



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Efecto de la Metformina sobre la enzima IDO1 en tejido cervical del modelo
murino K14E7”**

TESIS

Que presenta:

BIOL. LUZ DEL CARMEN VALERIO JÁCOME.

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Directoresde de tesis:

DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL.

DR. ENOC MARIANO CORTÉS MALAGÓN.

Ciudad de México

Agosto 2021

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme realizar mis estudios de maestría de manera satisfactoria al brindarme una beca como estudiante de tiempo completo, al igual que por su atención y comprensión para realizar los papeleos de forma eficiente y en tiempo.

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal, por la oportunidad que me brindó de formar parte de su laboratorio, y de esta forma realizar experimentos y tomar el curso manejo de animales del Bioterio del UPEAL-CINVESTAV. Por su asesoría académica, tiempo, paciencia, compromiso y comprensión en diversas circunstancias que se presentaron a lo largo de este proyecto y por su constante apoyo académico y personal. Por alentarme a generar un compromiso conmigo misma, priorizar mi crecimiento y sobre todo para creer en mí como futura científica.

Al Dr. Enoc Mariano Cortés Malagón, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación. Por compartir su conocimiento científico, por su constante apoyo académico y personal. Por su cálida compañía virtual, palabras de aliento, sabios consejos y cuestionamientos.

Al Dr. Alejandro García Carrancá, por la oportunidad que me brindó para realizar experimentos aún en tiempos difíciles. Por su asesoría académica, tiempo, y comprensión en el desarrollo del presente proyecto. Y por permitirme ser partícipe de los seminarios del laboratorio 9 “Virus y Cáncer” del Instituto Nacional de Cancerología.

Al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por formar parte de mi comité tutorial y hacer cuestionamientos y aportaciones puntuales en el desarrollo del presente trabajo.

A la QBP. Karen Griselda de la Cruz López, por su apoyo constante en el manejo del modelo murino K14E7 y por enseñarme a extraer tejidos, su maceración,

extracción de proteínas, así como la técnica de Western Blot. Por compartir su conocimiento científico, y por su constante apoyo académico y personal.

Al Dr. Heriberto Abraham Valencia González por su paciencia y comprensión para transmitirme sus conocimientos sobre la técnica de Inmunocitoquímica, preparación y filtración de soluciones. Y finalmente, por compartir su conocimiento científico, y sobre todo, por su constante apoyo académico y personal.

A mi comité tutorial.

Agradezco al Instituto Nacional de Cancerología por abrirme sus puertas y así poder realizar mi proyecto de tesis, gracias por sus apoyos otorgados para la asistencia a diversos cursos y capacitaciones.

Finalmente, agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por abrirme las puertas para realizar la maestría y por facilitar los trámites necesarios durante el proyecto de grado.

DEDICATORIA

A todas las personas con las cuales tengo la dicha de coincidir, y que de una u otra forma hicieron que esto fuese posible. Y en especial les dedico éste trabajo con mucho amor y admiración a mis padres. Y al resto de mi hermosa familia, que siempre están conmigo en las buenas y en las malas.

C.T.M.A.Y.A.P.K.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	5
II. RESUMEN.....	6
III. INTRODUCCIÓN	8
i. Virus del Papiloma Humano, modelo K14E7 y Cáncer Cervicouterino	8
ii. Catabolismo del Trp y sus efectos biológicos.....	9
iii. La enzima IDO1 en cáncer cervicouterino.....	12
iv. Metformina, su farmacocinética, efectos en respuesta inmune y cáncer cervicouterino	14
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. HIPOTESIS.....	19
VI. OBEJTIVOS.....	19
VII. DIAGRAMA DE TRABAJO	20
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
IX. RESULTADOS	24
X. DISCUSIÓN.....	31
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
XII.ANEXOS.....	44

I. ABREVIATURAS

VPH16	Virus del papiloma humano tipo 16
VPH-AR	Virus del papiloma humano de alto riesgo
VPH-BR	Virus del papiloma humano de bajo riesgo
CaCu	Cáncer Cervicouterino
E2	17 β -estradiol (estrogeno)
ER α	Receptor de estrogeno alfa
ER β	Receptor de estrogeno beta
E7	Oncogén E7
K14E7	Modelo murino transgénico que expresa la proteínas E7 del VPH, dirigido por el promotor de citoqueratina 14
IDO1	Indolamina 2,3 dioxigenasa 1 (enzima)
TDO2	Triptófano 2,3-dioxigenasa (enzima)
Kyn	Kinureninas
KP	Vía de las kinureninas
WB	Western Blot
IHC	Inmunohistoquímica
IL4I1	Interleucina 4 inducida por el gen I
AhR	Receptor de Hidrocarburos de Arilo

II. RESUMEN

En México, el cáncer cervicouterino representa el cuarto cáncer en incidencia y la tercera causa de mortalidad por cáncer en mujeres. La infección persistente con el virus del papiloma humano de alto riesgo ha sido asociada como el factor más importante durante la carcinogénesis cervical (CC); sin embargo, la infección es insuficiente para la inducción de la CC. En las últimas décadas, se han reportado diversos componentes del microambiente tumoral como cofactores para el desarrollo de muchos tipos de cánceres sólidos. De especial interés es la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO1), que tiene como actividad suprimir la función de linfocitos T y NK y generar células con actividad inmunosupresora (Treg y MDSCs). Esta enzima, se ha reportado que tiene un papel importante en el desarrollo de cáncer cervical y de tumores sólidos. Por lo tanto, representa un blanco terapéutico atractivo.

Por otro lado, compuestos moleculares que modulan la respuesta inmune, ofrecen ventaja sobre el combate contra el cáncer. Partiendo de un número creciente de evidencias que muestran que en la metástasis hay un gran número de células inmunes en el microambiente tumoral (TME) las cuales influyen en gran medida en el fracaso de las inmunoterapias. Lo cual se resume en que el TME tiene efecto en el consumo energético y la reprogramación de células inmunes de manera que las vuelve tolerogénicas e ineficientes a la erradicación tumoral. Por otra parte, se le ha atribuido a la metformina un papel como inmunoregulador que depende de la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK). El presente estudio plantea un posible efecto de la metformina sobre la enzima IDO1 en el cáncer cervicouterino.

ABSTRACT

In Mexico, cervical cancer represents fourth cancer in incidence and the third cause of cancer mortality in women. Persistent infection with high-risk human papillomavirus has been associated as the most important factor during cervical carcinogenesis (CC); however, the infection is insufficient to induce CC. In recent decades, several components of the tumor microenvironment have been reported as cofactors for the development of many types of solid cancers. Of special interest is the enzyme indolamine 2,3 dioxygenase (IDO1), whose activity is to suppress the function of T and NK lymphocytes and generate cells with immunosuppressive activity (Treg and MDSCs). This enzyme has been reported to play an important role in the development of cervical cancer and solid tumors. Therefore, it represents an attractive therapeutic target.

On the other hand, molecular compounds that modulate the immune response offer an advantage over the fight against cancer. Based on a growing number of evidences that shows that in metastasis there are a large number of immune cells in the tumor microenvironment (TME) which greatly influence the failure of immunotherapies. This is summarized in that TME has an effect on energy consumption and the reprogramming of immune cells in a way that makes them tolerogenic and inefficient at tumor eradication. On the other hand, metformin has been attributed a role as an immunoregulator dependent on activated AMP-kinase (AMPK). The present study raises a possible effect of metformin on the IDO1 enzyme in cervical cancer.

III. INTRODUCCIÓN

i. Virus del Papiloma Humano, modelo K14E7 y Cáncer Cervicouterino

A nivel mundial y en México, el cáncer cervicouterino (CaCU) está clasificado en el cuarto lugar de incidencia y el tercer lugar en mortalidad de cánceres que ocurren en las mujeres (Bray et al., 2018). Aproximadamente, el 90% de las muertes por este cáncer ocurren en países de bajos y medianos ingresos, donde la mortalidad es 18 veces más alta que en los países desarrollados (Who, 2018). El virus del papiloma humano (VPH) es considerado el factor más importante en el desarrollo de las lesiones precursoras y cáncer cervical. Hay más de 200 genotipos de VPH, de éstos un subgrupo específico denominado de alto riesgo (VPH-AR) está asociado con el desarrollo de la enfermedad. Para el caso de cáncer cervicouterino, el DNA de VPH-AR ha sido detectado por lo menos en el 95% de los casos, entre estos, cerca del 60% tienen infección con VPH-16 y un 15% con VPH-18 (Schiffma et al., 2016). Los virus de bajo riesgo tales como VPH-6 y VPH-11 son encontrados en verrugas genitales y están raramente asociados con cáncer (Wise et al., 2008; Mazarico et al., 2012). El papel oncogénico de los VPH-AR es atribuido, principalmente, a las oncoproteínas E6 y E7; de éstas, la oncoproteína E7 del VPH-16 es considerada la principal proteína transformante en tejido cervical. Por ejemplo, el modelo murino que expresan la oncoproteína E7 (K14E7) y que es tratado durante 6 meses con 17- β estradiol (K14E7+E₂) desarrolla carcinoma cervical. En contraste, el modelo que expresa la oncoproteína E6 (K14E6), y que también es tratado con estradiol, no desarrolla cáncer en el tracto reproductivo (Riley et al., 2003). Además, se requiere de la expresión continua de E7 para que el cáncer cervical se mantenga (Jabbar et al., 2012; Jabbar et al., 2009). Cabe destacar que el modelo K14E7, cuando es tratado a diferentes tiempos con estradiol, presenta etapas muy similares de la enfermedad (lesiones precursoras y cáncer cervical) como lo que sucede en la carcinogénesis cervical en mujeres (Riley et al., 2003; Arbeit, 2003). Por otra parte, el modelo K14E7+E₂ tiene similitud en el patrón de expresión de un grupo de biomarcadores (Ki67, PCNA, MCM7, p16, β -catenina) que han sido reportados en biopsias provenientes de pacientes con lesiones

precursoras o cáncer cervicouterin (Brake et al., 2003; Cortés et al., 2013; Bulut et al., 2011). Por lo anterior, este modelo es considerado como una herramienta útil en estudios preclínicos y en la investigación de los aspectos moleculares de carcinogénesis cervical.

La carcinogénesis cervical puede ser explicada, parcialmente, por la infección persistente de VPH-AR, por lo que existen otros factores que contribuyen con el desarrollo de esta neoplasia. Por ejemplo, estudios epidemiológicos reportan que hay un riesgo incrementado para el desarrollo de carcinoma cervical en mujeres con infección del virus del papiloma humano y alta paridad, o después del uso prolongado de contraceptivos orales (Lacey et al., 1999; Lacey et al., 2000; Madeleine et al., 2001). Por otra parte, en las últimas décadas se ha tomado interés por la relación entre los genes de la respuesta inmune y el CaCU, especialmente se han enfocado a la región del MHC, TNF, LTA, TAP1, TAP2, IL-10, CCR2, INF- γ , KIR, CD38, Fas y ligando de Fas, etc (De Araujo et al., 2008; Maciag et al., 2000). Además, también se han hecho estudios epidemiológicos y experimentales que apoyan la hipótesis de que la inflamación crónica en el microambiente tumoral contribuye al desarrollo y progresión del cáncer (Castle and Giuliano, 2003; Moss and Blase, 2005).

ii. Catabolismo del Trp y sus efectos biológicos

El microambiente tumoral (TME) representa una red compleja entre células tumorales y una variedad de componentes que incluyen células inmunes, células del estroma, matriz extracelular y células endoteliales. Un amplio panel de señales e interacciones toman lugar resultando en una modulación bidireccional de funciones celulares. Muchos estímulos inducen crecimiento tumoral y diseminación de las células metastásicas que contribuyen a el establecimiento de un microambiente inmunosupresor. Este último rasgo inhibe la función de células efectoras inmunes, principalmente linfocitos T citotóxicos, células B y NK, y/o expandiendo las poblaciones de células reguladoras, incluidas las células Treg y Breg, macrófagos asociados a tumores y MDSCs. Por otra parte, recientemente se

ha estudiado el papel de enzimas que catabolizan el triptófano y su papel en la inmunosupresión en el TME.

El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial para la dieta humana; sus metabolitos tienen roles claves en diversos procesos fisiológicos: como en la síntesis de proteínas, en la señalización de respuesta al estrés dietario y ambiental, como neurotransmisores (serotonina y triptamina), etc. El 95% de Trp es metabolizado por la vía de las kinureninas (KP) (Platten et al., 2019). Esta vía se caracteriza por la producción de metabolitos como kynureninas, NADP⁺, NAD(P)H, ácido nicotínico, ácido picolínico (PA), ácido quinolínico (QA), y otros metabolitos K de tipo inmunosupresor como 3-hidroxiquinurenina (3-HK) y ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA) (Badawy et al., 2017)

Las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) y las indolaminas 2,3-dioxigenasa (IDO1 e IDO2) en mamíferos catalizan el primer paso en la degradación del Trp formando N-formil kinurenina, el cual es rápidamente convertido a L-kinurenina por la enzima N-formilkinurenina formamidasa. Estas enzimas difieren en su localización en los tejidos, en su estructura, en la especificidad de su sustrato, y en la función que realizan. Aunque ellas catalizan la misma reacción de oxidación que involucra la degradación del anillo de pirrol para formar N-formilkinurenina, ellas difieren entre sí mecanísticamente (Jaswir et al., 2011). Las enzimas IDO1 e IDO2 son inducidas por mediadores proinflamatorios, como son las endotoxinas y el interferon-gamma (IFN- γ) (Taylor and Feng, 1991) además, son codificados por genes ligados. La enzima IDO1 es monomérica y constitutivamente expresada por células dendríticas inmaduras, en órganos linfoides secundarios, en células epiteliales del tracto genital femenino, en células endoteliales de la placenta, en el pulmón, en células intersticiales del intestino, y en células β -pancreáticas (Dai and Zhu, 2010) IDO2 se expresa principalmente en hígado, cerebro, riñones y en células presentadoras de antígenos; su actividad catalítica es más débil relativamente y no contribuye al catabolismo sistémico del triptófano (Lauren et al., 2014; y Ball, et al., 2007). Se ha reportado que IDO es un mediador de la tolerancia y el escape inmune en cáncer (Prendergast, 2008).

Además, se sabe que metabolitos bioactivos como lo es el ácido quinurénico, es capaz de regular la homeostasis energética del tejido adiposo lo cual impacta al gasto energético sistémico y en la inflamación (Agudelo, et al., 2018). Cabe mencionar que productos metabólicos del Trp por vía de las Kyn como lo son ácido cinabarinico, ácido xanturénico y ácido kinurénico poseen afinidad por el Receptor de Hidrocarburo de Aro (AhR) (Sun et al., 2020), y una vez que se unen, AhR se transloca al núcleo y se heterodimeriza con el translocador nuclear del receptor de hidrocarburo (ARNT) y posteriormente se une a elementos de respuesta a xenobioticos (XRE) lo cual induce la transcripción de genes (Nguyen and Bradfield, 2008), entre los que se sabe están involucrados en modulación inmune (Stockinger et al., 2014), angiogenesis (Denison et al., 2003), metabolismo de lípidos y fármacos (Murray et al., 2014), hematopoyesis (Gutiérrez and Quintana, 2018), y motilidad celular (Nguyen and Bradfield, 2008).

Más recientemente se encontró una nueva enzima que cataboliza al Trp, IL411, la cual produce indole y ácido kynurenico como metabolitos que activan a su vez a AhR y que tiene un impacto directo en los procesos mencionados anteriormente (Sadik et al., 2020).

El dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) es un producto de la vía de las kinureninas, el cual es un cofactor esencial en reacciones químicas celulares, como en la reparación del DNA y en la síntesis del ATP.

En ausencia de ácido nitrocinínico, el triptófano es fuente de la síntesis *de novo* de NAD⁺ y de NADP (su forma fosforilada) (Moffett, 2003).

Los múltiples efectos que hay a nivel de la respuesta inmune se deben justamente a la disminución de Trp y el aumento de las Kyn, donde estas últimas activan al AhR y este una vez activo, induce a la proliferación de células Tregs CD4⁺ y CD25⁺ teniendo así, un efecto inmuno supresor de las células T efectoras (Teff) (Fuertig et al., 2016) y de las células Natural Killer (NK) (Cheong and Sun, 2017). Siendo IDO un blanco prometedor para combatir enfermedades como Alzheimer, depresión y cáncer (Cervantes et al., 2017).

Hasta ahora se sabe que IDO tiene una baja actividad enzimática en la mayoría de los tejidos, sin embargo, es activada bajo estímulos proinflamatorios. Por otra parte, se encontró que IDO posee motivos putativos ITIMs los cuales controlan la estabilidad de la degradación proteica vía proteosoma liderada por suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) inducida por IL-6 en DCs (Orobana et al., 2008), pero también se sabe que IDO contribuyen en la tolerancia dirigida por TGF- β independiente de su actividad enzimática en contexto no inflamatorio (Pallotta et al., 2011).

iii. La enzima IDO1 en cáncer cervicouterino

Al igual que en muchos tumores sólidos, en cáncer cervicouterino se ha reportado la sobreexpresión de IDO1. Por ejemplo, en el modelo murino K14E7 se ha reportado que la expresión crónica de IFN- γ está relacionada con la inhibición de las células T efectoras CD8+ (Tuong et al., 2018). Por otra parte, en muestras de mujeres con NIC 2 y 3 se corroboró una alta expresión de IFN- γ y de IDO1, donde la actividad de ésta última en ambos modelos demostró tener un rol en la inmunosupresión local (Mittal et al., 2013; Hascitha et al., 2016).

Al igual que en el cáncer de mama, se ha visto que el Trp, en específico el L-triptófano y L-valina en plasma sirven como biomarcadores en CaCu para responder a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes (Hou et al., 2014). Además, al evaluar metabolitos del triptófano, se ha visto un incremento significativo de niveles de ácido quinolinico y una disminución de ácido kinurenico, lo cual se correlacionó con el aumento de la cantidad de Q/K, propuesto como un indicador pronóstico 2011 (Fotopoulou et al., 2011).

Existen otras técnicas que detectan al Trp y sus metabolitos de manera no invasiva en suero de pacientes con CaCu, sin embargo, sería más representativo aumentar la N de este tipo de evaluaciones y a la vez sería interesante ver el tipo de bandas que se generan entre los tres tipos de Neoplasias Intrapetiliales Cervicales (NIC) ya que en ese estudio sólo se evaluó NIC1 y Cáncer Cervical Escamoso (SCC) (González et al., 2014).

Ahora bien, recientemente se han utilizado a las naphtoquinonas, compuestos naturales y sintéticos, a los cuales se les ha atribuido que tienen efectos anticancerígenos, donde Córdova et al 2020 demostraron que por medio de naphthoquinones modificadas con aminoácidos en especial con triptófano, observaron una disminución en la proliferación en líneas celulares de cáncer cervical con respecto a una línea celular no tumorigénica (Córdova et al., 2020)

En cuanto a trabajos que se han hecho en modelos animales, el uso de Cidofovir (CDV) un tratamiento ampliamente utilizado para combatir HPV16, De Schutter et 2013 utilizaron células positivas a HPV16 para un xenotransplante (células SiHa) en ratones inmunodeficientes, midieron en suero los niveles de Trp y Kyn, y encontraron una disminución tanto de Trp como de Kyn en suero 4 semanas después de utilizar CDV comparado al ratón control (De Schutter et al., 2013).

Hasta ahora lo que se ha hecho en el modelo murino inmunodeficiente para el estudio de factores claves en la transformación tumoral, respuesta a terapias, invasión y metástasis inducidas por células tumorales humanas y citocinas tumorales infiltradas con base a los xenotransplantes (Richmond and Su, 2008) puede no extrapolarse de manera eficiente para el estudio y aplicación en humanos.

Por otro lado, Mittal et al., 2013 desarrollaron un modelo murino de injerto de piel (de tal forma se imita las lesiones precancerosas hiperplásicas) para comprender el mecanismo inmunosupresor asociado por la infección del VPH, donde encontraron que en la piel de estos ratones existe un incremento de la expresión a nivel de mensajero de IDO1 y de su actividad enzimática (Kyn/Trp) en comparación de la cepa murina control C57BL/6, además, evidenciaron que las células dendríticas de la piel del K14E7 tienen niveles elevados del receptor de IFN- γ . Igualmente, observaron en biopsias de mujeres con NIC2/3 una expresión elevada de mRNA de IDO1 y de IFN- γ , donde éste último es bien sabido que induce la expresión de IDO.

Por todo lo anterior y otros experimentos que realizaron para evaluar a las células infiltradas, le atribuyen como otros autores a IDO un rol inmunomodulador teniendo un efecto directo sobre la disminución de las poblaciones de células Teff.

Además, Tuong et al 2018 compararon un recopilado de perfiles de expresión exhibidas de citocinas y células inmunes infiltradas del K14E7 con respecto a los ratones C57BL/6 los cuales son consistentes con estudios en humanos, además, mediante estudios previamente realizados por otros grupos (*poner algunos autores con trabajos) pudieron identificar vía modificaciones genéticas y con el uso de fármacos la ablación/depleción de tipos de células inmunes residentes y/o infiltradas, una elevada producción de iNKT (células Natural Killer invariantes) IFN- γ (y por tanto IDO1) , IL-7 y 10 que a su vez contribuyen en la tolerancia inmune. Y que las células NKT y la expresión crónica de IFN- γ en los K14E7 inhiben la función efectora de las células T eff CD8+. Sin embargo, los autores son conscientes de las diferencias existentes en los sistemas inmunitarios del humano y del ratón, pero lo que si concuerdan es que el ambiente inmunosupresor del K14E7 o lo que pudiera estar ocurriendo en el epitelio cervical con sutiles diferencias modifican la habilidad de las células presentadoras de antígeno (APCs) para responder a la oncoproteína E7 persistente. Por todo lo anterior ellos plantean que el ratón K14E7 es un modelo para probar nuevos fármacos dirigidos a la respuesta inmune.

Además, Low et al 2020 observaron un mecanismo de regulación entre Notch1 e IDO1 a nivel transcripcional en células troncales cancerosas, las cuales se ha visto que tienen la propiedad de ser radioresistentes, y la inhibición de IDO1 aumentó la radiosensibilidad de las CSCs cervicales, y finalmente, vieron que las kynureninas potencian la capacidad de autorenovación de las células cancerosas cervicales. En otros estudios que se han utilizado inhibidores de IDO, han visto que (Jung et al., 2019).

iv. Metformina, su farmacocinética, efectos en respuesta inmune y cáncer cervicouterino

La metformina (*dimetilbiguanida*) es un derivado sintético de la guanidina, aislado de los extractos de *Galega officinalis*, una planta con un destacado efecto benéfico en pacientes con diabetes tipo2 (DT2) (Bailey and Day, 2004). De hecho, la

metformina reduce los niveles de glucosa en ayunas y posprandial al inhibir la producción de glucosa hepática, reducir la absorción intestinal de glucosa y mejorar la captación y utilización de glucosa por los tejidos periféricos, teniendo efectos benéficos adicionales para la salud, como la reducción de peso, prevención de complicaciones cardiovasculares (De Fronzo et al., 1995), y también, se ha indicado para el tratamiento del síndrome poliquítico (Scarpello and Howlett, 2008). Recientemente, se han dilucidado nuevos efectos pleiotrópicos de la metformina en distintas vías, debido a su farmacocinética; la cual es absorbida por el transportador de cationes orgánicos 3 (OCT3), y posteriormente es transportado por OCT1 al torrente sanguíneo para actuar sobre diferentes tejidos como se muestra en la Fig.1.

Los mecanismos moleculares posterior a que la metformina actúa, siguen siendo complejos, y con controversias. Sin embargo, se sabe que en primera instancia la administración de la metformina da como resultado la fosforilación y activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) en hígado debido a que la metformina inhibe al complejo I de la Cadena respiratoria mitocondrial (Gong et al., 2013). Por otro lado, la hiperinsulinemia está asociada al incremento de IGF-1 (mitogéno que potencia la proliferación celular), donde la metformina reduce la hiperinsulinemia ofreciendo un efecto protector ante la tumorigénesis (Yang, 2009; Goodwin et al., 2009)

Por otro lado, la metformina disminuye la inmunosupresión en enfermedades autoinmunes teniendo un efecto anti-inflamatorio (Tomczynska et al., 2016), además, se sabe de la existente relación entre la metformina y el sistema inmunológico, donde la metformina podría estar jugando un rol en el inmunometabolismo por medio de la vía AMPK, influenciando una respuesta efectora de las células T (Blagih et al., 2015), en sí, la metformina actúa como inmunoregulador a consecuencia de la alteración del metabolismo energético, como es el caso del potenciamiento de las células T de memoria CD8 por la modulación que se da en el metabolismo de los ácidos grasos (Pearce et al., 2009). Por último, la metformina tiene un efecto antitumorogénico en CaCu por medio de la activación de AMPK Fig.2.

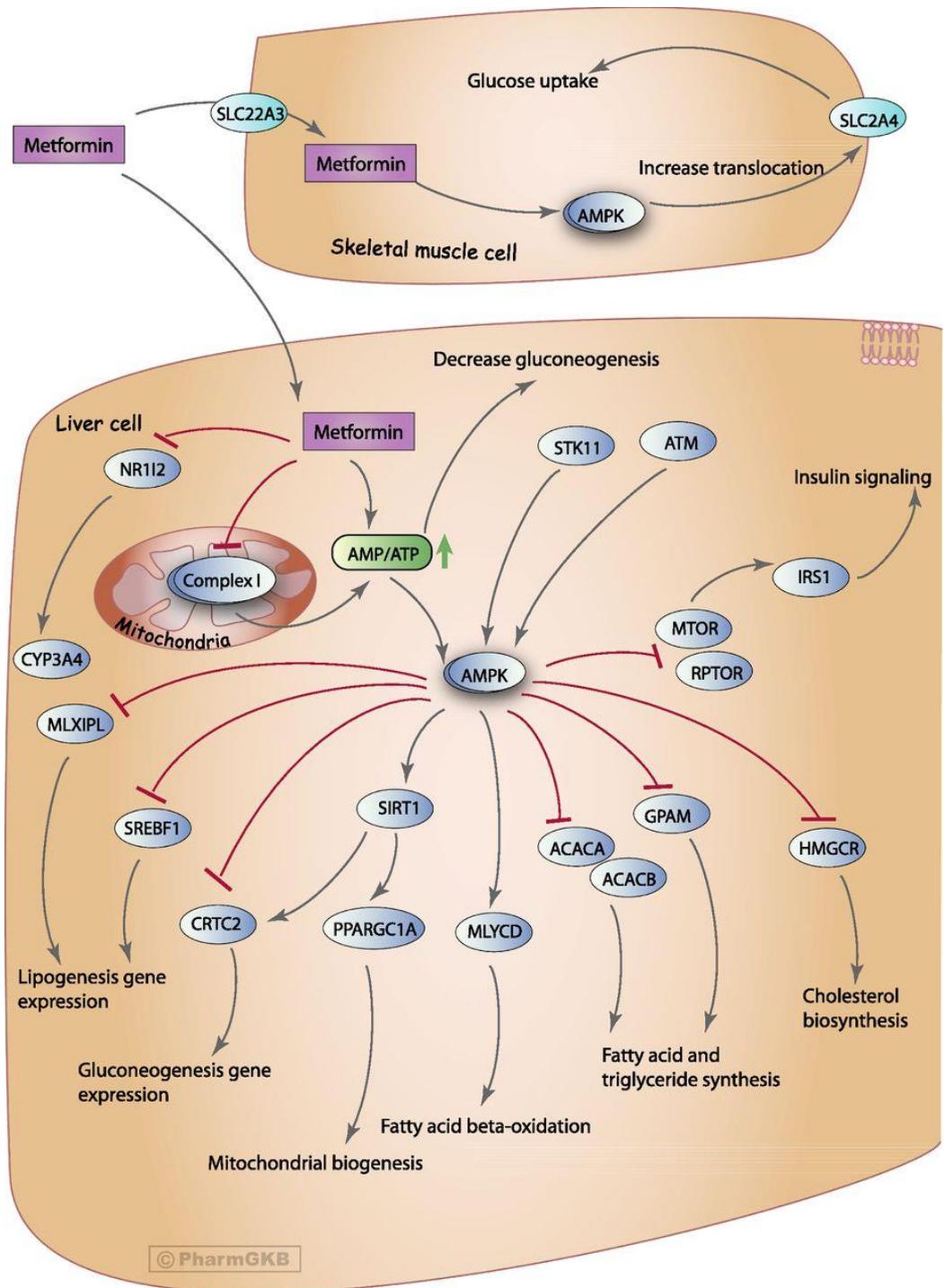


Figura 1. Farmacodinamia de la metformina y sus blancos moleculares. Genes que se modifican por acción del tratamiento de la metformina. (Gong et al., 2013)

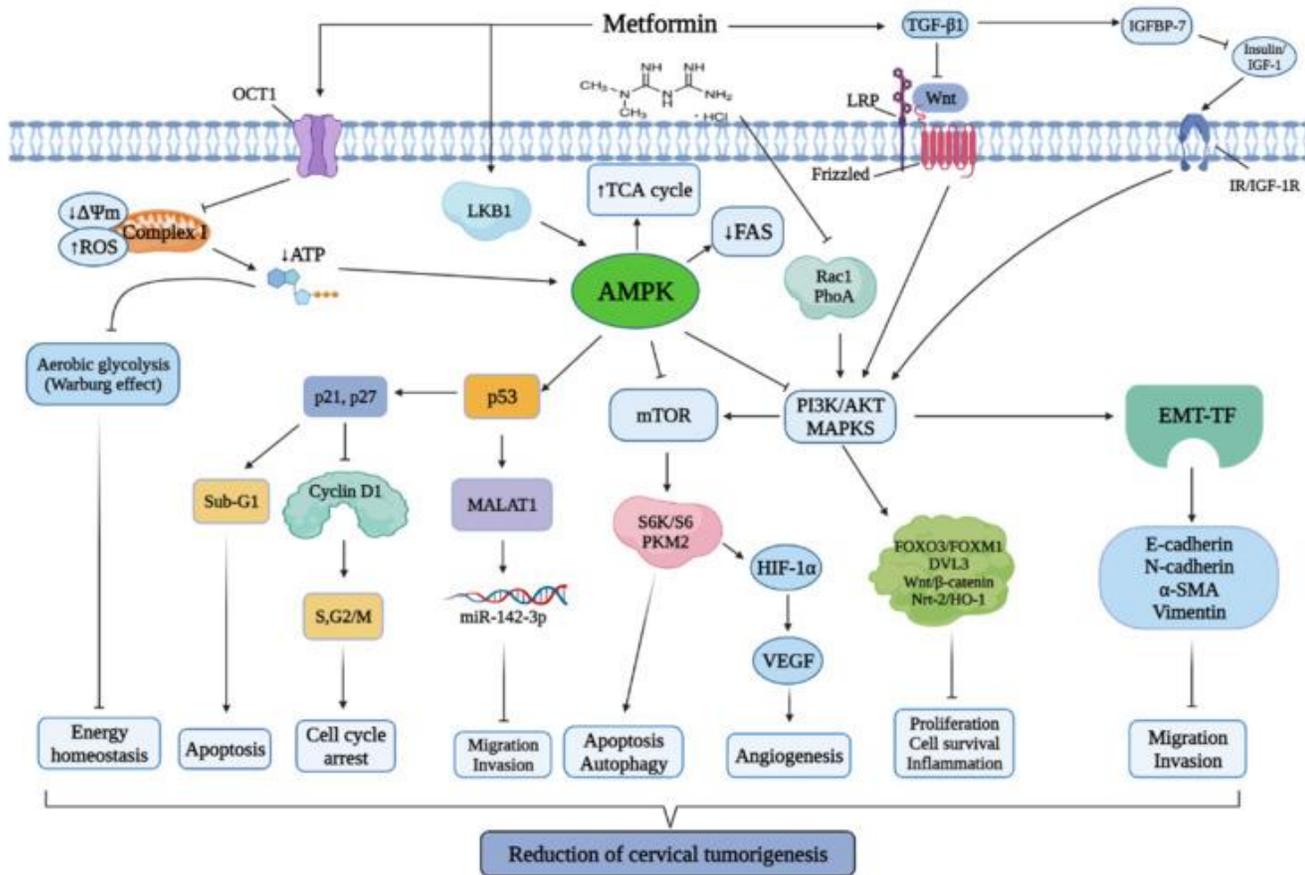


Figura 2. Mecanismos moleculares protectores de la metformina en CaCu. Por medio de la activación de AMPK por la LKB1, la metformina es capaz de activar o inhibir genes blancos río abajo; como son mTOR, p53, PI3K/AKT, MAPKs, TGF-β1, IGF-1 y factores de transcripción como FOXO3a, DVL3, Wnt/β-catenina, HIF-1a. La activación de estas vías de señalización tienen como resultado el arresto del ciclo celular, apoptosis y la autofagia que en conjunto inhiben la tumorigenesis en la célula cervical cancerosa. (Chin et al., 2020)

Cabe mencionar que hay una gran cantidad de publicaciones sobre metformina y cáncer, de los cuales sólo el 10% de la publicaciones son en cáncer cervicouterino. Y se hace incapié de que no hay ninguna publicación donde se le relacionara a la metformina con IDO1 en CaCu.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es un problema importante de salud pública. Esta enfermedad está ampliamente asociada a la infección del virus del papiloma humano. Se ha relacionado fuertemente al microambiente inmunosupresor como un importante factor para la progresión, persistencia y severidad del cáncer.

En adición, se han reportado factores inmunomoduladores, como la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa 1 (IDO1) en la periferia y dentro de algunos tumores, por lo cual se le ha atribuido que tiene un papel crucial en el microambiente y en la progresión tumoral. Para el caso de cáncer cervicouterino se ha visto que IDO1 está presente en neoplasias intraepitelial cervicales y que su mayor expresión está relacionado con la severidad de dichas neoplasias.

Por otro lado, el modelo murino que utiliza el promotor de la queratina 14 para la expresión de la oncoproteína E7 (K14E7) es importante para el estudio de la carcinogénesis cervical bajo el tratamiento con estradiol, pero también es un excelente modelo por sí solo ya que tiene una gran similitud con la historia natural de la enfermedad que sucede en mujeres, debido a que se le ha atribuido a la oncoproteína E7 el papel más importante en la carcinogénesis cervical. Por último, el modelo K14E7 ha sido utilizado ampliamente para comprender los mecanismos inmunosupresores asociados a la infección del VPH.

En el 2013 nuestro grupo de trabajo realizó un perfil de expresión génica global en tejido cervical del modelo K14E7 tratado con estradiol, y se encontraron 134 genes diferencialmente expresados, y algunos de estos codifican elementos de la respuesta inmune, como es el caso de IDO1, el cual se encontró *incrementado en su expresión*.

Actualmente, se ha incrementado el número de estudios que se centran en los mecanismos por el cual IDO1 está modificando el microambiente tumoral y su rol en la supresión inmune en tumores de diversos tipos de cáncer. Además, la metformina se ha utilizado ampliamente como tratamiento en diversos tipos de cáncer, donde se le ha atribuido que tiene efecto sobre distintas vías metabólicas,

y últimamente en vías que modifican la diferenciación de las células T, por lo cual se le atribuye un efecto inmunomodulador. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizados estudios donde se vea si hay un efecto inmunomodulador de la metformina sobre la enzima IDO1 en el modelo murino K14E7.

Con este estudio se abre la posibilidad de comprender el mecanismo por el cual la metformina regula de manera negativa la expresión de IDO1, y de usar a la metformina como coadyuvante de la terapia convencional en cáncer cervicouterino.

V. HIPOTESIS

El tratamiento con metformina disminuirá la expresión y actividad de IDO1 en tejido cervical del modelo K14E7

VI. OBEJTIVOS

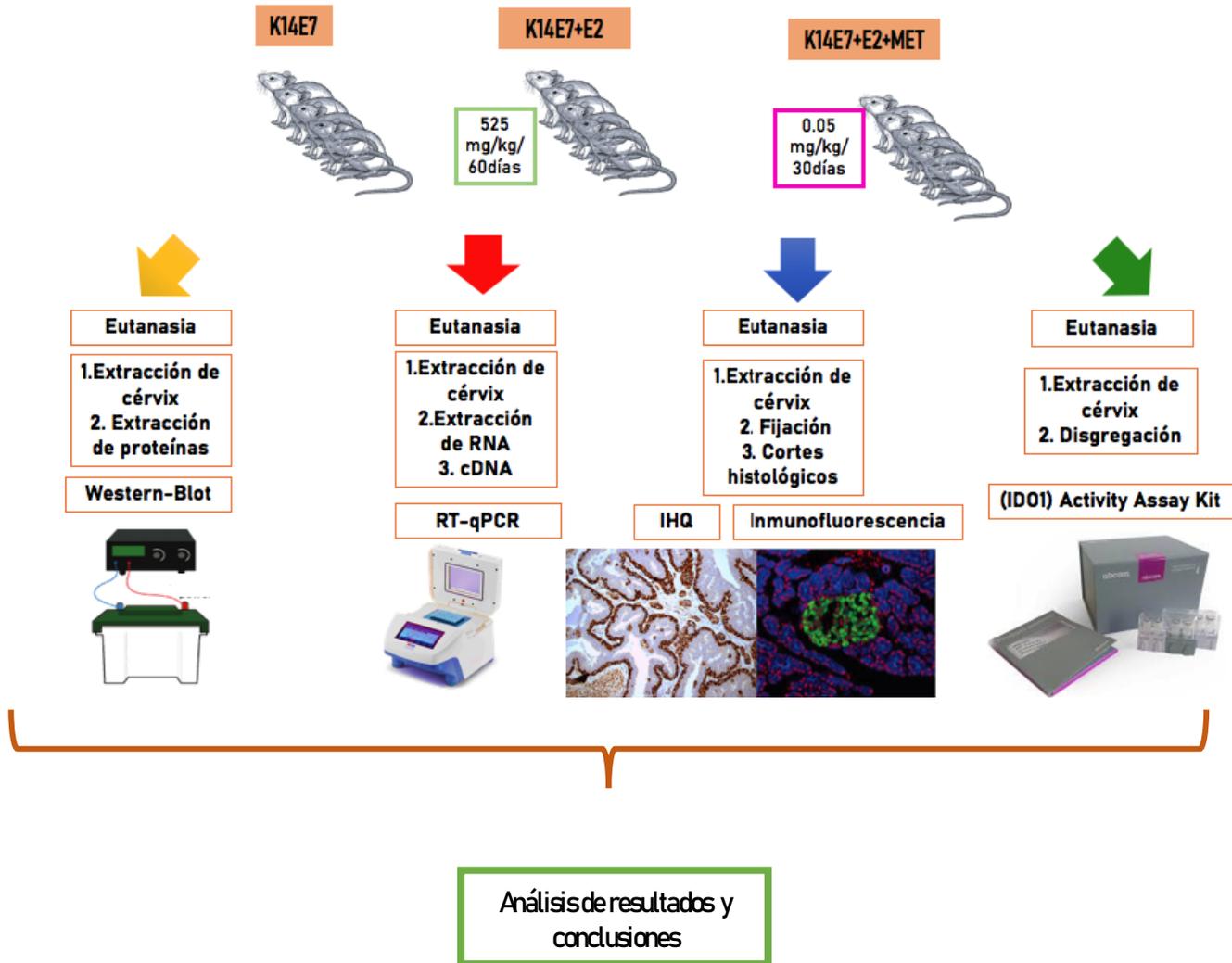
General

Determinar el efecto de la Metformina sobre la expresión y actividad de IDO1 en tejido cervical del modelo K14E7

Específicos

1. Medir la expresión de mensajeros y de proteína de IDO1 con y sin tratamiento de metformina.
2. Determinar la localización de IDO1 (estroma y/o epitelio) en tejido cervical con y sin tratamiento de metformina.
3. Determinar la actividad enzimática de IDO con y sin tratamiento de metformina.

VII. DIAGRAMA DE TRABAJO



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos utilizados:

Anti-IDO.

miDO48 (BioLegend)

D8W5E (Cell Signalling Technology)

Anti-Rabbitt (Santa Cruz)

Anti-IL4I1 (Sigma-Aldrich)

Anti-GAPDH (abcam)

Anti-Goat. (abcam)

Anti-Rabbitt-HRP (Santa Cruz)

GENERACIÓN LOS GRUPOS DE RATONES K14E7 CON TRATAMIENTO CON 17 β -ESTRADIOL Y METFORMINA

El modelo de ratón transgénico K14E7 se caracteriza por usar al promotor transcripcional de la citoqueratina 14 para expresar la oncoproteína E7 de VPH16 en las células basales del epitelio estratificado de piel y cérvix.

Como grupo problema se utilizó al K14E7 con tratamiento hormonal (E_2) y con tratamiento de metformina. Como un segundo grupo se utilizó al ratón K14E7 más tratamiento E_2 .

Como grupo control se usaron a los ratones K14E7. Para realizar los experimentos se utilizaron 3 grupos de ratones: 4 ratones K14E7 sin tratamiento, 4 ratones K14E7 con tratamiento hormonal (E_2), 4 ratones K14E7 con tratamiento hormonal (E_2) y con tratamiento de metformina.

El tratamiento con E_2 se inició al mes de edad y se mantuvo durante dos meses (3 meses de edad); donde cabe mencionar que se hizo la colocación de pellets de 17 β -estradiol en la zona dorsal de los murinos, dichos pellets liberan 0.05 mg de E_2 durante 2 meses; Y el tercer grupo, al igual que el anterior grupo, se utilizaron pellets que liberan 0.05 mg de E_2 durante 2 meses y justamente al segundo mes de vida

del K14E7 que lleva un mes de liberación de E₂ se le empezó a dar tratamiento con metformina 0.05 mg/kg/ durante 30 días vía cánula.

Todos los ratones fueron mantenidos y tratados de acuerdo a la “American Association of Laboratory Animal Care” (AALAC), y todos los experimentos y procedimientos fueron aprobados por el comité de la Unidad de Investigación para el Cuidado de Animales de Laboratorio (UPEAL-CINVESTAV- IPN, Mexico; NOM-062-ZOO-1999).

WESTERN BLOT

Se extrajo la proteína total del cervix del modelo murino K14E7 usando T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se cuantificaron los extractos proteínicos y se usaron 30 µg para la técnica SDS-PAGE. Donde previamente se corrió una electroforesis de las muestras (30 µg/µl) a 80 Volts (V) durante 20 min., y posteriormente se corrió a 120V. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada por una hora con leche al 5% en TBS-T; 1X (Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.5; NaCl 150 mmol/L, y Tween-20 0.5%). Inmediatamente fue incubada toda la noche con el anticuerpo anti-IDO (D8W5E; Cell Signaling Technology) (1:1000), al siguiente día se recuperó el anticuerpo primario, se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T y se realizó el incubado por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-mouse (Santa Cruz). Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS-T. Por último, a la membrana se le agregó luminol y se le marcó para posteriormente hacer el revelado por medio del C-DiGit Blot Scanner de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para medir la expresión de las proteínas se uso el software Image J, el cual mide el número de pixeles de las bandas en relación control de carga y a las muestras control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una t student y todos los valores $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos por medio del software GraphPad Prism 6.0

INMUNOHISTOQUÍMICA

La detección de proteínas en tejido cervical fue hecha usando el Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB Detection System (Bio SB) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Dónde, las muestras en laminillas (3 ratones por grupo) fueron desparafinadas a calor en una incubadora a 60 C° durante 2 horas y posteriormente fueron puestas en coplin que contenían xilol #1 durante 10 min. Y después en forma seriada en coplin que contenían xilol #2 durante 10 min; coplin que contenían Etanol absoluto durante 5 min; coplin que contenían etanol al 90% durante 5 min; se pusieron las laminillas en agua destilada y después en PBS 1X y posteriormente se hizo la recuperación de citratos durante 15 min (programa establecido) en una multi-olla express de la marca oster, a baja presión.

Posteriormente se dejaron enfriar las laminillas y se hizo la permeación por medio de PBS 1X + Tritón 1X durante 5 min en rotación ligera. Posteriormente se hicieron otros 3 lavados en PBS 1X de 2 min cada uno. Se quitó el excedente por las orillas y se hizo la delimitación con un lápiz graso y se hizo la incubación con la solución de bloque de peroxidasas endógenas durante 60 min en cámara húmeda. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X 2 min cada uno en rotación ligera. Se procedió a hacer el bloqueo general (ImmunoDNA Background Blocker-Bio SB). Se puso el anticuerpo anti-IDO 1:400 (Cell Signaling Technology) toda la noche en cámara fría. Al otro día se hicieron 3 lavados a las laminillas con PBS 1X de 2 min cada uno.

Se incubaron las laminillas con anti-rabbit-HRP 1:500 (abcam) durante 1 hora, 3 lavados con PBS 1X 2 min cada uno en rotación ligera y se preparó el cromógeno DAB (5 μl cromógeno + 500 μl de DAB buffer) y se observó al microscopio las laminillas individualmente para cortar la reacción una vez que se viró a una tonalidad

café. Se procedió a la contra-tinción con hematoxilina (2 segundos) se pasaron a coplin con agua de la llave para el cambio de pH y hasta que viró el color se pasó a PBS1X por 30 segundos y después a dos cambios de agua destilada.

Por último, posterior a 2 días de secado a T° ambiente de las laminillas, se hizo el montaje de las laminillas con el medio de montaje Fluoromount-G (invitrogen) y cubreobjetos.

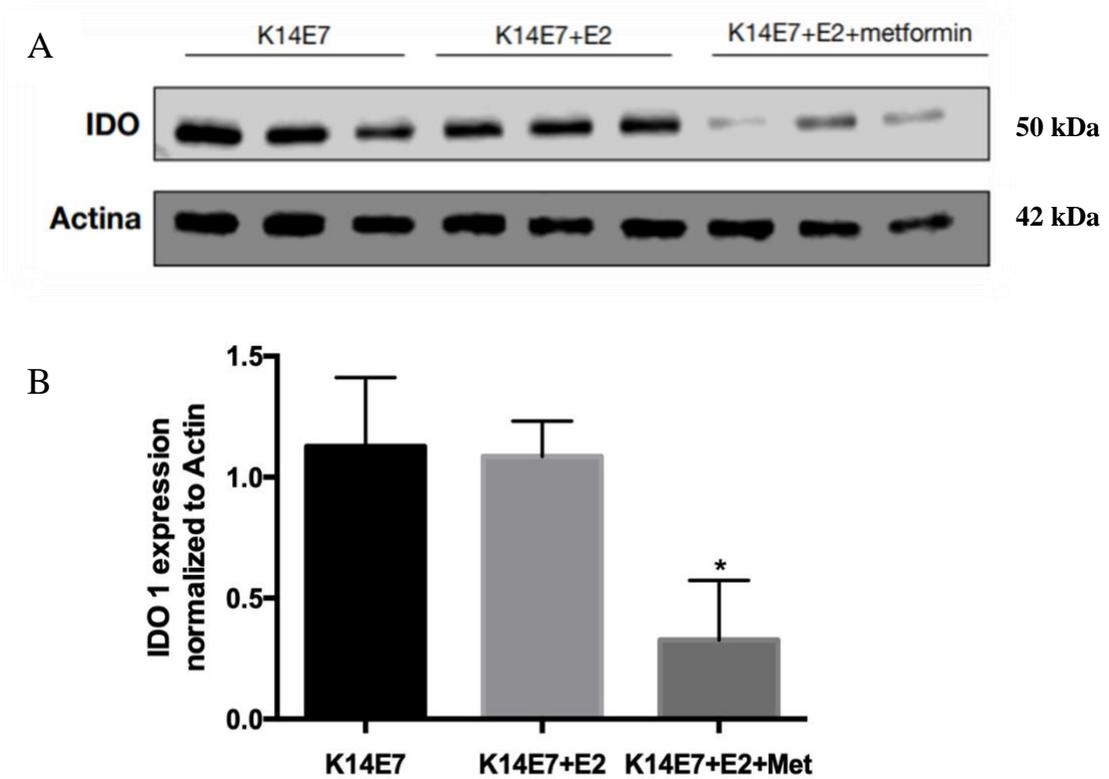
Las laminillas fueron examinadas con un microscopio Nikon Eclipse E600 y se tomaron fotos por medio de una cámara acoplada al microscopio, y posteriormente fueron importadas al software ImageJ para colocar la barra de escala.

IX. RESULTADOS

Disminución de la expresión de IDO1 por efecto de la metformina

Para determinar el efecto de la metformina en la expresión de IDO1, el modelo murino K14E7 fue tratado durante 30 días con 0.05 mg/kg/ de metformina. Como se muestra en la figura 3, la expresión de IDO1 disminuyó en el grupo K14E7+E₂+Met con respecto a los grupos que no recibieron el tratamiento con metformina. Debido a que el anticuerpo monoclonal miDO48 (BioLegend) que se usó en los resultados de la figura 3 fue descontinuado, se repitieron los experimentos de WB con un nuevo anticuerpo monoclonal (D8W5E, Cell Signalling Technology). Sorprendentemente obtuvimos resultados muy diferentes (Fig4.), partiendo de que se corrieron por WB más replicas biológicas del grupo 3, se pudo observar poca expresión de IDO1 en los ratones 1,2 y sobre todo del 5, lo cual podría ser de utilidad para ver un efecto inicial de la metformina sobre IDO1, sin embargo, en el grupo 2 no hubo homogeneidad en la expresión de IDO1, lo cual nos hizo cuestionarnos si los ratones habían tenido alguna perturbación a la hora de ponerles el pellet de estrógeno, a la hora de hacer la eutanasia, e incluso a la hora de hacer la extracción de proteínas, por todo lo anterior se optó por aumentar la N de los ratones K14E7 con y sin tratamiento de E₂, observando una mayor homogeneidad en la expresión

de IDO1, pero aun así no fue significativo debido a la distribución de las muestras con respecto a la normalización al gen constitutivo GAPDH (Fig. 5)



*Figura 3. Disminución de la expresión de IDO1 por efecto de la metformina. A) Expresión proteínica de IDO1 en ratones 14E7, K14E7+E2 y K14E7+E2+metformina mediante Western Blot. B) Expresión de IDO1 normalizada al gen constitutivo Actina. * P -value < 0.05*

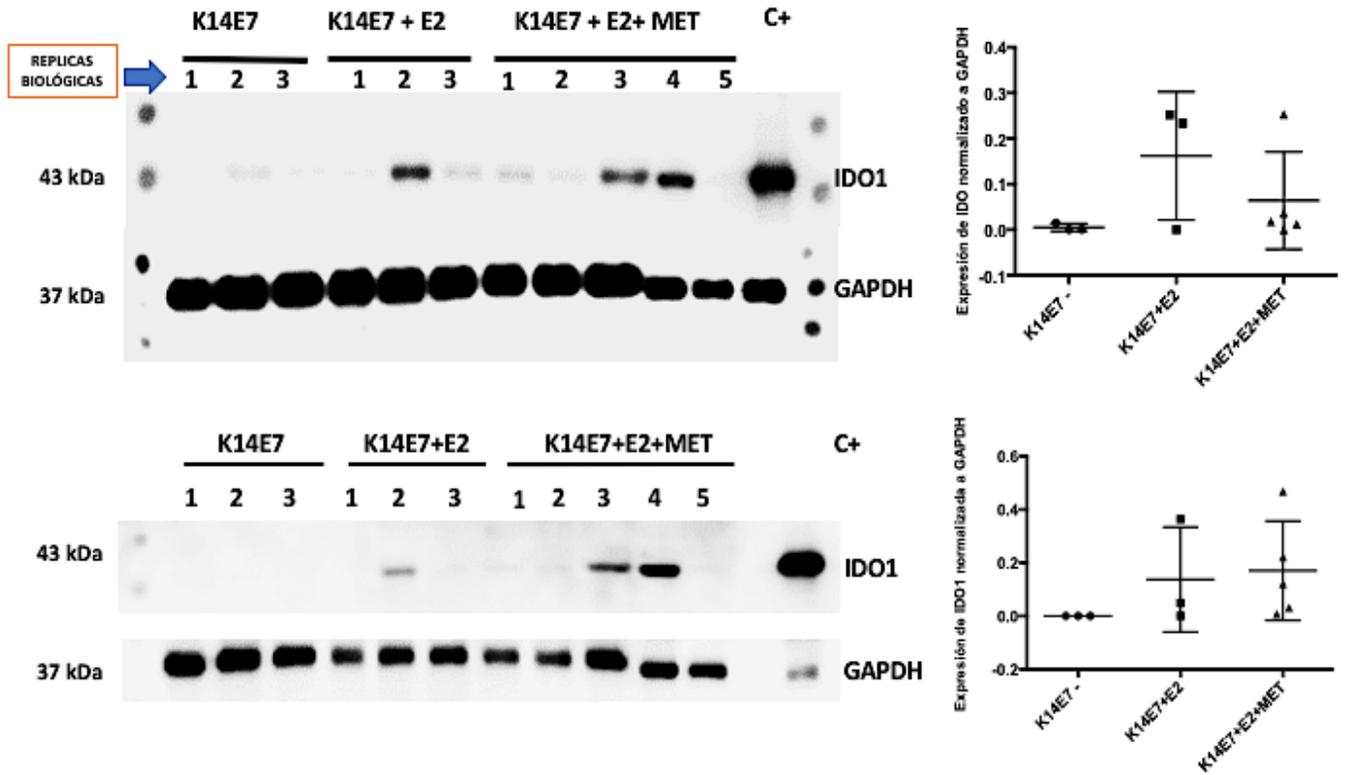


Figura 4. Aumento y disminución de la expresión de IDO1 por efecto del E2 y de la metformina. Panel de la izquierda; Expresión proteínica de IDO1 en ratones 14E7, K14E7+E2 y K14E7+E2+metformina mediante Western Blot. Panel de la derecha; Expresión de IDO1 normalizada al gen constitutivo GAPDH.* *P-value*<0.05

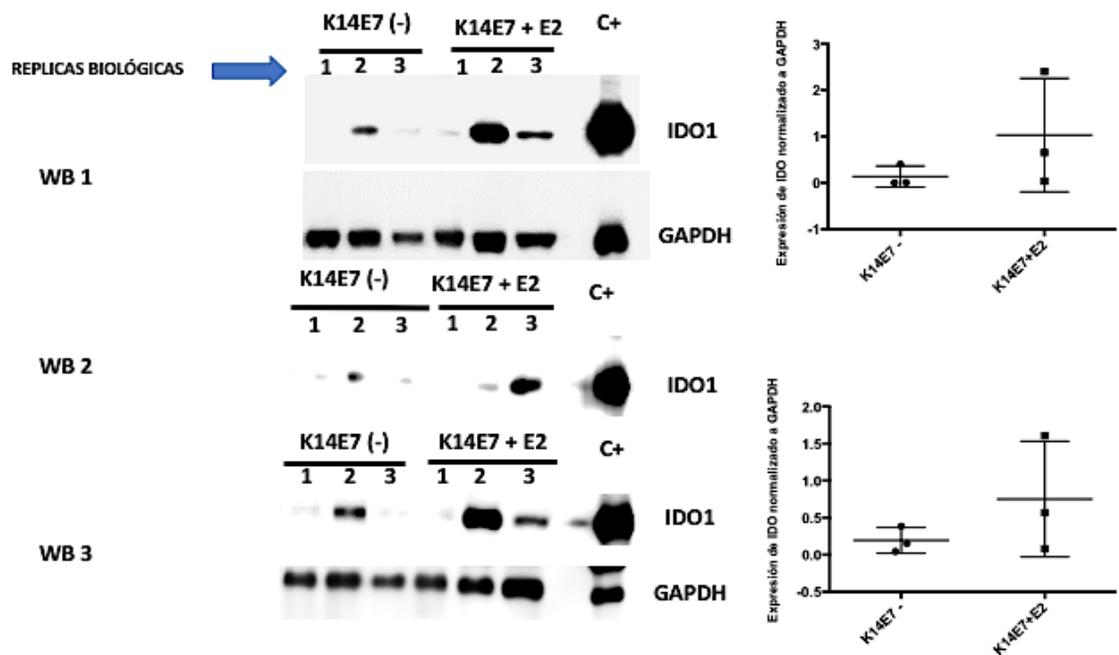


Figura 5. Aumento de la expresión de IDO1 por efecto del E2. Panel de la izquierda; Expresión proteínica de IDO1 en ratones 14E7, K14E7+E2 y K14E7+E2+metformina mediante Western Blot. Panel de la derecha; Expresión de IDO1 normalizada al gen constitutivo GAPDH.* P -value<0.05

Localización de la expresión de IDO1 en tejido cervical del K14E7

Se ha reportado que la expresión de IDO1 se detecta en el microambiente tumoral, células inmunes infiltradas, teniendo una localización en el estroma. Por medio de cortes histológicos a los tejidos de los tres grupos de K14E7, que previamente fueron fijados y embebidos en parafina (Anexo 2.), se pudo observar por medio de inmunohistoquímica (IHC) y con ayuda de un microscopio la colocalización de IDO1 en células de bazo, las cuales se usaron como control positivo, y las laminillas que no fueron incubadas con anticuerpo primario para IDO1, las cuales no muestran señal alguna, dando por hecho que la estandarización del anticuerpo y en sí de la IHC es la adecuada Fig. 6.

Además, para identificar la endocervix, exocervix y la zona de transformación, se hizo una inmunohistoquímica para MCM2, el cual es un marcador de proliferación, en específico de células basales Fig. 7. Donde observamos que además de su tinción en la capa basal, también hay señal en capas suprabasales, debiéndose posiblemente a los cambios morfológicos propios del tejido, es decir, la estratificación de dichas células aunado a que dicho ratón K14E7 fue tratado con E2. Y notablemente papilas características de la progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales.

Finalmente, se hizo la IHC para detectar IDO1 en tejido cervical de nuestro modelo K14E7, donde es de señalar que sólo se pudieron montar las primera IHC en el grupo 2 (K14E7+E2) Fig.8; dónde se observó que las células estromales tuvieron una mayor expresión, sin embargo, se vio a su vez una ligera colocación en células epiteliales, lo cual es inesperado.

Expresión a nivel de mRNA de IDO1 y de IL4I1 *in silico*.

Por medio de la herramienta GEPIA2, se hizo la comparación de la expresión de IDO1 en muestras tumorales y muestras normales de tejido cervical (Anexo 3) Donde la expresión de mRNA de IDO1 y de IL4I1 de muestras tumorales de Cáncer cervical (CECS) fueron significativamente mayores en comparación de los datos de muestras normales, teniendo en cuenta que la N de las muestras normales son 23.5 veces menores a los datos tumorales Fig.9. Además, se hicieron correlaciones entre los genes IDO1, IL4I1 y AhR, donde sólo se pudo observar una correlación negativa entre IDO1 e IL4I1. Por último, se utilizó la base de datos Proteína Atlas para ver la expresión a nivel de proteínas de los genes, así como su localización por medio de inmunohistoquímicas, y para corroborar si alguna de las tres proteínas sirve como un marcador pronóstico en CaCu. Donde no hubo diferencia significativa ni algo que resaltar (Anexo 3).

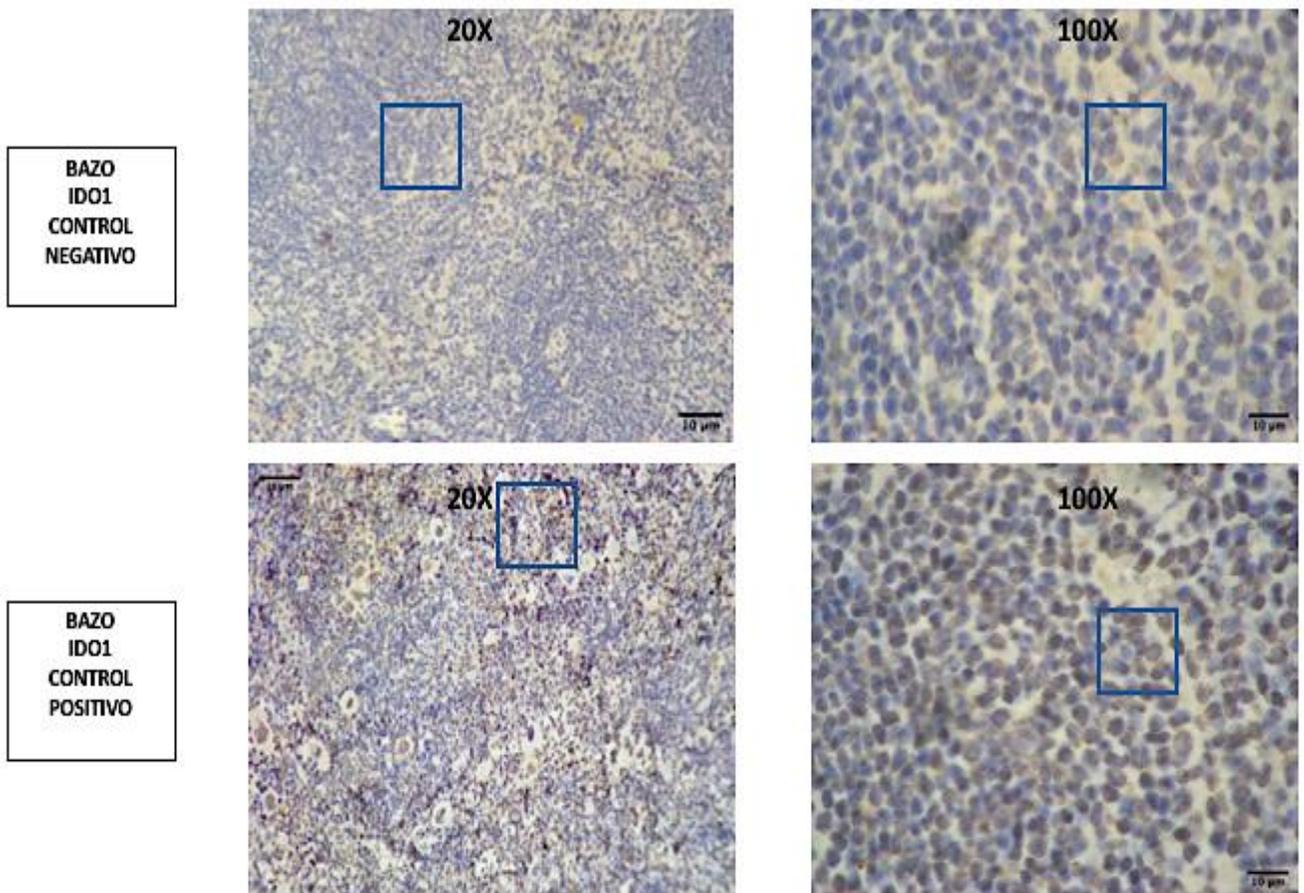


Figura 6. Expresión de IDO1 en tejido específico. Panel superior; Control negativo para la expresión proteínica de IDO1 en bazo de raton K14E7 mediante Inmunohistoquímica. Panel inferior; Expresión de IDO1 en control positivo bazo de raton K14E7.

K14E7 +
E2 6M
1:500
MCM2

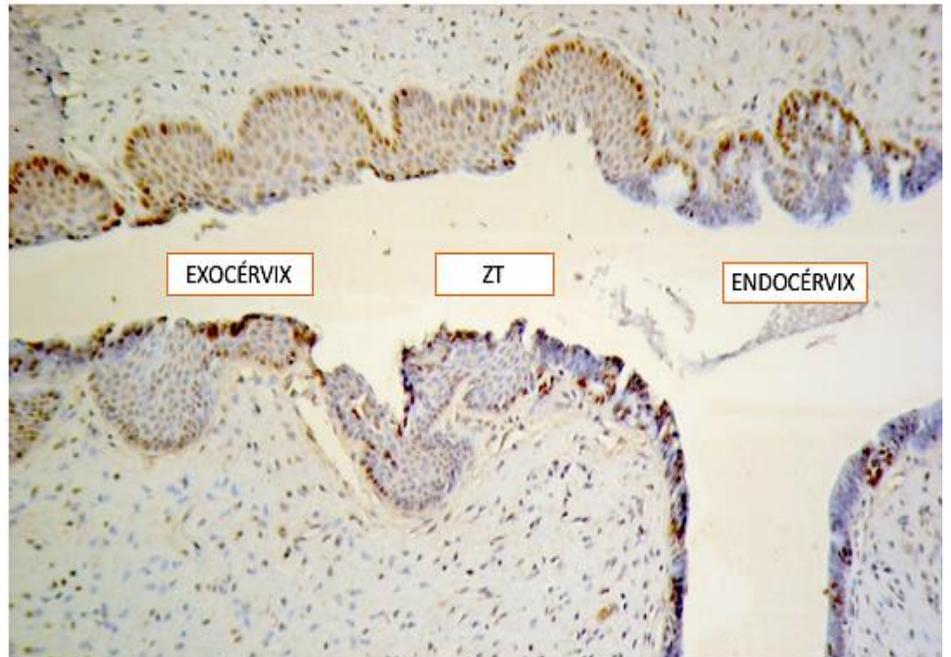
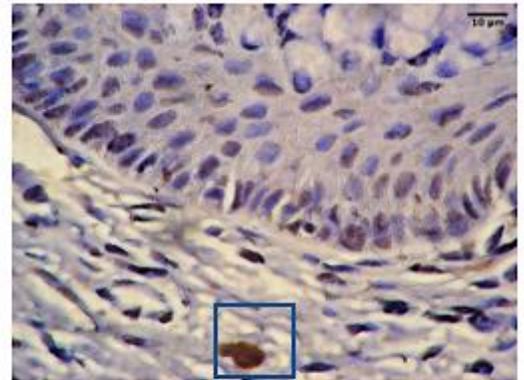
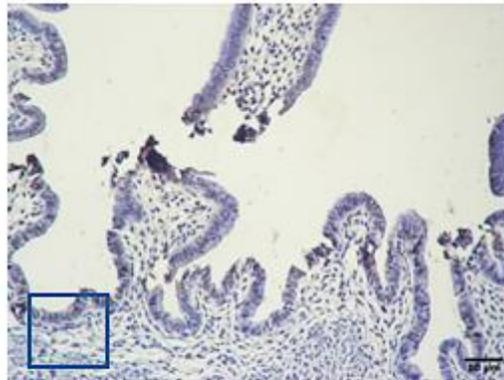


Figura 7. Expresión de MCM2 en tejido cervical del K14E7+E2. En los recuadros naranjas se hace referencia a las delimitaciones del tejido cervical murino que fue tratado con E2 y que por medio de IHC se colocaliza al marcador de proliferación celular MCM2 en diferentes sitios a lo largo del corte histológico.

K14E7 -
CÉRVIX
1:800



K14E7 +E2
CÉRVIX
IDO1
1:400

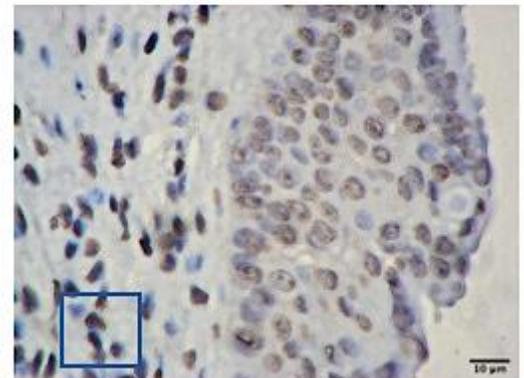
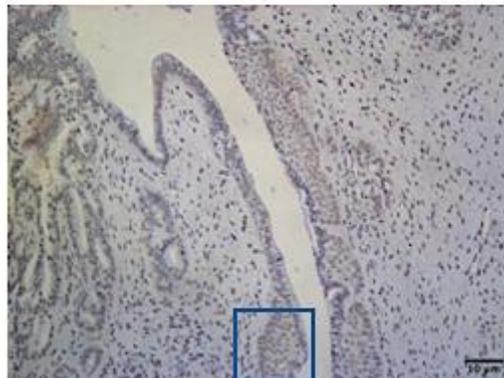


Figura 8. Colocalización de IDO1 en tejido cervical del K14E7+E2. Panel de superior; control negativo para la expresión de IDO1. Panel inferior; expresión de IDO1 mayormente a nivel de estroma, y con ligera expresión en células epiteliales a lo largo del corte histológico.

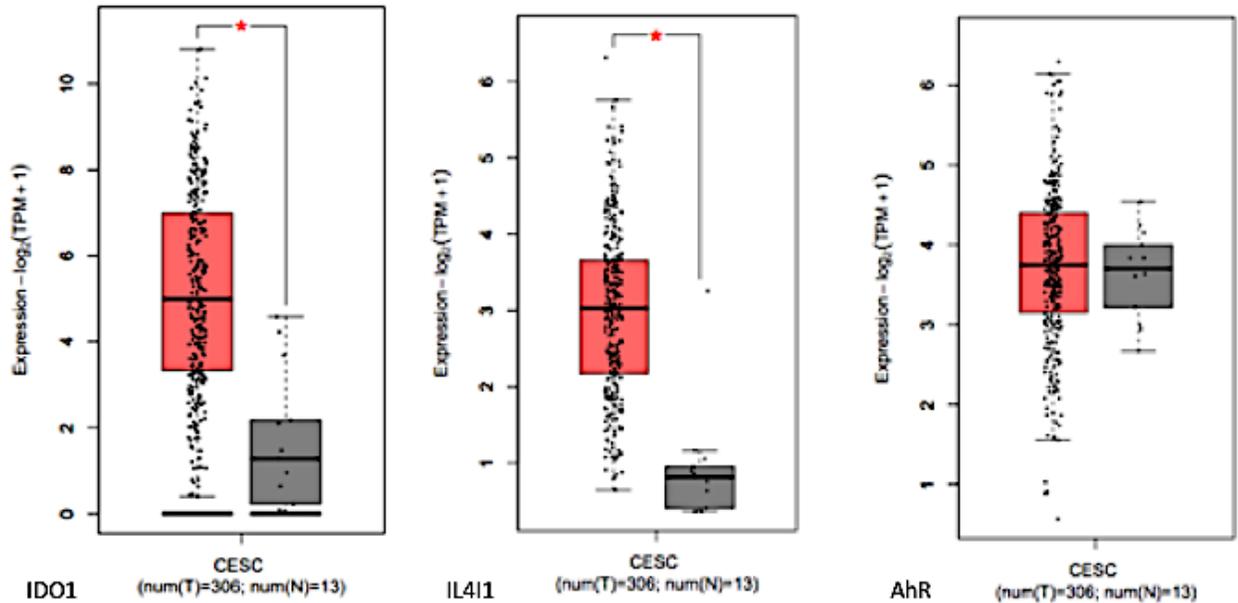


Figura 9. Expresión de mRNA de los genes IDO1, IL4I1 y AHR. Gráficas tipo Caja donde se muestra la expresión diferencial de los genes IDO1 e IL4I1 con un *P-value* < 0.01.

X. DISCUSIÓN

En este trabajo el objetivo principal fue ver si la metformina tenía un efecto sobre la enzima IDO1. Para esto, se realizó un Western Blot donde observamos una notable disminución de la expresión de IDO1 en el grupo de ratones que fueron tratados con estradiol y metformina, en comparación de los grupos K14E7 con y sin estradiol utilizando el anticuerpo monoclonal miDO48 de la compañía BioLegend (Fig3.). Sin embargo, Van de Velde et al., 2016 evaluaron la especificidad de anticuerpos para IDO1 murino; planteando que para que un anticuerpo pueda tener validez, es necesario que cumpla con ciertos criterios: 1) Que se evalúe en un tejido que exprese IDO1 o por inducción con IFN- γ 2) Se use un control negativo para la expresión de IDO1, como ratones con deleciones para IDO1, y 3) Que el anticuerpo

de una banda con un peso molecular de ~45 kDa. Así, la clona mIDO48 detectó en los extractos proteínicos provenientes de tejido cervical del modelo murino K14E7 por WB una banda con un peso molecular de 50 kDa. Además, después de haber sido ampliamente utilizada por varios laboratorios, fue descontinuada por la compañía BioLegend. Debido a lo anterior, se repitieron los experimentos con un nuevo anticuerpo, D8W5E de la compañía Cell Signalling Technology, donde se encontró que en tejido que expresa a IDO1 (placenta) se detectó una banda de ~43 kDa, por lo que se pudo corroborar que dicho anticuerpo cumplía 2 de los 3 criterios anteriormente descritos. Sorprendentemente, al hacer las replicas tecnicas con el nuevo anticuerpo se obtuvieron resultados diferentes en la expresión de IDO1 en el grupo tres (K14E7+E2+metf). En este grupo se ve una expresión de IDO1 menor en tres ratones, y 2 mostraron mayor expresión de IDO1 en comparación con los K14E7 con o sin E2, aunque no presentaron cambios significativos (Fig.4), aumentar la n de los ratones con y sin tratamiento de estradiol donde se concluyó que probablemente el estradiol aumenta la expresión de IDO1 (Fig.5), lo cual se compara con lo descrito por Fox et al., 1991 de que 17 β -estradiol regula positivamente la la expresión de IFN- γ . Además, Panchanathan et al., 2010 mostraron una retroalimentación positiva entre los IFNs (α or γ) y el Receptor de estrogénos alfa (E α). Esto podría relacionarse con el aumento de la expresión de IDO1 en los ratones K14E7+E2.

Por otro lado, es conocido que el uso prolongado de anticonceptivos tiene un fuerte impacto durante la infección con el VPH-AR, ya que favorece a que las lesiones intraepiteliales cervicales progresen, y den lugar a CaCu. Brake and Lambert, 2005 empleando tiempos más largos con el tratamiento con E2, concluyeron que se mantienen NICs 1 y 2 y además da lugar a la carcinogénesis en modelos murinos. En el presente trabajo pudimos corroborar que a pesar de los cortos tiempos de E2 en el modelo murino K14E7, hay una mayor expresión de IDO.

En conclusión, para continuar evaluando el efecto de la metformina sobre la enzima IDO1, es imperativo repetir experimentos, y agrandar la n de ratones de todos los grupos. Y por los resultados mostrados, el estradiol pareciera estar incidiendo en la

expresión de IDO, y además, la metformina pareciera regular positivamente a la expresión de IDO en dos de cinco ratones.

PERSPECTIVAS

Para ver la localización de IDO1 por inmunohistoquímicas e iniciar los experimentos de inmunofluorescencias para corroborar la localización de IDO1. Así como, medir la expresión de mensajeros de IDO1 en los tres grupos de ratones K14E7 por RT-qPCR, y medir la actividad enzimática de IDO1.

Por otro lado, para corroborar si los estrógenos están incidiendo en la expresión de IDO1, se podrían extirpar ovarios para ver si los estrógenos endógenos están influyendo en la expresión de IDO1, además, evaluar un grupo de ratones sin Ovarios y con tratamiento de E2 en conjunto con el tratamiento de la metformina.

Para evaluar la expresión de IDO1 de manera basal, se podría buscar una línea celular que la exprese y hacer un knock down para IDO, tratarlas con metformina, hacer lisado celular y extraer proteínas para evaluar la expresión de IDO por Western Blot. Las metodologías anteriormente mencionadas podrían abrir la pauta para iniciar la búsqueda del mecanismo molecular por el cual la metformina regula a IDO directa o indirectamente.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo LZ, Ferreira D, Cervenka I, Bryzgalova G, Dadvar S, Jannig PR, Pettersson-Klein AT, Lakshmikanth T, Sustarsic EG, Porsmyr PM, Correia JC, Izadi M, Martínez RV, Ueland PM, Middtun Ø, Gerhart-Hines Z, Brodin P, Pereira T, Berggren PO, and Ruas JL (2018). Kynurenic Acid and Gpr35 Regulate Adipose Tissue Energy Homeostasis and Inflammation. *Cell metabolism*, 27(2), 378–392.e5.

Arbeit JM (2003). Mouse models of cervical cancer. *Comp Med*. 53(3): 256-8

Badawy AB et al. (2017). Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *International Journal of Tryptophan Research*.

Bailey CJ, Day C (2004). Metformin: its botanical background. *Pract Diabetes Int*. 21(3):115–7.

Ball HJ, Sanchez PA, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermiin LS, and Hunt NH (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396(1), 203–213.

Balsitis S, Dick F, Dyson N, and Lambert PF (2006). Critical roles for non-pRb targets of human papillomavirus type 16 E7 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 66(19), 9393-400.

Blagih J, Coulombe F, Vincent EE et al (2015) The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity* 42:41–54.

Brake T, et al., (2003). Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of

minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res*, 63(23): p. 8173-80.

Bray F, et al., (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6): p. 394-424.

Bulut G, et al (2011). Beta-catenin accelerates human papilloma virus type-16 mediated cervical carcinogenesis in transgenic mice. *PLoS One*, 6(11): p. e27243.

Cervantes BL, Chai JN, Tianero MD, Di Luccia B, Ahern PP, Merriman J, Cortez VS, Caparon MG, Donia MS, Gilfillan S, Cella M, Gordon JI, Hsieh CS, and Colonna M. (2017). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4⁺CD8 α ⁺ T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6353), 806–810.

Cheong JE, and Sun L (2018). Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. *Trends in pharmacological sciences*, 39(3), 307–325.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, Volume 393, Issue 10167;169-182.

Córdova RS, Araujo JG, Rivera AE, Escalante GI, Durón SM, López HY, Hernández LH, López LD, López JA (2020). Differential Proliferation Effect of the Newly Synthesized Valine, Tyrosine and Tryptophan–Naphthoquinones in Immortal and Tumorigenic Cervical Cell Lines. *Molecules*, 25, 2058

Cortes EM, et al., (2013). Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue. *Virology*. 447(1-2): p. 155-65.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, and Kitchener HC (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*, 382(9895), 889–899.

Dai X, and Zhu BT (2010). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Tissue Distribution and Cellular Localization in Mice: Implications for Its Biological Functions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(1), 17–28.

Jaswir B, Igor E, Nishma C, Sarah J, Thackray JL, Krupa GE, Griffith GA, Christopher G. Mowat, Sandeep Handa, and Emma Lloyd Raven (2011). The Mechanism of Formation of *N*-Formylkynurenine by Heme Dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society* 133 (40), 16251-16257

De Araujo S PS, et al., (2008). Interaction between polymorphisms of the human leukocyte antigen and HPV-16 variants on the risk of invasive cervical cancer. *BMC cancer*. 8: p. 246.

De Fronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333:541–549.

De Schutter T, Andrei G, Topalis D, Duraffour S, Mitera T, Naesens, L, van den O, Matthys P, and Snoeck, R (2013). Cidofovir treatment improves the pathology caused by the growth of human papillomavirus-positive cervical carcinoma xenografts in athymic nude mice. *Cancer letters*, 329(2), 137–145.

Delvenne P, Herman L, Kholod N, Caberg JH, Herfs M, Boniver J, Jacobs N, and Hubert P (2007). Role of hormone cofactors in the human papillomavirus-induced carcinogenesis of the uterine cervix. *Mol Cell Endocrinol* 264(1-2), 1-5.

Denison MS, and Nagy SR (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, 309–334.

Diaz CJ, Hernandez PR, Lambert PF, and Gariglio P (2008). Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer. *Mol Cancer* 7, 3.

Doorbar J (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32,1,S7-15.

Doorbar J (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110(5), 525-41.

Fotopoulou C, Sehouli J, Pschowski R, et al., (2011). Systemic changes of tryptophan catabolites via the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in primary cervical cancer. *Anticancer Research*. 31(8):2629-2635.

Fox HS, Bond BL, Parslow TG (1991). Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *The Journal of Immunology*. 146 (12) 4362-4367

Fuertig R, Azzinnari D, Bergamini G, Cathomas F, Sigrist H, Seifritz E, Vavassori S, Luippold A, Hengerer B, Ceci A, and Pryce CR (2016). Mouse chronic social stress increases blood and brain kynurenine pathway activity and fear behaviour: Both effects are reversed by inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Brain, behavior, and immunity*, 54, 59–72.

Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB and Klein TE (2012). Vías de metformina: farmacocinética y farmacodinámica. *Farmacogenética y genómica*, 22 (11), 820–827.

González SJ, Martínez JC, Torres LA, Aguilar A, Jave LF, and Palomares P. (2014). Cervical cancer detection based on serum sample Raman spectroscopy. *Lasers in medical science*, 29(3), 979–985.

Goodwin PJ, Ligbel JA, Stambolic V (2009). Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol*: 27: 327 1-3.

Gutiérrez VC, Quintana FJ (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity Cell reviews*: 48, 1;19-33.

Hascitha J, Priya R, Jayavelu S, Dhandapani H, Selvaluxmy G, Sunder SS, and Rajkumar T (2016). Analysis of Kynurenine/Tryptophan ratio and expression of IDO1 and 2 mRNA in tumour tissue of cervical cancer patients. *Clinical biochemistry*, 49(12), 919–924.

Herber R, Liem A, Pitot H, and Lambert PF (1996). Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Journal of virology*, 70(3), 1873–1881.

Hou Y, Yin m, Sun F, Zhang T, et al. (2014). A metabolomics approach for predicting the response to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer patients. *Mol. BioSyst.* 10; 2126-2133.

Jabbar SF, et al., (2012). Cervical cancers require the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein even in the presence of the viral E6 oncoprotein. *Cancer Res*, 72(16): p. 4008-16.

Jabbar SF, et al., (2009). Persistence of high-grade cervical dysplasia and cervical cancer requires the continuous expression of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Cancer Res*, 2009. 69(10): p. 4407-14.

Jung KH, Lo Russo, P, Burris H, Gordon M, Bang YJ, Hellmann MD, Cervantes A, Ochoa de O M, Marabelle A, Hodi FS, Ahn MJ, Emens LA, Barlesi F, Hamid O, Calvo E, McDermott D, Soliman H, Rhee I, Lin R, Pourmohamad T, Davis SL (2019). Phase I Study of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Navoximod (GDC-0919) Administered with PD-L1 Inhibitor (Atezolizumab) in Advanced Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(11), 3220–3228.

Kovats S (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular immunology*, 294(2), 63–69.

Lacey JV, et al., (1998). Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8(12): p. 1079-85.

Lacey JV, et al., (2000). Use of hormone replacement therapy and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 77(1): p. 149-54.

Lauren MF, Merlo, EP, James BD, Grabler S, Metz R, Prendergast GC and Mandik NJ (2014). IDO2 Is a Critical Mediator of Autoantibody Production and Inflammatory Pathogenesis in a Mouse Model of Autoimmune Arthritis. *Immunol*. 192 (5) 2082-2090.

Low HY, Lee YC, Wang HL, Chen YI, Chien PJ, Li ST, Chang WW (2020). Reciprocal Regulation Between Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 and Notch1 Involved in Radiation Response of Cervical Cancer Stem Cells. *Cancers*; 12, 1547.

Maciag PC, et al., (2000). Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in

Brazilian women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research*, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 9(11): p. 1183-91.

Madeleine MM, et al., (2001). Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(3): p. 171-7.

Mazarico E and Gonzalez EB (2012). Prevalence of infection by different genotypes of human papillomavirus in women with cervical pathology. *Gynecologic oncology.*

Mittal D, Kassianos AJ, Tran LS, Bergot AS, Gosmann C, Hofmann J, Blumenthal A, Leggatt GR, and Frazer IH (2013). Indoleamine 2,3-dioxygenase activity contributes to local immune suppression in the skin expressing human papillomavirus oncoprotein e7. *The Journal of investigative dermatology*, 133(12), 2686–2694.

Moffett JR, Namboodiri MA (2003). Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology.* 81(4):247-265.

Murray IA, Patterson AD, and Perdew GH (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature reviews. Cancer*, 14(12), 801–814.

Narisawa SM, and Kiyono T (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus- induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98(10), 1505-11.

Nguyen LP, and Bradfield CA (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 102–116.

Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Grohmann U and Puccetti P (2008). SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *PNAS*. 0810278105.

Panchanathan R, Shen H, Zhang X, Ho S-m and Choubey D (2010). Mutually Positive Regulatory Feedback Loop between Interferons and Estrogen Receptor- α in Mice: Implications for Sex Bias in Autoimmunity. *PLoS ONE* 5(5): e10868.

Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, and Grohmann U (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology*, 12(9), 870–878.

Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ et al., (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 460:103–107.

Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA (2019). Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 18(5):379-401.

Pollak M (2017). The effects of metformin on gut microbiota and the immune system as research frontiers. *Diabetologia*. 60(9):1662–7.

Prendergast GC (2008). Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*, 27(28), 3889–3900.

Richmond A, and Su Y (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease models & mechanisms*, 1(2-3), 78–82.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert PF, and Arbeit JM (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 63(16), 4862-71.

Roman A, and Munger K (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445(1-2), 138-68.

Sadik A, Somarribas P LF, Öztürk S, Mohapatra SR, Panitz V, Secker PF, Pfänder P, Loth S, Salem H, Prentzell MT, Berdel B, Iskar M, Faessler ER, Kirst I, Kalter V, Foerster KI, Jäger E, Guevara CR, Sobeh M, Opitz CA (2020). IL411 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression. *Cell*, 182(5), 1252–1270.e34.

Scarpello JH, Howlett HC. Metformin therapy and clinical uses. *Diab Vasc Dis Res.* 2008; 5:157–167.

Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, and Franceschi S (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16086.

Stockinger B, Di Meglio, P, Gialitakis M, and Duarte JH (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annual review of immunology*, 32, 403–432.

Sun M, Ma N, He T, Johnston, LJ, and Ma X (2020). Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(10), 1760–1768.

Taylor MW, and Feng GS (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 5(11), 2516–2522.

Tomczynska M, Bijak M, Saluk JM (2016). Metformin - The Drug for the Treatment of Autoimmune Diseases; A New Use of a Known Anti-Diabetic Drug. *Curr Top Med Chem*. 16(19):2223–30.

Tuong ZK, Noske K, Kuo P, Bashaw AA, Teohl SM, Frazer IH (2017). Murine HPV16 E7-expressing transgenic skin effectively emulates the cellular and molecular features of human high-grade squamous intraepithelial lesions. *Papillomavirus Research*. 5; 6-20.

WHO. Cervical cancer. World Health Organization: Geneva. 2018; Available from: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>.

Wise TM, and Wells SI (2008). Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* 13, 1003-17.

Woodworth CD (2002). HPV innate immunity. *Front Biosci* 7, d2058-71.

Yang YX (2009). Do diabetes drugs modify the risk of pancreatic cancer?. *Gastroenterology*; 137; 412-15.

Zhai Y, Kuick R, Nan B, Ota I, Weiss SJ, Trimble CL, Fearon ER, and Cho KR (2007). Gene expression analysis of preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res* 67(21), 10163-72.

XII.ANEXOS

Anexo 1. MACERACIÓN DE TEJIDO MURINO

Una vez extraído el tejido:

Se maceró en mortero previamente esterilizado y forrado con aluminio en presencia de nitrógeno líquido, hasta conseguir un polvito muy fino.

Se colocó el reactivo de extracción de proteínas de tejido TPER® el cual ya contiene inhibidores de proteasas, pero además se le adicionó con inhibidores de fosfatasa (el cuál va protegido de la luz y a -20°C).

Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 10 min y se procedió a hacer las alícuotas.

Anexo 2. FIJACIÓN DE TEJIDOS

Una vez que se extrae el tejido cervical del modelo murino se coloca en un tubo falcon en paraformaldehído al 4%. (se pueden quedar hasta 5 días antes de incluir en parafina).

INCLUSIÓN DE TEJIDO EN PARAFINA

-Se retiran los tejidos del paraformaldehído y se lavan en PBS 1X.

-Se colocan en los cassettes previamente etiquetados con lápiz.

Deshidratación seriada

-Etanol al 70% 1 hora (En agitación)

-Etanol al 80% 1 hora (En agitación)

-Etanol al 90% #1 (1 hora en agitación) / Etanol 90#2 (1 hora en agitación)

-Etanol al absoluto #1 (1 hora en agitación) / Etanol absoluto #2(1 hora en agitación)

-----*Aquí se podría pausar el procedimiento*----- (Almacenar a 4°C)

-Etanol absoluto/ xilol 1:1 (aprox. 500ml) 1 hora en agitación.

-Xilol #1 (1 hora en agitación).

-Xilol #2 (1 hora en agitación).

-Parafina #1 30 min (en mini incubadora a C°)

-Parafina #2 30 min

-Parafina #3 30 min

-Montaje; se toma cuidadosamente el tejido con una pinza del estuche de disección y se coloca en el molde metálico, de forma que quede centrado, de manera rápida se agrega parafina nueva que se encuentra a 50 C° antes de que solidifique y se coloca el cassette previamente rotulado. Se deja reposar toda la noche antes de sacar el bloque.

Los cortes que se realizaron de los bloques fueron de 5 µm de espesor en laminillas electrocargadas.

Anexo 3. Expresión diferencial de genes de interés

Por medio de GEPIA2 se muestran gráficos que contienen información sobre la expresión a nivel de mRNA de nuestros genes de interés; IDO1, IL4I1, AhR

Expresión DIY

Se utilizó para perfilar la expresión tisular de los genes en cáncer cervicouterino (CECS) mediante un diagrama de caja.



--- Help ---

Dataset (Cancer name)

CESSC

lLog₂FCI Cutoff: 1 q-value Cutoff: 0.01

Differential Methods

ANOVA
 LIMMA
 Top 10

These two methods are used for Tumor vs Paired Normal samples.
This method are used for Tumor vs All Normal Samples.

Gene/Isoform

Gene
 Isoform

Chromosomal Distribution

Over-expressed

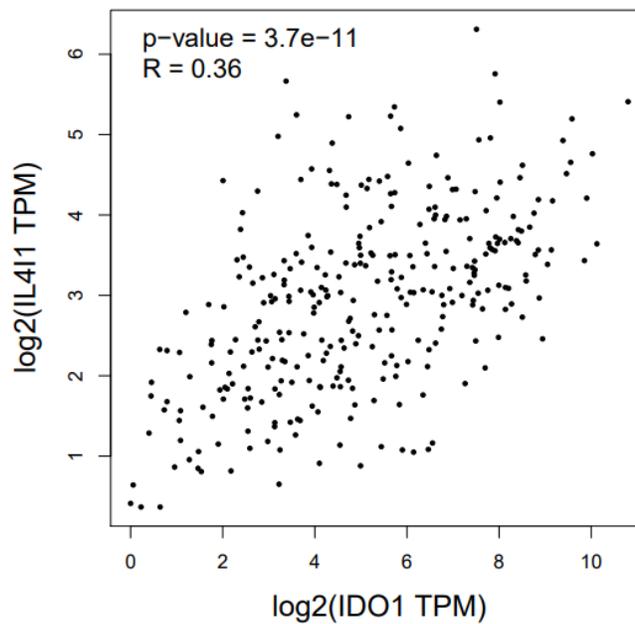
Default color: Over-Red; Under-Green

List Plot

Show 10 entries Search: IDO1 Download

Gene Symbol	Gene ID	Median (Tumor)	Median (Normal)	Log2(Fold Change)	adjp
IDO1	ENSG00000131203.12	30.800	1.420	3.716	3.61e-6

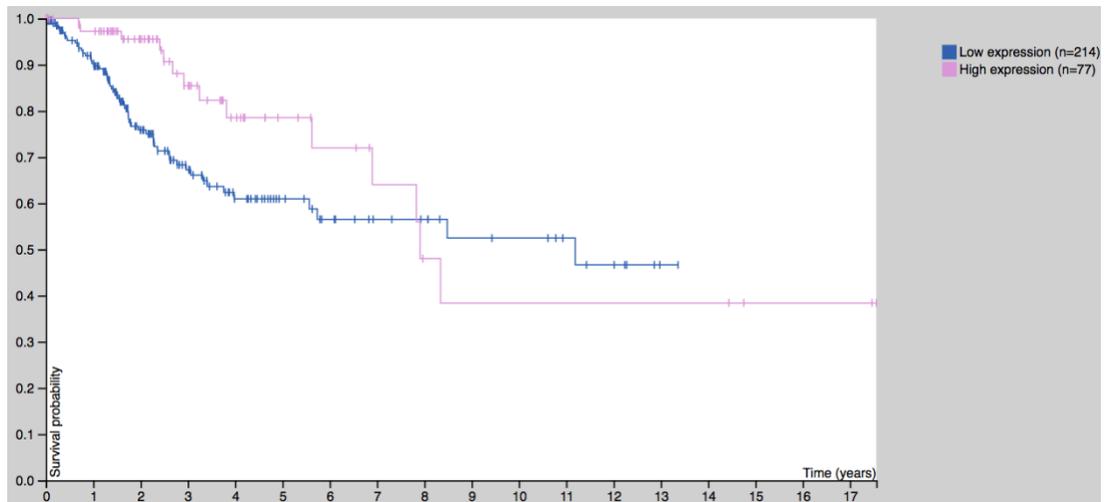
Análisis de correlación (GEPIA2)



“Correlación negativa entre los genes IL411 e IDO1 en ectocervix”

Expresión diferencial de IDO1 en CaCu en la base de datos Protein Atlas

THE HUMAN PROTEIN ATLAS



“La expresión a nivel de proteína de IDO1 no sirve como pronóstico en CaCu”