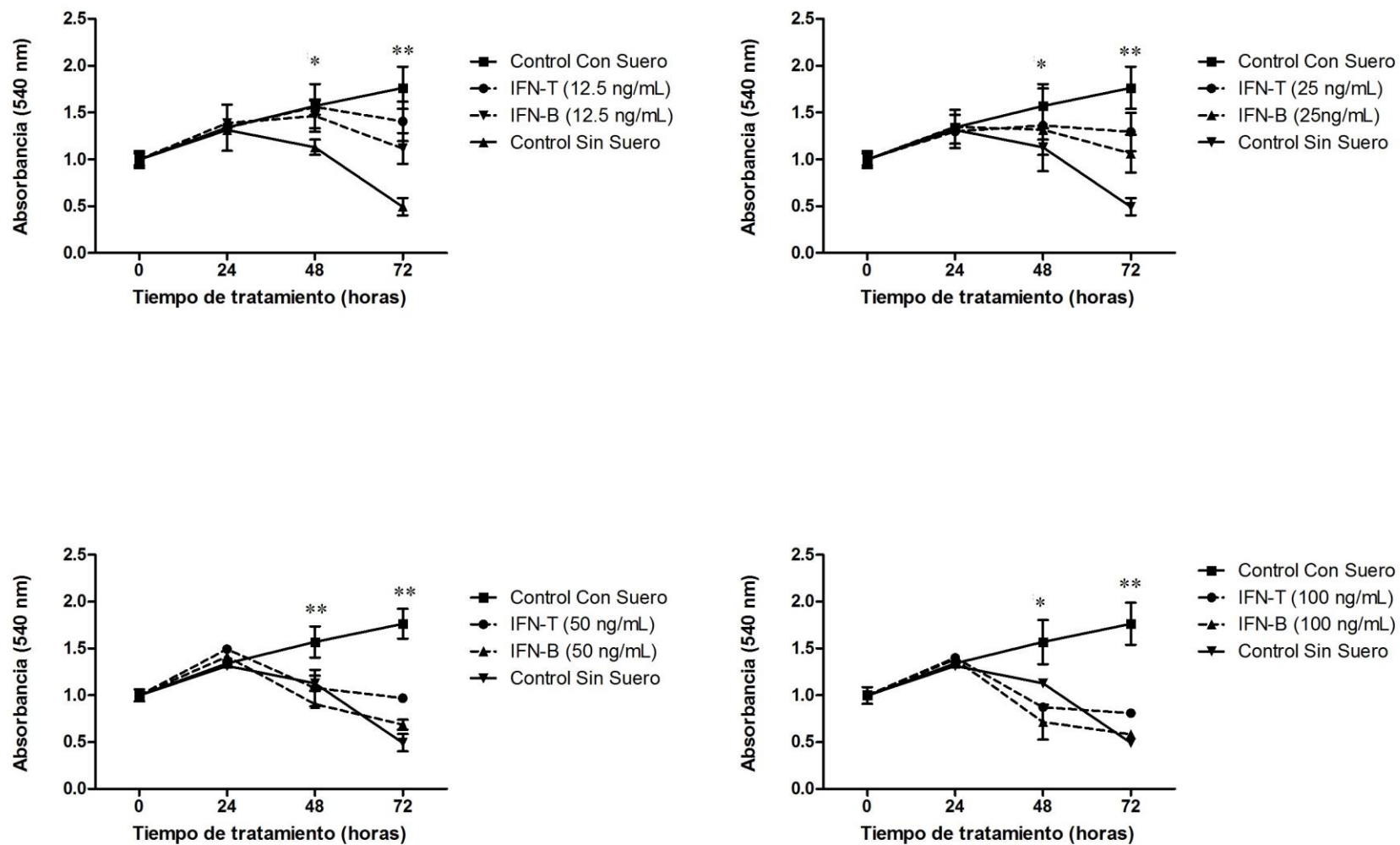
Con el objetivo de investigar el efecto antiproliferativo del IFN- τ sobre líneas celulares transformadas con el genoma del VPH-16, se realizó el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción de MTT por la acción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial. Células SiHa y BMK-16/myc fueron estimuladas con concentraciones ascendentes (12.5, 25, 50 y 100 ng/mL) de IFN- τ e IFN- β y se midió la viabilidad celular a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 hrs) como se describe en materiales y métodos. En las figuras 6 y 7, se grafica la absorbancia medida contra el tiempo de administración de cada interferón para cada línea celular, y en las tablas 2 y 3 se resume el efecto de reducción de la proliferación expresado en porcentajes, comparados con las células sin tratamiento en presencia de 3% de suero bovino fetal. Adicionalmente se determinó la proliferación celular sin suero. Las gráficas representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

En células SiHa, el tratamiento con IFN- τ e IFN- β a las concentraciones de 12.5 y 25 ng/mL no presentaron efecto a los tiempos de 24 y 48 horas posteriores. No obstante, a las 72 horas se puede observar un ligero efecto en la proliferación celular, donde se observa una reducción de 20% y 27% a las concentraciones de 12.5 y 25 ng/mL del IFN- τ ; mientras que con el IFN- β disminuye del 37% al 40% con estas mismas concentraciones. Este efecto de los interferones sobre las células SiHa fue estadísticamente significativo, $p < 0.001$ (Fig., 6A y 6B). Por otro lado, cuando las células SiHa fueron tratadas a mayor concentración (50 ng/mL), en las primeras 24 horas no presentan efectos significativos. Sin embargo a las 48 y 72 horas posterior al tratamiento, la proliferación disminuye significativamente ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) de 31-45% para IFN- τ y 42-61% con IFN- β (Fig. 6C). Adicionalmente, a la concentración de 100 ng/mL sobre las células SiHa, se observó inhibición en la proliferación celular a las 48 y 72 horas posterior el tratamiento. Notablemente se reduce la proliferación en más del 50% con ambos interferones a las 72 hrs. Para el IFN- τ se observó una reducción del 55% y para el IFN- β del 67% con una significancia estadística del $p < 0.001$ (Fig. 6D). Estos resultados indican el efecto antiproliferativo de ambos interferones sobre la línea celular SiHa.

Por otro lado, cuando las células BMK-16/myc fueron tratadas con IFN- τ e IFN- β a las mismas concentraciones se observaron efectos antiproliferativos muy claros a partir de la concentración de 25 ng/mL para el IFN- β desde las 24 horas de estimulación hasta las 72 horas (de 36 a 68%). Sin embargo, para el IFN- τ se observan efectos antiproliferativos a mayor concentración (50 ng/mL), de 59% al 84% de 24 a 72 horas posterior a la estimulación. Este efecto sobre la proliferación celular fue estadísticamente significativo, $p < 0.001$. Notablemente, a estas concentraciones (50 ng/mL) se observan los mismos efectos sobre la proliferación celular de las 24 a las 72 horas posterior al tratamiento, no encontrándose diferencias significativas entre ambos interferones (t-student $p > 0.05$). Este efecto antiproliferativo es más evidente a la concentración de 100 ng/mL en las células BMK-16/myc. Se observa una reducción en la del 92% a las 72 horas con ambos (Figura 7D). De la misma manera no se detectaron diferencias significativas entre ambos interferones (t-student $p > 0.005$). Cabe mencionar que en todos los ensayos de proliferación celular, las células fueron cultivadas con medio sin suero como un control negativo del crecimiento celular. En todos los ensayos, el crecimiento celular se abatió de 48 a 72 horas, sin embargo para la línea celular BMK-16/myc tratada con concentraciones de interferones a 50 y 100 ng/mL, fue mucho mayor el efecto antiproliferativo comparado con las células sin suero.

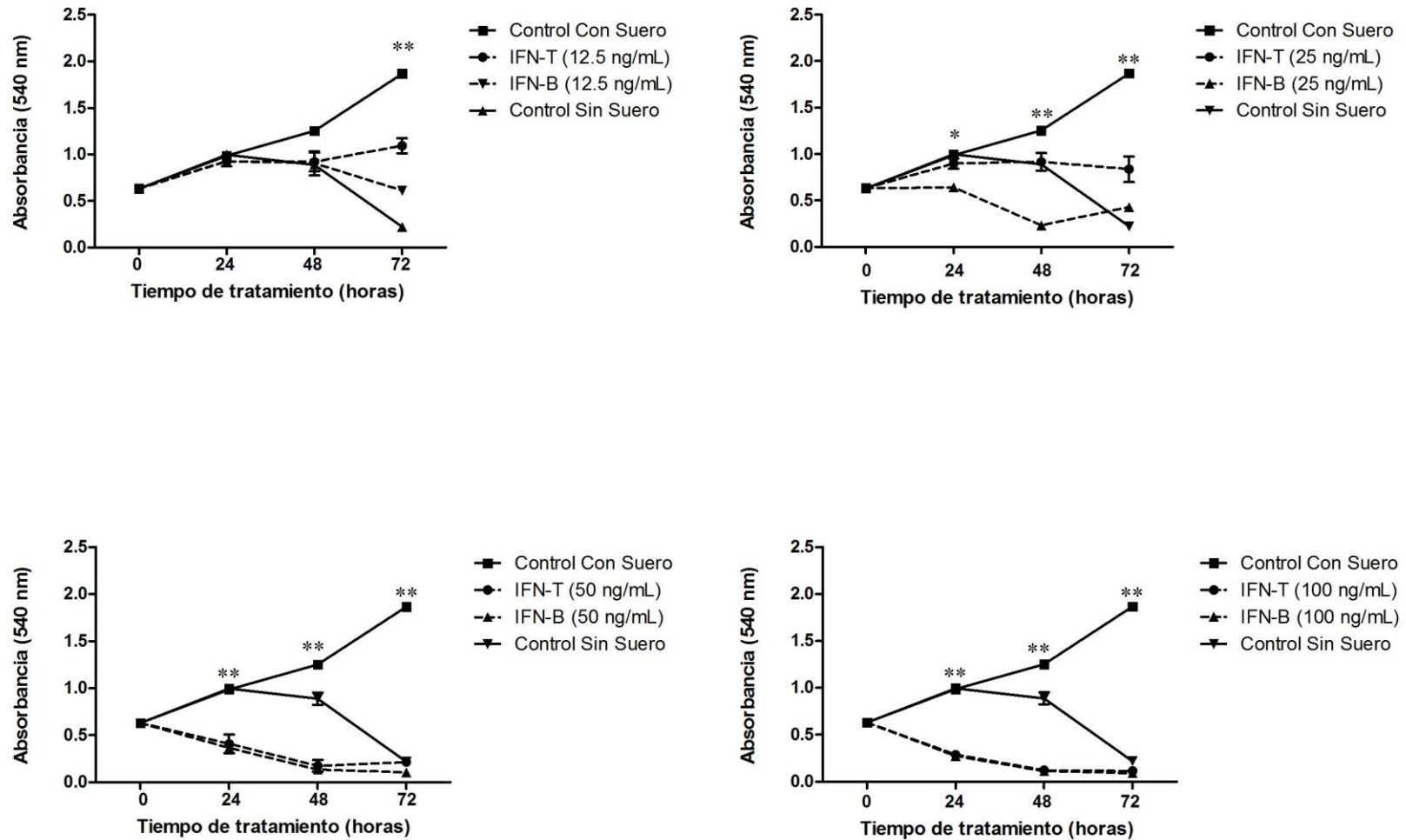
Estos resultados muestran el efecto antiproliferativo del IFN- τ e IFN- β (dosis dependiente) sobre las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc. Además se observó que el IFN- β tiene un efecto antiproliferativo ligeramente mayor en la inhibición de la proliferación que el del IFN- τ sobre la línea celular SiHa. Sin embargo, para la línea celular BMK-16/myc el efecto es muy similar.

Figura 6. Efecto antiproliferativo del IFN- τ en células SiHa



Ensayos de proliferación realizados por el método de MTT en células SiHa tratadas con IFN- τ e IFN- β a concentraciones de 12.5 ng/mL (A), 25 ng/mL (B), 50 ng/mL (C) y 100 ng/mL (D). Los valores de p fueron determinados por medio de un ensayo ANOVA de una vía (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

Figura 7. Efecto antiproliferativo del IFN- τ en células BMK-16/myc



Ensayos de proliferación realizados por el método de MTT en células BMK-16/myc tratadas con IFN- τ e IFN- β a concentraciones de 12.5 ng/mL (A), 25 ng/mL (B), 50 ng/mL (C) y 100 ng/mL (D). Los valores de p fueron determinados por medio de un ensayo ANOVA de una vía (*p < 0.05; **p < 0.001).

Tabla 2. Efecto antiproliferativo del IFN- β e IFN- τ en células SiHa

	Control con Suero	IFN- β				IFN- τ			
		12.5 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	12.5 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
24 HRS	100 %	+3 %	0 %	+5 %	+3 %	0%	-3%	+11%	+4 %
48 HRS	100 %	-7%	-16 %	-42%	-55 %	-1 %	-13 %	-31 %	-44 %
72 HRS	100 %	-37 %	-40 %	-61 %	-67%	-20 %	-27 %	-45 %	-54 %

Tabla 3. Efecto antiproliferativo del IFN- β e IFN- τ en células BMK-16/myc

	Control con Suero	IFN- β				IFN- τ			
		12.5 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL	12.5 ng/mL	25 ng/mL	50 ng/mL	100 ng/mL
24 HRS	100 %	-7 %	-36 %	-63 %	-72 %	-7 %	-10 %	-59 %	-71 %
48 HRS	100 %	-22 %	-51 %	-88 %	-90 %	-20 %	-21 %	-85 %	-89 %
72 HRS	100 %	-55%	-68 %	-92 %	-93 %	-19 %	-38 %	-84 %	-92 %

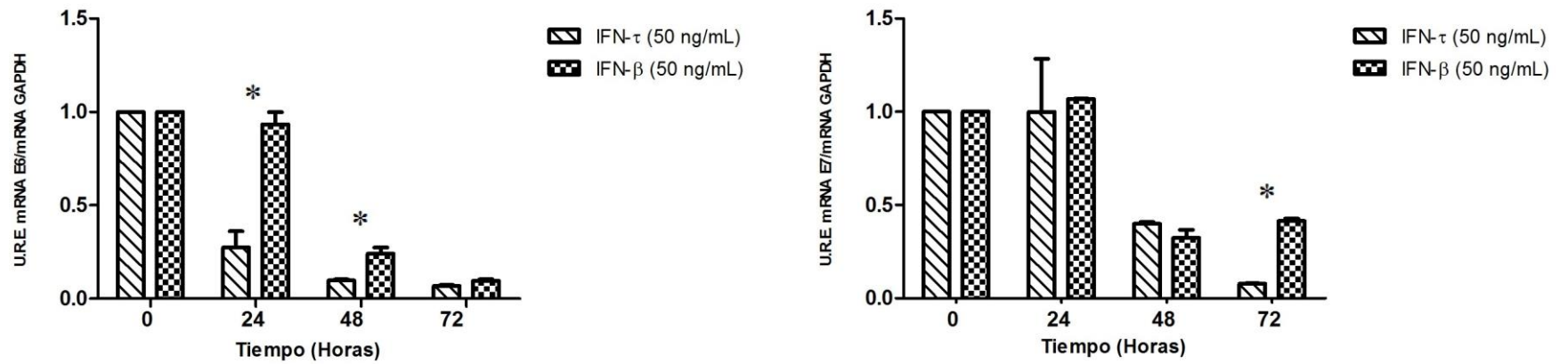
Efecto del IFN- τ sobre la expresión del RNA mensajero de los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares SiHa y BMK-16/myc.

Debido a las propiedades antivirales de los interferones tipo I, se evaluó si el IFN- τ tiene un efecto sobre la expresión de los oncogenes E6 y E7 en las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc VPH 16 positivas y se comparó con el IFN- β . A partir de las células en cultivo tratadas con 50 ng/mL (500 UI/mL) del IFN- τ e IFN- β (concentración basada sobre sus efectos sobre la viabilidad celular previamente mencionados) se determinó la expresión de los oncogenes E6 y E7 por RT-PCR tiempo real. El análisis se realizó normalizando la expresión de los genes de interés con el gen constitutivo GAPDH y se comparó la expresión con las células sin tratamiento (ver materiales y métodos). Las gráficas representan el resultado de un experimento. En la figura 8 se observa el efecto de los interferones sobre la expresión del transcrito de E6 y E7 en la línea celular SiHa. Se determinó que el IFN- τ tiene un claro efecto negativo sobre la expresión del oncogén E6 (Figura 8A); A las 24 horas se observa una reducción del RNA mensajero del 73% y se reprime hasta el 93% a las 72 horas posterior al tratamiento (Tabla 4). En el caso del tratamiento con IFN- β en estas células, se observan cambios en la expresión de E6 hasta las 48 horas y se prolonga hasta las 72 horas (76 y 90% respectivamente). Se puede destacar que el IFN- τ tiene mayor efecto a menor tiempo en la represión de E6 en comparación con el IFN- β (detectando diferencias significativas desde las 24 horas, $p < 0.05$). Por otro lado, el efecto de los interferones sobre la expresión de E7 es menor al observado comparativamente con la expresión de E6; Se presenta disminución del transcrito hasta las 48 horas en las células tratadas con ambos interferones. A las 72 horas el IFN- τ inhibe la expresión de E7 hasta un 92% en comparación con el 59% ejercido por el IFN- β (Figura 8B y tabla 4).

De igual forma, las células BMK-16/myc tratadas con 50 ng/mL (500 UI/mL) de ambos interferones presentaron un efecto represivo en la transcripción de los oncogenes E6 y E7 que es evidente desde las 24 horas posteriores a su administración; tiempo en el cual el RNA mensajero de estos genes se redujo en más del 50% (Figura 9 y tabla 4). En este tiempo no existen diferencias significativas entre el efecto causado por IFN- τ e IFN- β en la expresión de E6 y E7. Sin embargo a 48 horas después de la estimulación, el IFN- τ ejerce un mayor efecto sobre la represión de los oncogenes respecto al del IFN- β ($p < 0.05$). Finalmente, a las 72 horas ambos interferones reducen aproximadamente el 90% la

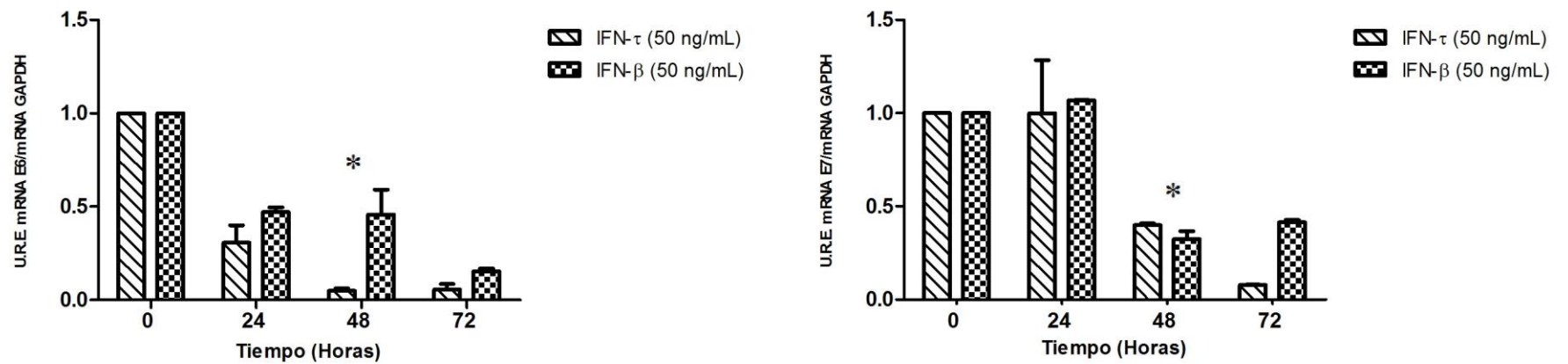
expresión del transcrito de E6 y E7. Por lo tanto, el IFN- τ e IFN- δ disminuye la expresión de E6 y E7 en células SiHa y BMK-16/myc dosis y tiempo dependiente, sin embargo, el IFN- τ tiene mayor efecto en la inhibición de los oncogenes E6 y E7 comparado con el IFN- δ .

Figura 8. Expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células SiHa tratadas con IFN



Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real para los oncogenes E6 (Fig. 8A) y E7 (Fig. 8B) del VPH en células SiHa tratadas con 50 ng/mL de interferón tau y beta. Se grafican las unidades relativas de expresión (U.R.E) con respecto al gen endógeno G3PDH contra el tiempo de tratamiento. Los valores de p fueron determinados por la prueba t de student para determinar diferencias entre el efecto de ambos interferones

Figura 9. Expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células BMK-16/myc tratadas con IFN



Análisis de expresión por RT-PCR tiempo real para los oncogenes E6 (Fig. 9A) y E7 (Fig. 9B) del VPH en células BMK-16/myc tratadas con 50 ng/mL de interferón tau y beta. Se grafican las unidades relativas de expresión (U.R.E) con respecto al gen endógeno G3PDH contra el tiempo de tratamiento. Los valores de p fueron determinados por la prueba t de student para determinar diferencias entre el efecto de ambos interferones (* $p < 0.05$)

Tabla 4. Efecto del IFN- τ e IFN- β en la expresión del RNA mensajero de E6 y E7 en células SiHa Y BMK-myc

Células SiHa					Células BMK-16/myc			
	E6		E7		E6		E7	
	IFN- τ	IFN- β	IFN- τ	IFN- β	IFN- τ	IFN- β	IFN- τ	IFN- β
24 HRS	73 %	7 %	0 %	+7 %	69 %	53 %	79 %	55 %
48 HRS	90 %	76 %	60 %	68 %	95 %	54 %	93 %	73 %
72 HRS	93 %	90 %	92 %	59 %	94 %	85 %	92 %	86 %

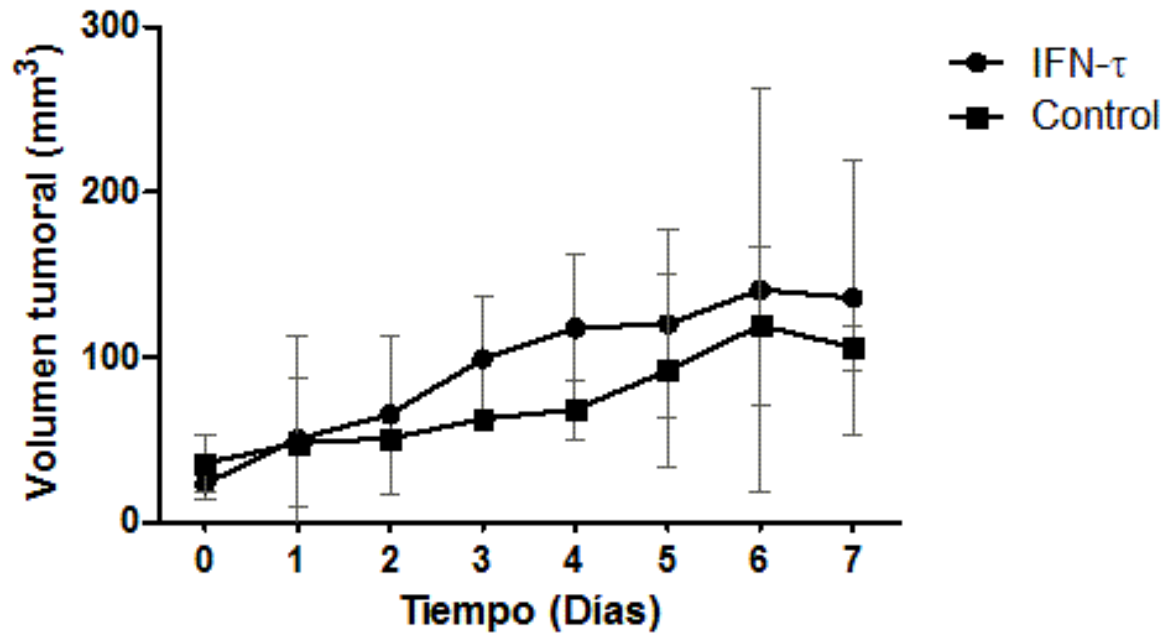
Efecto antitumoral del IFN- τ en un modelo tumoral murino VPH-16 positivo

Una vez determinado que el IFN- τ tiene un efecto antiproliferativo y acción sobre la inhibición de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de VPH 16 en las líneas celulares SiHa y BMK-16/myc, se evaluó su actividad antitumoral sobre un modelo experimental tumoral murino positivo a VPH-16.

Se utilizó un modelo tumoral VPH 16 positivo en un contexto de ratones BALB/c inmunocompetentes generado con la línea celular BMK-16/myc transformada con el VPH 16 singénica a la cepa de los ratones con haplotipo H-2^d. Los diferentes grupos de ratonas hembras de 6 semanas de edad fueron inoculadas en el dorso con 500,000 células BMK-16/myc vía subcutánea y el volumen tumoral se determinó como se describe en materiales y métodos. Ratonas (n=5) con volumen tumoral de 20 a 30 mm³ fueron tratadas con 50 y 100 ng (500 y 1000 UI) del IFN- τ diluidos en 10 μ L de PBS 1X, la administración fue vía intratumoral, evaluándose una y dos dosis del tratamiento. El esquema de tratamiento se estableció inicialmente con una dosis única de 50ng (500 UI), en base a los ensayos de proliferación y de expresión de E6 y E7.

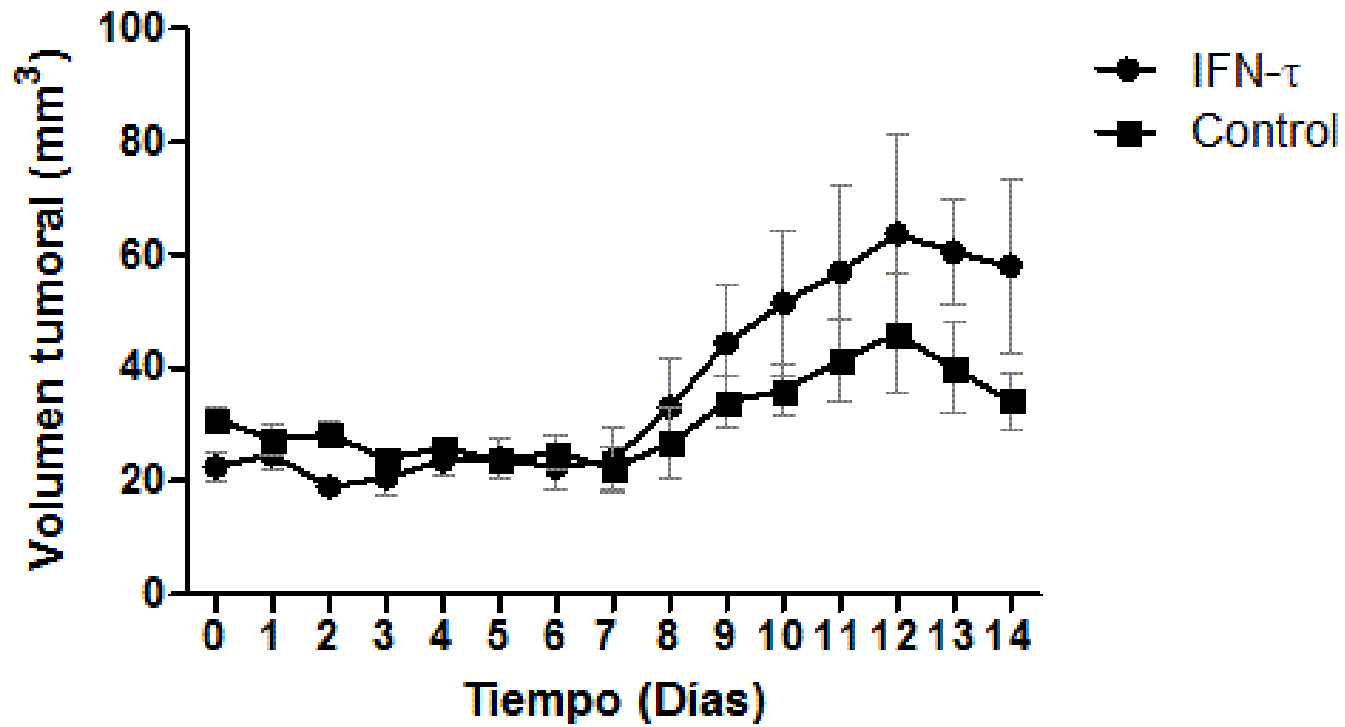
En la figura 10 se observa el crecimiento tumoral en un grupo experimental de ratonas con tumor (n=5) tratadas con 50 ng (500 UI) del IFN- τ dosis única versus un grupos de ratonas con tumor (n=5) pero sin tratamiento (control). Se observa que en ambos grupos experimentales el crecimiento tumoral es constante, no detectando disminución en el volumen ni diferencias significativas entre los grupos experimentales. Estos resultados indican que el IFN- τ a la dosis evaluada no presentan efectos antitumorales en el modelo tumoral. A partir de estos resultados, se decidió utilizar otro esquema de tratamiento que incluyera dos dosis con mayor concentración del IFN- τ (100 ng = 1000 UI/mL) aplicadas en ratonas con el mismo volumen tumoral. En la figura 11 se presentan las curvas de crecimiento tumoral en un grupo experimental de ratonas con tumor tratados con dos dosis de 100 ng en los días 0 (tumor de 20 a 30 mm³) y 4 respecto a la dosis inicial. Además se presenta la curva de crecimiento tumoral del grupo de ratonas con tumor sin tratamiento. Se observa que entre los días 0 y 7 no hay crecimiento tumoral en ambos grupos experimentales. A partir del día 8 el crecimiento tumoral es constante, no presentándose diferencias significativas entre el grupo de ratones tratados con IFN- τ comparado con el grupo control. Por lo tanto el IFN- τ evaluado no presenta efectos antitumorales en el modelo tumoral murino VPH-16 positivo con los dos esquemas de tratamiento empleados.

Figura 10. Efecto del IFN- τ sobre el volumen tumoral



Ensayo de inhibición tumoral. A un grupo de 5 ratones hembra BALB/c con un tumor inicial de 20-30 mm³ se le administró una dosis única de 50 ng/mL al día 0 de IFN- τ en PBS 1X como vehículo y se comparó con otro grupo de 5 ratones sin tratamiento. La gráfica muestra el volumen tumoral contra el tiempo en días.

Figura 11. Efecto del IFN- τ sobre el volumen tumoral



Ensayo de inhibición tumoral. A un grupo de 5 ratones hembra BALB/c con un tumor inicial de 20-30 mm³ se le administraron dos dosis de 100 ng/mL (días 0 y 4) de IFN- τ en PBS 1X como vehículo y se comparó con otro grupo de 5 ratones sin tratamiento. La gráfica muestra el volumen tumoral contra el tiempo transcurrido desde la aplicación en días.

Discusión

Entre las estrategias para la prevención, control y tratamiento de lesiones cervicales y del cáncer cervicouterino asociadas a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), las citocinas juegan un papel destacado por sus propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunoregulatoras. El IFN- τ es un citocina propia de rumiantes que por su homología con el IFN- α e IFN- ω se clasifica dentro de la familia de interferones tipo I. En comparación a los otros miembros de esta familia, el IFN- τ es menos tóxico y su expresión es mayor y más prolongada [5, 73]. Además, el IFN- τ tiene efectos antivirales como la inducción de la expresión de PKR, 2'5-OAS y Mx, y también inhibe la infección de células por diversos tipos de virus como el de la estomatitis vesicular, de inmunodeficiencia humana y felina. Adicionalmente, el IFN- τ suprime la expresión de los oncogenes E6 y E7 en queratinocitos transformados por VPH-16 [74-78]. Por otro lado, el IFN- τ tiene efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer humano de diversas estirpes y orígenes [5, 78]. Por lo tanto, el IFN- τ es una citocina que por sus propiedades tiene un potencial muy promisorio para el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer. Por lo que resulta muy relevante analizar sus propiedades antiproliferativas, antivirales y antitumorales en una neoplasia de importancia en salud pública, como lo es el cáncer cervical.

Nuestros resultados demuestran que el IFN- τ disminuye la proliferación de las líneas celulares SiHa (hasta 54%) y BMK-16/myc (hasta 92%) dosis y tiempo dependiente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Johnson *et al.* (1999), en donde queratinocitos humanos transformados por VPH-16 (HuKc/HPV-16d-2C) tratados con 100 U/mL (10 ng/mL) de IFN- τ y IFN- α 2a, tres veces por semana en un periodo de 15 días, disminuye la proliferación en un 40% y 50% respectivamente. Además se demostró que el IFN- α 2a presentó mayor citotoxicidad en los queratinocitos no transformados, inhibiendo la proliferación a dosis muy bajas y a la concentración de 5000U/mL (500 ng/mL) el 100% de las células se inhiben. No obstante, el IFN- τ con esta concentración solo redujo la viabilidad en un 20%, demostrando menor citotoxicidad en células normales [78].

Adicionalmente, se demostró que el IFN- τ afecta la expresión del RNA mensajero de los oncogenes virales E6 y E7 en células SiHa y BMK-16/myc en más del 90% comparado con células que no fueron tratadas. De igual manera, Johnson *et al.* 1999, demostró que los niveles de los transcritos de ambos

oncogenes, se reducen en el 41% para el oncogén E6 y 81% para E7. Estudios previos han demostrado la capacidad de otros interferones sobre la proliferación y en la represión de E6 y E7. Agarwal y cols., (1994), observaron que el IFN- α y el IFN- γ tienen efectos antiproliferativos en las líneas celulares ECE16-1 y Caski positivas a VPH-16, además de inhibir la expresión de los oncogenes E6 y E7. Por otro lado, Kim *et al* (2000), publicaron que la expresión de E6 y E7 se redujo por la acción de IFN- α , IFN- β e IFN- γ sobre células HeLa, C-4II, CaSki y HPK1A. Sin embargo en este estudio ningún interferón tuvo efecto antiproliferativo o sobre la expresión de E6 y E7 en células SiHa, los cuales si fueron observados en nuestro trabajo con el empleo de IFN- τ [60, 78]. Estos hallazgos, demuestran los efectos antiproliferativos y represores de los oncogenes E6 y E7 de los interferones tipo I y del IFN- τ en diferentes línea celulares. Sin embargo, estos resultados no se habían determinado para el IFN- τ en una línea celular derivada de cáncer cervical y para una línea murina transformada con el VPH 16.

La actividad antiproliferativa de los IFN tipo I no ha sido caracterizada a nivel molecular, pero se ha descrito que puede estar asociada con la represión de NF- κ B, un factor de transcripción que tiene un papel relevante en la proliferación celular y sobre la respuesta inmune. Además se ha observado que los IFN- α e IFN- β inducen la transcripción del gen de p53; el cual codifica para una proteína que contribuye en el control del ciclo celular y en la apoptosis en células dañadas, y lo hace a través de la activación transcripcional de varios genes blanco [59, 86]. Así, el efecto antiproliferativo del IFN- τ detectado en las líneas celulares transformadas con el VPH-16 (SiHa y BMK-16/myc) puede ser consecuencia de la represión de la transcripción de los oncogenes E6 y E7, del aumento en la expresión de p53 y de la represión de NF- κ B. Lo cual puede llevar a restablecer el control del ciclo celular, senescencia celular y/o a la activación de los mecanismos apoptosis de las células SiHa y BMK-16/myc y se refleja sobre la inhibición de la proliferación celular.

Adicionalmente, se observó que el IFN- β tuvo mayor efecto anti-proliferativo en comparación con el IFN- τ en ambas líneas celulares. Estas diferencias pueden deberse a que cada interferón se une a regiones únicas en su receptor y la afinidad con lo que lo hace es diferente. Se ha documentado que el IFN- α 2 y el IFN- β tienen afinidades y constantes de interacción diferentes a las dos subunidades del receptor de interferón tipo I. El IFN- α 2 presenta una constante de disociación en el orden de nanomolar y el IFN- β en picomolar por el IFNAR2; mientras que por el IFNAR1 el IFN- α 2 presenta afinidad en el orden micromolar y el IFN- β nanomolar [87]. Para el caso del IFN- τ , Subramanian *et al*

(1995), describieron que este interferón se une al receptor en células MDBK con una constante de disociación (K_d) de $3.90 \times 10^{-10}M$, mientras que el IFN- α se une con una K_d de $4.45 \times 10^{-11}M$, por lo que el IFN- τ tiene una fuerza de unión 10 veces más débil que el IFN- α [69]. Por lo que las constantes de afinidad al receptor de interferón tipo I, pueden explicar diferentes efectos antiproliferativos de los IFN analizados. Además, se ha observado que los efectos antiproliferativos de los IFN correlacionan con la duración de la señalización JAK-STAT y la prolongada expresión de genes inducibles por interferón (ISG). Maher et al (2008), reportaron que aunque los IFN de tipo I y III activan los mismos componentes de la vía JAK-STAT, difieren en la magnitud de la respuesta antiproliferativa. En este estudio el IFN- λ fue más eficiente que el IFN- α en inducir un efecto citostático que el IFN- α [88].

Por otro lado, se ha descrito que ciertas líneas celulares de cáncer acumulan con el tiempo mecanismos de evasión que las hacen defectuosas en su habilidad para responder a IFN. Tales defectos pueden ser la modificación del receptor y/o la pérdida de su expresión [89]. En el año 2009, Tirone *et al.* analizaron la expresión local de receptores de interferón en muestras de biopsias de cérvix de mujeres con algún grado de neoplasia intraepitelial cervical y mujeres sin lesión, encontrando que la expresión de las subunidades del receptor de interferón tipo I fue significativamente mayor en el grupo control que en las mujeres con lesión [90]. En este sentido, las células SiHa proceden de un caso real de neoplasia intraepitelial cervical grado II, mientras que las BMK-16/myc fueron transformadas con el genoma del VPH-16 en el laboratorio. Por lo que la respuesta diferencial a la proliferación con la misma dosis de interferón en ambas células, puede ser el resultado de una disminución en la expresión del receptor en las células SiHa, por lo que sería interesante analizar la expresión del receptor de interferón en estas dos líneas celulares.

Finalmente, se evaluó el efecto antitumoral del IFN- τ sobre un modelo experimental tumoral positivo al virus del papiloma humano. El tratamiento intratumoral con 50 ng de IFN- τ sobre un tumor con volumen de 20-30 mm³ no presentó efecto sobre la reducción del tumor. Se decidió probar una dosis mayor con dos aplicaciones con el mismo volumen tumoral, sin embargo, no se detectaron efectos antitumorales aparentes. Al respecto, no existen otros reportes donde se haya evaluado el efecto antitumoral del interferón tau o de otro interferón tipo I en modelos tumorales murinos de cáncer cervicouterino positivos a VPH-16. Al demostrarse la capacidad antiproliferativa y su efecto sobre la reducción de la expresión de los oncogenes E6 y E7 en líneas celulares transformadas con el genoma del VPH-16 por el IFN- τ , se sugiere que las dosis usadas en el proyecto no fueron capaces de tener

un efecto claro sobre el modelo tumoral evaluado. Por lo que la perspectiva sería aumentar la dosis de IFN- τ con dosis repetida. Adicionalmente, una limitante de nuestro trabajo fue que en estos ensayos no se comparó el efecto del IFN- τ con el del IFN- β , por lo que se sugiere realizar los experimentos con ambos interferones.

Conclusión y Perspectivas

El IFN- τ tiene efecto antiproliferativo y reduce la expresión de los oncogenes E6 y E7 del virus de papiloma en células SiHa y BMK-16/myc en una manera dependiente de la dosis y del tiempo de administración. Sin embargo la actividad antitumoral de esta citocina no fue demostrada para el esquema de tratamiento empleado. Próximos trabajos se deberán dirigir a probar el efecto antitumoral en este modelo murino experimental tumoral de cáncer cervicouterino aplicando otros esquemas de tratamiento con más y mayores dosis de IFN- τ , así como el uso de interferones de otras compañías. También se pretende analizar el efecto de esta citocina en tumores más pequeños y con otras vías de administración.

Bibliografía

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Banura, C., et al., *Epidemiology of HPV genotypes in Uganda and the role of the current preventive vaccines: A systematic review*. Infect Agent Cancer, 2011. **6**(1): p. 11.
3. Samarajiwa, S.A., et al., *INTERFEROME: the database of interferon regulated genes*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D852-7.
4. Pontzer, C.H., F.W. Bazer, and H.M. Johnson, *Antiproliferative activity of a pregnancy recognition hormone, ovine trophoblast protein-1*. Cancer Res, 1991. **51**(19): p. 5304-7.
5. Chon, T.W. and S. Bixler, *Interferon-tau: current applications and potential in antiviral therapy*. J Interferon Cytokine Res, 2010. **30**(7): p. 477-85.
6. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
7. Lowndes, C.M., *Vaccines for cervical cancer*. Epidemiol Infect, 2006. **134**(1): p. 1-12.
8. Fonseca-Moutinho, J.A., *Smoking and cervical cancer*. ISRN Obstet Gynecol, 2011. **2011**: p. 847684.
9. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-72.
10. Piersma, S.J., *Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients*. Cancer Microenviron, 2011. **4**(3): p. 361-75.
11. Kadaja, M., et al., *Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability*. Virology, 2009. **384**(2): p. 360-8.
12. Campo, M.S. and R.B. Roden, *Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches*. J Virol, 2010. **84**(3): p. 1214-20.
13. Schelhaas, M., et al., *Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002657.
14. Joyce, J.G., et al., *The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5810-22.

15. Rivera, R.D., J; Painel, V., *Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus papiloma humano en epitelio cervical*. Rev Chil Obstet Ginecol, 2006. **71**(2): p. 135-140
16. Wentzensen, N., S. Vinokurova, and M. von Knebel Doeberitz, *Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3878-84.
17. Venuti, A., et al., *Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 140.
18. Barrera-Rodriguez, R., O. Peralta-Zaragoza, and V. Madrid-Marina, [*Molecular bases of cancer immunology*]. Salud Publica Mex, 1995. **37**(4): p. 344-53.
19. Swann, J.S., M, *Immune surveillance of tumors*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(5): p. 1137-1146.
20. Bermudez-Morales, V.H., O. Peralta-Zaragoza, and V. Madrid-Marina, [*Gene therapy with cytokines against cervical cancer*]. Salud Publica Mex, 2005. **47**(6): p. 458-68.
21. Mota, F., et al., *The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium*. Clin Exp Immunol, 1999. **116**(1): p. 33-40.
22. Matthews, K., et al., *Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8378-85.
23. Yang, R., et al., *Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6741-50.
24. Little, A.M. and P.L. Stern, *Does HLA type predispose some individuals to cancer?* Mol Med Today, 1999. **5**(8): p. 337-42.
25. Chang, Y.E. and L.A. Laimins, *Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4174-82.
26. Li, S., et al., *The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha*. Oncogene, 1999. **18**(42): p. 5727-37.
27. Buck, C.B., et al., *Human alpha-defensins block papillomavirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1516-21.

28. Scott, M., M. Nakagawa, and A.B. Moscicki, *Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 209-20.
29. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
30. Stanley, M.A., *Immune responses to human papilloma viruses*. Indian J Med Res, 2009. **130**(3): p. 266-76.
31. Tindle, R.W., *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 59-65.
32. Evans, M., et al., *Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5420-8.
33. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
34. Zijlmans, H.J., et al., *Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF-alpha, and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma*. Cancer, 2007. **109**(3): p. 556-65.
35. Au, W.C., et al., *Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11657-61.
36. Kanodia, S., L.M. Fahey, and W.M. Kast, *Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 79-89.
37. Giannini, S.L., et al., *Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(2): p. 183-9.
38. Bermudez-Morales, V.H., et al., *Correlation between IL-10 gene expression and HPV infection in cervical cancer: a mechanism for immune response escape*. Cancer Invest, 2008. **26**(10): p. 1037-43.
39. Lee, S.M., K, *Cytokines in cancer immunotherapy*. Cancers, 2011. **3**: p. 3856-3893.
40. Kalliolias, G.D. and L.B. Ivashkiv, *Overview of the biology of type I interferons*. Arthritis Res Ther, 2010. **12 Suppl 1**: p. S1.
41. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.

42. Lasfar, A., et al., *Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 349575.
43. Takaoka, A. and H. Yanai, *Interferon signalling network in innate defence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(6): p. 907-22.
44. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
45. Wang, C., et al., *Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 3898-912.
46. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
47. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
48. Andersen, J.B. and B.A. Hassel, *The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe?* Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(6): p. 411-21.
49. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
50. Regad, T., et al., *PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator*. EMBO J, 2001. **20**(13): p. 3495-505.
51. Liu, Y., et al., *Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4419-28.
52. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
53. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
54. Melkova, Z. and M. Esteban, *Inhibition of vaccinia virus DNA replication by inducible expression of nitric oxide synthase*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5711-8.
55. Bekisz, J., et al., *Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon*. Pharmaceuticals (Basel), 2010. **3**(4): p. 994-1015.

56. Oxman, M.N., et al., *The effect of interferon on SV-40 T antigen production in SV-40-transformed cells*. *Virology*, 1967. **32**(1): p. 122-7.
57. Roos, G., T. Leanderson, and E. Lundgren, *Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells*. *Cancer Res*, 1984. **44**(6): p. 2358-62.
58. Matsuoka, M., K. Tani, and S. Asano, *Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages*. *Oncogene*, 1998. **16**(16): p. 2075-86.
59. Rath, P.C. and B.B. Aggarwal, *Antiproliferative effects of IFN-alpha correlate with the downregulation of nuclear factor-kappa B in human Burkitt lymphoma Daudi cells*. *J Interferon Cytokine Res*, 2001. **21**(7): p. 523-8.
60. Agarwal, C., et al., *Interferon and retinoic acid suppress the growth of human papillomavirus type 16 immortalized cervical epithelial cells, but only interferon suppresses the level of the human papillomavirus transforming oncogenes*. *Cancer Res*, 1994. **54**(8): p. 2108-12.
61. Kim, K.Y., L. Blatt, and M.W. Taylor, *The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes*. *J Gen Virol*, 2000. **81**(Pt 3): p. 695-700.
62. Mocellin, S., et al., *Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(7): p. 493-501.
63. Greenberg, D.B., et al., *Adjuvant therapy of melanoma with interferon-alpha-2b is associated with mania and bipolar syndromes*. *Cancer*, 2000. **89**(2): p. 356-62.
64. Jonasch, E. and F.G. Haluska, *Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities*. *Oncologist*, 2001. **6**(1): p. 34-55.
65. Borden, E.C., T.F. Hogan, and J.G. Voelkel, *Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells*. *Cancer Res*, 1982. **42**(12): p. 4948-53.
66. Chawla-Sarkar, M., D.W. Leaman, and E.C. Borden, *Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(6): p. 1821-31.
67. Street, S.E., et al., *Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma*. *J Exp Med*, 2002. **196**(1): p. 129-34.
68. Elhilali, M.M., et al., *Placebo-associated remissions in a multicentre, randomized, double-blind trial of interferon gamma-1b for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. The Canadian Urologic Oncology Group*. *BJU Int*, 2000. **86**(6): p. 613-8.

69. Subramaniam, P.S., et al., *Differential recognition of the type I interferon receptor by interferons tau and alpha is responsible for their disparate cytotoxicities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12270-4.
70. Radhakrishnan, R., et al., *Crystal structure of ovine interferon-tau at 2.1 Å resolution*. J Mol Biol, 1999. **286**(1): p. 151-62.
71. Roberts, R.M., L. Liu, and A. Alexenko, *New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1997. **56**: p. 287-325.
72. *The 2-5A system. Molecular and clinical aspects of the interferon-regulated pathway. Proceedings of the Sixth International Symposium of the Research Institute, Hospital for Sick Children. Toronto, Ontario, Canada, June 30-5, 1985*. Prog Clin Biol Res, 1985. **202**: p. 1-478.
73. Mirando, M.A., et al., *Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha 11*. J Reprod Fertil, 1991. **93**(2): p. 599-607.
74. Pontzer, C.H., et al., *Potent anti-feline immunodeficiency virus and anti-human immunodeficiency virus effect of IFN-tau*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4351-7.
75. Ealy, A.D., et al., *Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products*. Endocrinology, 2001. **142**(7): p. 2906-15.
76. Rogez-Kreuz, C., et al., *Lack of IFN-gamma production in response to antigenic stimulation in human IFN-tau-treated lymphocytes*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 444-52.
77. Kohara, J. and Y. Yokomizo, *In vitro and in vivo effects of recombinant bovine interferon-tau on bovine leukemia virus*. J Vet Med Sci, 2007. **69**(1): p. 15-9.
78. Johnson, J.A., H.K. Hochkeppel, and J.D. Gangemi, *IFN-tau exhibits potent suppression of human papillomavirus E6/E7 oncoprotein expression*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(10): p. 1107-16.
79. Bazer, e.a., *Antitumor therapy using ovine or bovine interferon-tau*, 1999: United States.
80. Soos, J.M., et al., *Oral feeding of interferon tau can prevent the acute and chronic relapsing forms of experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 1997. **75**(1-2): p. 43-50.

81. Mujtaba, M.G., J.M. Soos, and H.M. Johnson, *CD4 T suppressor cells mediate interferon tau protection against experimental allergic encephalomyelitis*. *Journal of Neuroimmunology*, 1997. **75**(1-2): p. 35-42.
82. Rogez, C., et al., *Anti-human immunodeficiency virus activity of tau interferon in human macrophages: involvement of cellular factors and beta-chemokines*. *J Virol*, 2003. **77**(23): p. 12914-20.
83. Rogez, C., et al., *Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Tau Interferon in Human Macrophages: Involvement of Cellular Factors and -Chemokines*. *J Virol*, 2003. **77**(23): p. 12914-12920.
84. Hallez, S., et al., *Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(3): p. 428-37.
85. UNAM. [cited 2013 2013]; Available from: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/ReglamentoCICUAE.pdf>.
86. Takaoka, A., et al., *Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence*. *Nature*, 2003. **424**(6948): p. 516-23.
87. Lamken, P., et al., *Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers*. *J Mol Biol*, 2004. **341**(1): p. 303-18.
88. Maher, S.G., et al., *IFNalpha and IFNlambda differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(7): p. 1109-15.
89. Wagner, T.C., et al., *Interferon receptor expression regulates the antiproliferative effects of interferons on cancer cells and solid tumors*. *Int J Cancer*, 2004. **111**(1): p. 32-42.
90. Tirone, N.R., et al., *Local expression of interferon-alpha and interferon receptors in cervical intraepithelial neoplasia*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(12): p. 2003-10.