



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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“Expresión de IL-2 en una línea celular libre de papiloma y con los oncogenes
de E6 y E7 de VPH-16”**

T E S I S

Que presenta

ESTEFANIA HERNANDEZ DOMINGUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Nicolas Villegas Sepúlveda

Ciudad de México.

AGOSTO, 2023

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por haberme otorgado la beca con numero de registro 1103788.

Al departamento de Biomedicina Molecular, en donde se realizó esta tesis.

Agradecimientos:

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por brindarme la valiosa oportunidad de formar parte de su distinguido grupo de investigación y por su orientación acertada que ha enriquecido mi desarrollo académico.

Asimismo, quiero reconocer a los asesores de esta tesis, la Dra. Leticia Cedillo Barrón y el Dr. Vianney Ortiz Navarrete, cuya dirección experta y consejos han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

Un reconocimiento especial al Biól. Raúl Bonilla y al Dr. Héctor Romero por su inestimable apoyo técnico y contribución durante la ejecución del trabajo experimental.

No puedo dejar de mencionar a Maru, cuyo amplio respaldo y constante apoyo han sido invaluable en todo momento.

También quiero agradecer a mi compañera Alejandra Parra Martínez por su apoyo y disposición.

Mi gratitud se extiende a mi familia, en particular a mi madre y hermanas: Carmita, Selena y Stheysy, por su amor incondicional y comprensión. Un agradecimiento especial a mi pareja, Hugo Arturo, quien ha sido un pilar fundamental y no ha dejado que renuncie a mis metas.

Este camino ha estado marcado por la colaboración y el apoyo de todas estas personas, y no podría haber alcanzado este logro sin su contribución desinteresada. Su aliento y guía han sido esenciales en mi trayectoria y estoy profundamente agradecido por todo lo que han hecho por mí.

Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Lista de abreviaturas	8
Resumen.....	10
Introducción	12
Epidemiología.....	13
E6.....	16
E7.....	17
Infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual.....	19
Sistema inmune y Cancer	21
IL-2.....	22
Antecedentes	26
Justificación:	28
Hipótesis.....	28
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares	29
Estrategia experimental	30
Materiales y Métodos	32

Extracción de RNA	32
Tratamiento con DNasa free.....	33
Transcripción inversa.....	33
Amplificación por PCR punto final.....	34
ELISA de il-2 en sobrenadantes de cultivos de CaCu.....	35
Extracción de proteína y Western blot.....	36
Análisis de citometría de flujo (facs)	37
Resultados	38
Discusión	46
Conclusión	51
Perspectivas.....	52
Bibliografía	53

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la clasificación de los grupos carcinógeno, tipos de VPH.	13
Figura 2. Infección del VPH, la infección inicia en células de la lámina basal.	15
Figura 3. Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 en el sistema inmunológico y la progresión del Cancer.	22
Figura 4. RT-PCR de tres líneas celulares de Cancer cervicouterino	27
Figura 5. Estrategia experimental representada esquemáticamente	31
Figura 6. Análisis de porcentaje de células fluorescentes	38
Figura 7. Expresión de los RNAs mensajeros bicistronicos de E6 y E7	39
Figura 8. RT-PCR de las células para corroborar antecedentes a diferente tiempo	40
Figura 9. Expresión de la proteína de IL-2 en las celulas transfectadas y los controles	41
Figura 10. Secreción de IL-2 en celulas C-33A, transfectadas y CaSki	42
Figura 11. Expresión del mRNA de CD25 en celulas transfectadas y CaSki	43
Figura 12. Expresión de CD122 en celulas transfectadas y CaSki	44
Figura 13. Expresión de la proteína CD132, en las celulas transfectadas y CaSki	45

Índice de tablas

Tabla 1. Concentración de TNF- α e IL-6 en sobrenadante de las líneas celulares: _____ 27

Tabla 2. Secuencias utilizadas para los ensayos de PCR. _____ 35

Lista de abreviaturas

aa - aminoácidos

cDNA - DNA complementario

CD122 - Cadena Beta del IL-2R

CD132 - Cadena gama del IL-2R

CD25 - Cadena Alfa del IL-2R

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Deoxinucleótidos de trifosfato

GFP - Proteína verde fluorescente

Hrs. - Horas

IL-2 - Interleucina 2

IL-2R - Receptor de Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

kb - kilo bases

KDa - Kilo Daltones

mRNA - RNA mensajero

Min - minutos

nm - nanómetros

NIC - Neoplasia Intraepitelial Cervical

ORF - Marco de lectura abierto

PAGE - Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Pb - pares de bases

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

Rb - Retinoblastoma

RNA - Ácido ribonucleótido

RPM - Revoluciones por minuto

RT - Transcripción reversa

s - segundos

SDS - Dodecil sulfato de sodio

SB - Sleeping Beauty

UV - luz ultravioleta

VPH - Virus de papiloma humano

Resumen

En este proyecto se analizó el efecto de los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 en la expresión de IL-2, una citocina implicada en la progresión de diversos tipos de cáncer, como el de pulmón, melanoma, mama y cuello uterino (Chen et al., 2020; Rangel-Corona et al., 2010). A pesar de la importancia conocida de las citocinas en el cáncer cervical positivo para VPH-18, este estudio busca llenar un vacío de conocimiento en cuse intento tener más información del efecto de los oncogenes de VPH-16 en la expresión de IL-2 en células de cáncer cervical. VPH-16 es el tipo viral más prevalente en este tipo de cáncer, utilizando como modelo célula de cáncer cervical VPH-negativas. Para ello, se empleó la línea celular C-33A, que carece de VPH, pero expresa IL-2.

Mediante la transfección de células C-33A con oncogenes E6/E7 de VPH-16, usando los sistemas pEGFP-N1 (N1) y sleeping beauty (SB), se investigó el efecto de estos oncogenes en la expresión de IL-2 a través de diversas técnicas, incluyendo RT-PCR, Western blot y ELISA, analizando su impacto en el mRNA, la proteína y el sobrenadante celular.

Los resultados revelaron que los oncogenes E6/E7 ejercieron un efecto negativo en los niveles de transcritos de IL-2 y CD25, mientras que se observó un aumento en CD122. Además, se detectó una disminución en las concentraciones de las proteínas IL-2, CD25 y CD122. Es relevante destacar que IL-2 mostró un aumento en el proceso de secreción ("shedding") en presencia de los oncogenes. Es necesario resaltar que futuras investigaciones deberán esclarecer si CD25 y CD122 son procesadas y secretadas en presencia de los oncogenes. En síntesis, este estudio proporciona una visión más completa de cómo los oncogenes del VPH-16 influyen en la regulación de IL-2 y sus interacciones, lo cual contribuye al entendimiento de la progresión del cáncer cervical.

Abstract

The aim of this project was to investigate the effect of the E6/E7 HPV-16 oncogenes over IL-2 expression using tumor derived cell lines. IL-2 is a cytokine implicated in the progression of diverse cancers, including lung, melanoma, breast, and cervical cancer (Chen et al., 2020; Rangel-Corona et al., 2010). Despite of the recognized role of this cytokine in HPV-18 positive cervical cancer cells; this study also aimed to bridge a gap in knowledge concerning IL-2 expression and secretion in HPV-negative and HPV-16 positive cervical cancer cells, the predominant virus in this cancer type. The C-33A cell line, lacking HPV but expressing IL-2, was used for this purpose.

Through transfection of C-33A cells with E6/E7 HPV-16 oncogenes using the pEGFP-N1 (N1) and the sleeping beauty (SB) systems, the impact of these oncogenes on IL-2 expression was explored via diverse strategies, encompassing RT-PCR, Western blot, and ELISA assays. These methods were used to assess the levels of IL-2 protein and mRNA, and IL-2 secretion was determined by using cell culture supernatants.

Our findings showed that oncogenes E6/E7 elicited a detrimental effect on IL-2 and CD25 transcript levels, while CD122 level was increased. Furthermore, reduced levels of IL-2, CD25, and CD122 proteins were also noted, in presence of E6/E7. Notably, IL-2 exhibited enhanced "shedding" in the presence of the oncogenes. It is pertinent to emphasize that future investigations should elucidate whether CD25 and CD122 undergo processing and secretion in the presence of the VPH-16 oncogenes. In sum, this study offers a more holistic perspective on how HPV-16 oncogenes influence the expression of IL-, and it intends to contribute to the comprehension of cervical cancer progression.

Introducción

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenecen a la familia de los *Papillomaviridae*. Son virus antiguos y exitosos que han evolucionado junto con su huésped para replicarse. Una de sus características, es su especificidad por los tejidos, lo que significa que pueden provocar enfermedades sintomáticas y/o asintomáticas (McBride, 2021; van Doorslaer, 2013). Los VPH son diversos, ya que sus secuencias de DNA y proteínas virales varían como mecanismo de adaptación en la interacción entre el virus y el huésped (McBride, 2021).

Los VPH son virus pequeños, con un diámetro de 55 nm. No poseen envoltura y contienen genomas de DNA de doble cadena, con una longitud aproximada de 8 kb. El genoma se encuentra en forma de superhélice con histoproteínas derivadas de la célula huésped (Kono & Laimins, 2021). El genoma se divide en regiones que se expresan en diferentes etapas del ciclo de vida del VPH: la región del gen que codifica las proteínas virales tempranas, llamadas proteínas E, ocupa aproximadamente el 50% del genoma, y la región tardía. Las proteínas virales estructurales tardías, llamadas proteínas L; y una región larga de control transcripcional (LCR) que comprende aproximadamente el 10% del genoma completo (Kaynarcalidan & Oğuzoğlu, 2021a). Se han identificado los genes E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, L1 y L2 en el genoma del virus (della Fera et al., 2021; Kono & Laimins, 2021).

Hasta el año 2021, se han secuenciado y caracterizado los genomas de 665 tipos de VPH (Papillomavirus Episteme). Estos se dividen en cinco géneros: Alfa, Beta, Gamma, Mu y Nu. Los géneros se clasifican según la secuencia de nucleótidos del gen L1. Cada tipo de VPH tiene una similitud de secuencia de nucleótidos inferior al 90% en comparación con cualquier VPH previamente identificado. Las diferencias entre el 2% y el 10% de homología definen un tipo viral, mientras que menos del 2% son variantes de un mismo tipo viral (de Villiers et al., 2004). Cada uno de estos géneros infecta tejidos epiteliales estratificados en diferentes ubicaciones del cuerpo (McBride, 2021).

Los alfapapilomavirus tienen una asociación clínica diversa y pueden provocar verrugas comunes en el epitelio cutáneo, así como lesiones anogenitales en las mucosas (Cubie,

2013; Dunne & Markowitz, 2006a). Los VPH se dividen en tipos de bajo y alto riesgo oncogénico. Los tipos de bajo riesgo causan lesiones benignas, mientras que los tipos de alto riesgo son oncogénicos y son agentes causales de cambios premalignos y malignos (de Villiers, 2013). De estos últimos, los isotipos que se detectan con mayor frecuencia en tumores encontramos a VPH-16, VPH-18, VPH-33 y VPH-35. Las infecciones persistentes por VPH de alto riesgo (VPH-AR) son responsables del riesgo de cáncer en aproximadamente el 5% de todos los cánceres humanos, incluidos casi todos los cánceres de cuello uterino (CaCu), cánceres anogenitales y más del 60% de los cánceres orofaríngeos (Kono & Laimins, 2021).

Epidemiología

El IARC (International Agency for Research on Cancer) reportó que el 96% de los casos de CaCu están relacionados con uno de los 13 tipos de VPH de los grupos 1 y 2A (Arbyn et al., 2014; Chargari et al., 2022; Clifford et al., 2003). Los tipos de VPH-AR más frecuentes en CaCu; son el VPH 16, el cual induce más del 50 % de los casos, mientras que los VPH 16 y 18 provocan juntos más del 70 % de los casos en todo el mundo (Cancer, 2012; Sung et al., 2021).

Species	Types							
α5	26	51	69	82				
α6	30	53	56	66				
α7	18	39	45	59	68	70	85	97
α9	16	31	33	35	52	58	67	
α11	34	73						

Adapted from IARC [1].

Group 1 carcinogens.

Group 2A carcinogens.

Group 2B carcinogens.

Phylogenetic analogy with carcinogenic types.

Figura 1. Representación esquemática de la clasificación de los grupos carcinógeno, tipos de VPH.

(Tomado de Arbyn et al., 2014).

CaCu es uno de los tipos de cáncer más común que amenaza la salud de las mujeres, ocupa el cuarto lugar en frecuencia de diagnóstico y causa de muerte en mujeres de todo el mundo, con un estimado de 604 000 casos nuevos solo en el año 2020. Las tasas de incidencia son desproporcionadamente altas en países en vías de desarrollo. Además, es la principal causa de muerte en 36 países, con 311000 muertes por CaCu, al año principalmente en el continente africano, (Barillari et al., 2021; Sung et al., 2021). En población mexicana se ha reportado que los genotipos de VPH-16, 18, 31, 45 y 58 son los de mayor prevalencia en muestras de cérvix; siendo el tipo viral VPH-16 el más frecuente en todos los grupos (Salcedo et al., 2014). Los tipos más frecuentes de VPH detectados en cáncer cervical se observan en la Figura 2.

La infección viral ocurre cuando se presentan micro lesiones en el tejido, las cuales pueden ser provocadas durante el acto sexual. En esta situación, las partículas virales penetran en las células de la lámina basal, las cuales son indiferenciadas a través de la interacción del virus con el proteoglicano heparán sulfato y correceptoras como integrinas (esquemático en **Figura 2**). La integrina $\alpha 6\beta 4$ se ha identificado como una de las principales integrinas con las que se une el VPH-16 para ingresar a las células.

Las células se dividen y diferencian, lo que resulta en que las capas superiores hereden el material genético viral. En las primeras etapas, este material genético viral se encuentra en forma episomal y expresa proteínas tempranas que son importantes para el secuestro de la maquinaria celular y la producción de partículas virales nuevas.

El virus se replica persistentemente en células en división y codifica en promedio ocho marcos de lectura abiertos (ORF) que se expresan a partir de mRNAs policistrónicas, que son transcritos de la misma cadena de DNA y en la misma dirección. La transcripción se regula ampliamente mediante el procesamiento de RNA y la elección del sitio específico de poliadenilación (Kajitani & Schwartz, 2022; Schwartz, 2013). Los primeros productos génicos se les denominan genes tempranos, los cuales son E6, E7, E1, E2, E4 y E5. E1 participa en la

replicación viral extra cromosómica y el gen E2 está relacionado con la regulación de la transcripción.

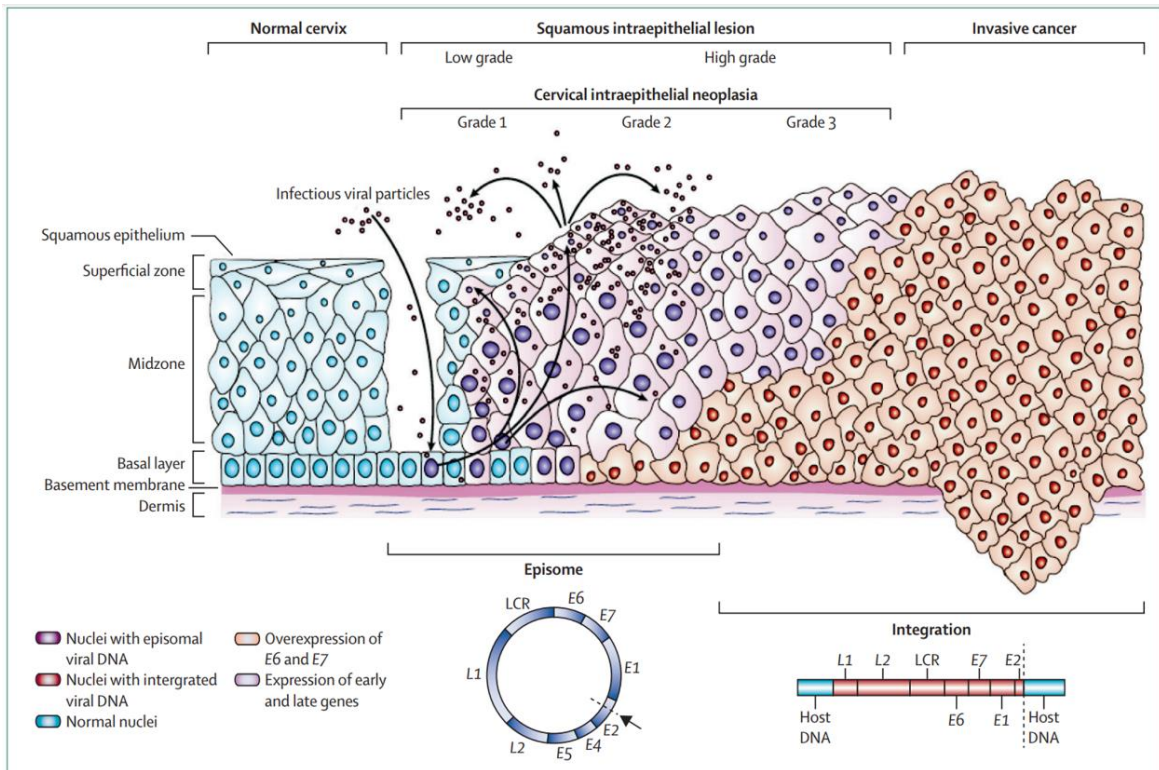


Figura 2. Infección del VPH, la infección inicia en células de la lámina basal.

Las células se dividen y la población infectada crece hacia los estratos superiores del epitelio, donde se producen los viriones que al ser liberados por la descamación celular inician un nuevo ciclo de infección (Tomado de Cohen et al., 2019)

Las proteínas E6 y E7 son reguladoras de la progresión del ciclo celular tanto en células diferenciadas como indiferenciadas, y actúan como oncoproteínas en el desarrollo del cáncer (Hussain et al., 2021). La región de genes de expresión tardía (L) contiene a los genes L1 y L2, que codifican para las proteínas estructurales de la cápside del virus y son expresadas en células diferenciadas. La tercera región es la no codificante denominada región larga de control (LCR), esta región separa las dos regiones antes mencionadas. Posee un palíndromo al cual se une la proteína E2 que funciona como regulador transcripcional involucrado en la expresión viral.

En lesiones preneoplásicas el DNA del VPH se encuentra en forma episomal, en donde su replicación es independiente de la replicación celular. A diferencia de lesiones malignas o líneas celulares derivadas del Cancer cervical, como el CaSki, SiHa y Hela en las cuales está integrado el genoma viral, el genoma viral se integra de la región temprana, perdiéndose los genes E1 a E5, la pérdida de E2, el cual actúa como helicasa y también como represor de la transcripción de los genes E6 y E7, desencadena un incremento en la transcripción de ambos.

En CaSki y SiHa se conoce que poseen 3 diferentes RNAs, los cuales contienen la región de los genes tempranos E6 y E7. El inicio de la transcripción se ubica en el nucleótido 97 por lo que se le nombró promotor P97, por lo cual los 3 productos son generados por splicing alternativo. El primer producto contiene el ORF completo de E6 y E7, el segundo es conocido como E6*I, E7, el sitio 5' de splicing que contiene se ha reportado como el más utilizado. El tercer RNAm es el E6*II, E7.

Las proteínas E6 y E7 son metaloproteinasas que contienen residuos de cisteína que les confiere afinidad por el zinc (dedos de zinc), y de unión al DNA. Las oncoproteínas E6 y E7 interactúan y/o modulan la expresión de muchas proteínas involucradas en la regulación epigenética, incluidas: las metiltransferasas de DNA, las enzimas modificadoras de histonas y las subunidades de los complejos de remodelación de la cromatina, influyendo en el programa de transcripción de la célula huésped (Doorbar et al., 2021). Además la interacción de E6 con proteínas celulares permite regular la replicación del DNA, cromosomas, la estructura del citoesqueleto, transducción de señales, la polaridad y adhesión celular.

E6

E6 es una proteína de 151 aa, que pesa 18 kDa, E6 muestra principalmente su impacto neoplásico en las células infectadas por el VPH, al estimular la degradación proteosomal dependiente de la ubiquitinación de p53 (Narisawa-Saito & Kiyono, 2007; Wang et al., 2018), un producto del gen supresor de tumores que previene la acumulación de mutaciones

destructivas que pueden causar el desarrollo de cáncer. La proteína E6 forma un complejo con AP (E6AP), una ubiquitina ligasa que se une a P53, ubiquitinando y destinando al proteosoma 26s. Se ha descrito que la concentración de p53 en células con E6, incluidas las células de cáncer de cuello uterino, es aproximadamente 2 a 3 veces menor que en las células sanas, al tiempo que se observa una reducción de su vida media. Como resultado, no se produce la respuesta típica de p53 al daño del DNA (Saranath et al., 2002).

Las mutaciones del DNA permanecen en el genoma sin reparar y se transmiten de una generación celular a la siguiente, terminando en una acumulación que con el tiempo conduce a mutaciones genómicas (Wang et al., 2018). Se ha informado sobre el mecanismo de silenciamiento génico mediado por E6, el cual implica además de la degradación de p53, por la liberación de la proteína especificidad 1 (Sp1), que se une al promotor de DNA (citosina-5)-metiltransferasa 1 (DNMT1) y regula al alza la expresión de este gen. Luego, la cantidad elevada de DNMT1 conduce a la hipermetilación del DNA (Balaji et al., 2021; Doorbar et al., 2012).

E7

La oncoproteína E7 contiene 98 aa y un peso molecular reportado de 11 kDa. E7 tiene similitudes con la secuencia de E6 al igual que a sus funciones, sin embargo, su función más relevante conocida es unirse a la forma hipofosforilada de la proteína de Retinoblastoma (pRb), perturbando así el complejo generado entre pRb y el factor de transcripción E2F. Esto provoca un movimiento temprano de la célula a la fase S, lo que conduce a la síntesis de DNA y, por último, a la división celular (Miinger & Phelps, 1993). La producción de E7 y sus efectos son necesarios para la replicación y finalización del ciclo de vida completo del VPH (Hikita y Kozako, 2001). E7 puede formar un complejo con pRb promoviendo su degradación, lo que da como resultado la liberación de E2F, que luego se une a la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) y provoca la hipermetilación de islas CpG (Dueñas-González et al., 2005).

El splicing alternativo del VPH-16

En el caso del VPH-16, el splicing alternativo es un proceso importante que genera tres productos de splicing alternativo denominados E6*I y E6*II, los cuales son muy similares, pero difieren en al menos 7 aminoácidos. Estas variantes de splicing de E6 han sido objeto de estudios que sugieren que podrían desempeñar diferentes funciones celulares. Por ejemplo, se ha atribuido a E6*I funciones parciales o similares a E6, que incluso pueden inhibir las actividades oncogénicas de la proteína E6 completa. Estas variaciones en el splicing alternativo podrían tener implicaciones significativas en la patogénesis y la progresión de las infecciones por VPH-16, lo que destaca la importancia de investigaciones adicionales para comprender mejor las funciones y consecuencias de estos productos de splicing alternativo. En el caso del VPH-16, el splicing alternativo es un proceso importante que genera tres productos de splicing alternativo denominados E6*I y E6*II, los cuales son muy similares, pero difieren en al menos 7 aminoácidos. Estas variaciones en el splicing alternativo podrían tener implicaciones significativas en la patogénesis y progresión de las infecciones por VPH-16.

Gen TP53 y sus Isoformas: En los seres humanos, el gen TP53 puede producir hasta nueve isoformas diferentes de ARN mensajero, que codifican 12 variantes funcionales distintas de la proteína p53. Estas isoformas se generan mediante corte y empalme alternativo, promotores y sitios alternativos de inicio de la traducción. Las isoformas de p53 desempeñan un papel crucial en diversas funciones celulares, como la respuesta al estrés celular, la reparación del DNA, el control del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia celular. Su capacidad para llevar a cabo múltiples funciones esenciales contribuye a una respuesta adecuada del organismo frente a situaciones de estrés y asegura el correcto funcionamiento del sistema celular. Se han observado patrones de expresión anómalos de estas isoformas en varias enfermedades malignas, lo que sugiere un papel clave en el desarrollo y progresión del cáncer.

Infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual.

La infección por el VPH se transmite principalmente por contacto sexual, puesto que se estima que alrededor de 70 % de las personas con vida sexual activa la poseen, también puede transmitirse a través del comportamiento sexual sin penetración, pero la probabilidad de que esto ocurra es menor. Evaluaciones clínicas han demostrado que la incidencia de infecciones de transmisión sexual (ITS) en niñas adolescentes suele ser de alrededor del 30 % y puede aumentar hasta al 64 % en ciertas poblaciones (van Gerwen et al., 2022). Otro estudio indicó que 4 años después de su primera experiencia sexual, más del 50 % de la población de mujeres jóvenes padecía una infección cervical por VPH. La identificación de VPH-AR en mujeres que no han iniciado vida sexual, recién nacidos y niños ofrece pruebas de que la interacción sexual no es el único método de transmisión del VPH (della Fera et al., 2021; Dunne & Markowitz, 2006).

Los VPH infectan a las células de las capas basales del epitelio estratificado que quedan expuestas después de algún tipo de microtraumatismo. Posterior a la entrada del virus, los genomas virales se establecen en el núcleo como elementos extracromosómicos o episomas en alrededor de 50 a 200 copias por célula y los genomas del VPH se replican en sincronía con los cromosomas celulares en la fase S de la mitosis. El ciclo de vida productivo del VPH está estrechamente relacionado con el estado de diferenciación de la célula epitelial del huésped y está regulado por la acción de proteínas virales y celulares (Stanley & Sterling, 2014).

El cuello uterino, es un canal con dos aberturas que se encuentra entre la vagina y el útero. Los epitelios que recubren el endocérvix y el exocérvix se unen en la zona de transición, también llamada zona de transformación, la cual es el área más vulnerable a la infección por VPH (LiVolsi, 2002). En la zona de transformación, se desarrolla con mayor frecuencia el cáncer de cuello uterino escamoso, además, es el lugar en el que se inician más del 90% de los tumores malignos del tracto genital inferior (Dunne & Markowitz, 2006; Muñoz et al., 2010). La zona de transformación incluye dos tipos de células epiteliales (células glandulares y escamosas), por lo que pueden ocurrir dos formas diferentes de cáncer en el cuello uterino. Un rápido aumento no regulado de células glandulares en el endocérvix genera un

adenocarcinoma en el 10-20% de los casos, aunque la incidencia parece estar aumentando en los últimos años (Brianti et al., n.d.).

Una neoplasia maligna de células escamosas es mucho más frecuente (ocurre en el 80-90 % de los casos) y suele ser asintomática en sus primeras etapas, pero puede causar dolor coital y pélvico, así como sangrado y flujo vaginal anormal a medida que avanza (Brianti et al., n.d.; Narisawa-Saito & Kiyono, 2007). Las células epiteliales escamosas infectadas por el VPH se convierten en coilocitos tras sufrir coilocitosis. En comparación con las células no infectadas, estas células tienen un núcleo más grande, más oscuro y con un contorno asimétrico rodeado por un área de espacio transparente, denominada halo perinuclear, y parecen estar vacuoladas. Esta alteración sugiere displasia celular menor y muestra un estado viral altamente replicativo (Yang et al., 2015). Después del inicio de una infección por VPH, la progresión de lesiones intraepiteliales escamosas (LIS) se divide en dos etapas dependiendo de las características de la lesión: Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LISB): También definida como neoplasia intraepitelial cervical de grado 1, que consiste en células basales inmaduras proliferantes y queratinizadas cuyos núcleos están rodeados por vacuolas: estas células representan la manifestación de una infección productiva por VPH y pueden constituir hasta 1/3 del epitelio cervical.

Generalmente sufre una involución espontánea hasta que desaparece, progresando a una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LISA) solo en el 20-30% de los casos (Jenkins, 2007). LISA: Abarca la neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 y 3. El primero se caracteriza por células epiteliales hiperqueratinizadas que colonizan 2/3 de las capas basales del cuello uterino; mientras que la neoplasia intraepitelial cervical de grado 3 representa las primeras etapas de la carcinogénesis inducida por el VPH y está formada por células altamente displásicas que sufren mitosis atípicas y ocupan los 2/3 de todo el epitelio, incluidas las capas superficiales (Jenkins, 2007). El cáncer de cuello uterino asociado a la infección por VPH-AR, frecuentemente tiene recidiva, siendo resistente a la quimioterapia o radioterapia convencional. La reactivación de la infección se ha observado comúnmente en mujeres que son inmunodeprimidas, pero la frecuencia en mujeres inmunocompetentes

sigue sin determinarse. Cuando el DNA viral no se integra en el genoma de la célula huésped, el VPH generalmente es neutralizado por el sistema inmunitario, en estos casos se presenta el cese de la proliferación anormal de células basales, las verrugas y las LIS retroceden y el epitelio cervical regresa a condiciones basales (Kaynarcalidan & Oğuzoğlu, 2021).

Sistema inmune y Cancer

El aumento de la frecuencia de LIS y cáncer de cuello uterino en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) sugiere la importancia de la respuesta inmune, y más específicamente de los linfocitos T, en la prevención o limitación de las lesiones asociadas al VPH-AR. La progresión del cáncer de cuello uterino está asociada con una restricción de una respuesta inmune tipo 1 mediada por células, que es necesaria para eliminar de manera eficiente las células (pre)neoplásicas. La expresión de citocinas en cáncer cervical se ha estudiado en pacientes para evaluar la importancia clínica, debido a que se han reportado cambios en la expresión de citocinas en el tumor con respecto a los tejidos sanos (Giannini et al., 1998; Paradkar et al., 2014a). Las respuestas inmunitarias se pueden dividir en dos tipos, tipo 1 producen IL-2, interferón-gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), o la respuesta de tipo 2, que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (Einstein et al., 2009).

Giannini y colaboradores han demostrado que varias citocinas contribuyen al inicio o la supresión de estas respuestas inmunitarias, como IL-4, IL-12, IL-10 y/o el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Además las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con SILA y cáncer producen cantidades reducidas de IL-2 e IFN- γ y niveles más altos de IL-4 e IL-10 luego de la estimulación mitogénica, en comparación con el grupo de control (Stanley & Sterling, 2014). Lo que refuerza la idea de que los tumores promueven un estado antiinflamatorio, realizando un cambio en la secreción de citocinas.

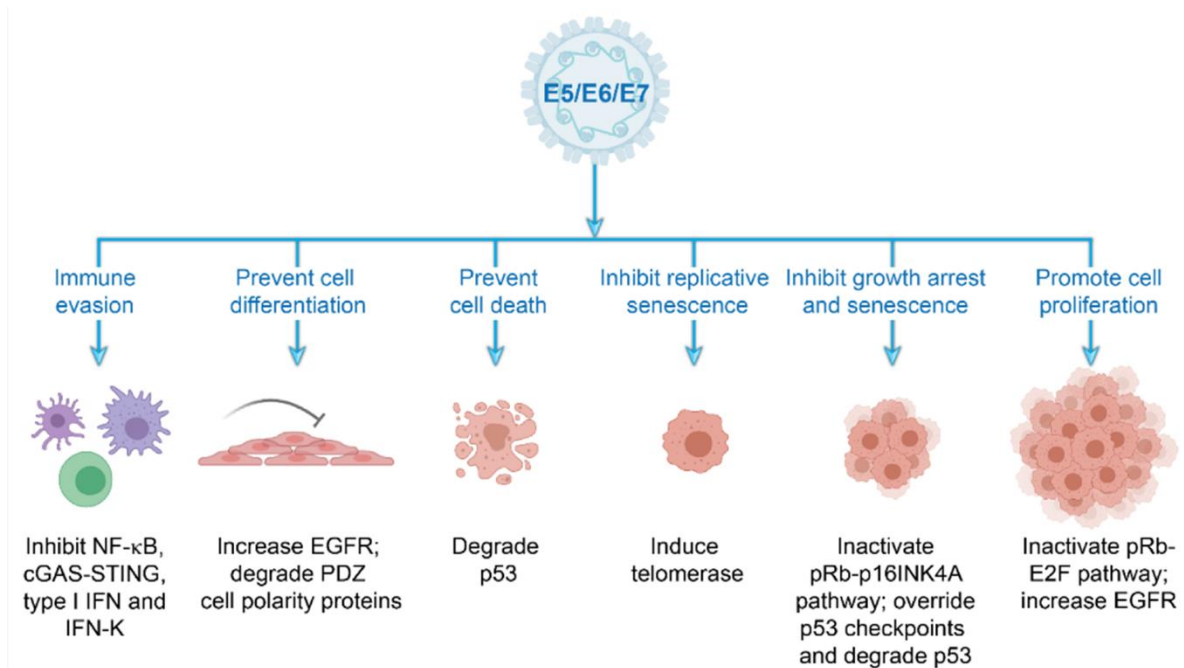


Figura 3. Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 en el sistema inmunológico y la progresión del Cancer.

Esquema tomado y modificada de Della Ferra, 2020.

IL-2

El equilibrio en el sistema inmunitario se mantiene mediante una armonía entre la activación, que da lugar a células efectoras y de memoria, y la supresión, que es principalmente mediada por células T reguladoras. La citocina Interleucina 2 (IL-2) se descubrió originalmente como un factor de crecimiento para las células T y se utilizó para estimular las respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer. Estudios en modelos experimentales y humanos han demostrado que la función principal de la IL-2 es mantener el correcto funcionamiento de las células T reguladoras, las cuales son esenciales en la supresión inmunitaria (Abbas, 2020).

La IL-2 se correlaciona con el estadio del tumor y el tamaño del tumor. La activación, inactivación y disfunción del sistema inmunitario han suscitado cada vez más interés en la investigación. En estudios recientes en donde la IL-2 se utiliza en pacientes como terapia antitumoral por su función de activar el sistema inmune, utilizada en bajas concentraciones por su capacidad de provocar el aumento de otras citocinas, desencadenaba toxicidad en el paciente administrado además de contrariamente a lo esperado aumentaba la progresión del tumor (Rangel-Corona et al., 2010).

También se demostró que la expresión de B7-H3 coestimuladores negativos sobre las células T en el cáncer de cuello uterino se correlacionó con el tamaño del tumor y la expresión de B7-H4 se correlacionó con el tamaño del tumor y el estadio FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (Huang et al., 2016). B7-H3, B7-H4 y Foxp3 se correlaciona negativamente con la expresión de IL-2, lo que sugiere que la inhibición del sistema inmunológico se puede lograr por B7-H3, B7-H4 y Foxp3 que promueve la proliferación de células Treg, regulando al alza la expresión de Foxp3 en células de cáncer de cuello uterino o suprimiendo directamente la secreción de IL-2 (Huang et al., 2016).

Para que IL-2 genere su efecto en la célula debe estar presente el receptor celular para IL-2, el cual es un receptor trimérico, la función de señalización del receptor está mediada por las cadenas β (CD122) se comparte con IL-15R, posee 551 aa y tiene un peso molecular esperado de 64 kDa, sin embargo, en estudios recientes se han reportado variaciones en el peso por un procesamiento de corte de metaloproteasas como sistema regulador en células de Cancer (De Oca B. et al., 2010). También se compone con la cadena γ (CD132, 64 kDa) conocida como cadena común por que se comparte con los receptores para IL-4, -7, -9, -15, and -21, que se expresan en las células T y NK de manera constitutiva, pueden regularse por activación y dimerizar para unirse a IL-2 con baja afinidad. La tercera cadena, α (CD25, 55 kDa) no tiene capacidad de señalizar, debido a su corta cola intracelular, pero confiere al receptor alta afinidad a IL-2, sensible a una menor cantidad de la molécula disponible para generar la cascada de señalización, al formar el receptor trimérico su contante de

disociación es de $K_d \approx 10\text{--}100$ p m. Las señales del receptor de IL-2 activan los factores de transcripción STAT5 y NF- κ B, y estos factores de transcripción inducen las moléculas que promueven la supervivencia y proliferación celular. CD25 aumenta transitoriamente tras la activación de las células T por el antígeno y otros estímulos, lo que permite que las células T produzcan y responden a la IL-2, lo que conduce a la expansión preferencial de clones específicos de antígeno (Abbas, 2020).

La IL-2 es producida principalmente por las células T, particularmente por las células colaboradoras CD4⁺. En tumores de CaCu se ha observado un aumento de IL-6, lo que provoca la inhibición de CD122 y permite que las células T FH reciban señalización de TCR sin iniciar un bucle inhibitor TCR/IL-2 (Papillion et al., 2019). La señalización de IL-6 impide la expresión de CD122, al interferir con la activación de STAT5, no puede asociarse con el locus Il2rb. lo que impide el inicio de un ciclo de retroalimentación positiva de señalización de TCR/IL-2/STAT5 que da como resultado una mayor capacidad de respuesta a IL-2 y un aumento en su expresión (Paradkar et al., 2014b). CD25 también se expresa en células T reguladoras (Tregs), la IL-2 actúa sobre las células Treg para mantener la autotolerancia, induciendo y manteniendo a las células Tregs. La IL-2 promueve la expresión de FOXP3 y la activación de STAT5, los factores de transcripción que impulsan gran parte de la función supresora de las Treg (Fan et al., 2018). Las células Treg responden a la IL-2 en concentraciones de 10 a 100 veces más bajas que la cantidad necesaria para activar las células T FOXP3 convencionales. Esta alta sensibilidad de las Treg a la IL-2 se debe en parte a que las Treg expresan constitutivamente altos niveles del receptor trimérico de IL-2 de alta afinidad, mientras que las células T convencionales expresan CD25 de forma transitoria y solo después de la activación.

La IL-2 se ha correlacionado con el estadio del tumor y el tamaño del tumor. En estudios recientes en donde la IL-2 se utilizó en pacientes como terapia antitumoral por su función de activar el sistema inmune, fue utilizada en bajas concentraciones por su capacidad de provocar el aumento de otras citocinas, desencadenando toxicidad en el paciente posterior a

su administración, contrariamente a lo esperado además aumentaba la progresión del tumor (Rangel-Corona et al., 2010). La expresión del IL-2R y la producción de IL-2 por parte de las células tumorales se han demostrado en una variedad de tumores malignos humanos: el melanoma, los carcinomas de células escamosas humanas y los cánceres de cuello uterino, mama y pulmón. Sin embargo, el papel de la IL-2 en el cáncer, incluyendo cáncer de cuello uterino, no se comprende por completo.

Las células de cuello uterino normales no expresan IL-2R, pero si se observa su expresión en células de cáncer de cuello uterino. Algunos informes indican que este fenómeno está relacionado con la progresión de la lesión. La expresión de IL-2, IL-2R e IL-10 en el tejido cervical puede desempeñar un papel en el desarrollo de displasia intraepitelial cervical, mientras que la expresión de IL-2 está asociada con la proliferación celular en casos de carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Rangel-Corona et al., 2010; Ross & Cantrell, 2018). El IL-2R es funcional en algunas líneas celulares de cáncer de cuello uterino, IL-2 exógena induce la proliferación de estas células. Estas células de cáncer de cuello uterino también producen y secretaban IL-2.

Sea inferido que la propiedad adquirida por las células tumorales de utilizar IL-2 para su propia proliferación podría dar lugar a un mecanismo de competencia con los linfocitos por este factor de crecimiento y el uso de IL-2 por parte de las células tumorales agota este factor de crecimiento en el sitio del tumor, siendo absolutamente necesario el factor de crecimiento para que los linfocitos que se infiltran en el tumor se vuelvan citotóxicos. Además, la IL-2 puede estar regulando la transcripción hacia un perfil parecido a las células Treg al expresar IL-2R de alta afinidad (Gaffen, 2001; Rangel-Corona et al., 2010).

Antecedentes

Se ha publicado que las líneas celulares de CaCu, CALO (VPH-18+) e INBL(VPH-18+) expresan el receptor c-kit y que la IL-2 exógena aumenta esta expresión, cuando este receptor se coexpresa con el IL-2R disminuye la cantidad de IL-2 necesaria para inducir la proliferación. También, se ha reportado expresión de IL-2 en células HeLa (VPH-18+). Por lo tanto, el mecanismo de competencia entre las células de CaCu y los linfocitos está a favor de las células malignas debido a que responden concentración muy baja de este factor de crecimiento para su proliferación (Rangel-Corona et al., 2010). También se demostró que la cantidad de IL-2R expresada por las células de CaCu *in vivo* aumenta junto con el estadio del tumor, se puede deber a que las células de cáncer de cuello uterino pueden haber desarrollado una dependencia de IL-2 para la proliferación, con el fin de escapar de la vigilancia inmunológica del organismo y aumentar aún más su propia proliferación, de tal manera que cuanto más intenta el organismo activar su respuesta inmunológica contra el tumor al producir IL-2, más se benefician las células tumorales, la IL-2 está funcionando en estas líneas celulares como un factor de crecimiento autocrino (Rangel-Corona et al., 2010). Las bajas concentraciones de IL-2 pueden promover el microambiente regulador y el crecimiento tumoral, sin embargo las altas concentraciones de IL-2 activan las células del sistema inmunitario, como las células T CD8+, CD4+, $\gamma\delta$ y las células NK; estas células producen citocinas proinflamatorias, como el IFN - γ , y eliminan las células tumorales (Fan et al., 2018; Rosalia et al., 2014). De manera interesante, la línea celular C-33A, negativa a papilomavirus, expresa grandes cantidades del mRNA de IL-2 desconocemos si expresa y secreta la proteína de IL-2, lo que tendremos que investigar.

Se desconoce, si las líneas celulares positivas para HPV-16 expresan IL-2. Sin embargo, datos de nuestro laboratorio muestran que las líneas celulares SiHa y CaSki (positivas para VPH-16), Se detecta el mRNA de IL-2 y tampoco secretan IL-2, pero en cambio secretan grandes cantidades del mRNA de IL-6, y además del mRNA de TNF- α (**Figura 4**). Además, secretan grandes cantidades de la proteína de IL-6 en el medio de cultivo y concentraciones bajas de la proteína soluble de TNF- α , pero con cinéticas diferentes para las 2 líneas celulares (**Tabla**

1) .Se desconoce si VPH-16 cambia y altera el perfil de secreción de citocinas en CaCu. Nos preguntamos si las células C-33A, transfectadas con los oncogenes de VPH-16, mantienen su perfil de secreción de citocinas o lo alteran de una manera a que pueda ser similar al de las células SiHa y CaSki.

RNA extraído a las 48 horas de cultivo

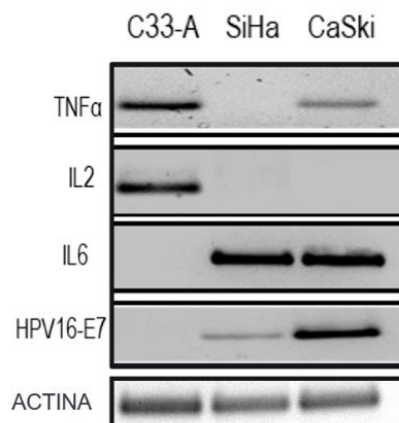


Figura 4. RT-PCR de tres líneas celulares de Cáncer cervicouterino

C33-A negativa a VPH y SiHa y CaSki positivas a VPH-16, en donde se muestra presencia de RNAm de Citocinas a las 48 horas de cultivo.

Tabla 1. Concentración de TNF-α e IL-6 en sobrenadante de las líneas celulares:

SiHa y CaSki (positivas para VHP-16) y negativas para VPH (C33-A y HaCaT), la presencia del VPH-16 parece indicar un cambio en la expresión de citocinas como se reporta en la literatura.

Cell Line	TNFα pg/ml				IL-6 pg/ml			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
HaCaT	ND	ND	ND	ND	432	567	1193	1336
C33-A	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CaSki	4.4	32.5	17.7	13.95	1056	3772	37,906	5586
SiHa	ND	ND	17.7	31.1	207	5183	12,155	11,256

Justificación:

El CaCu es en gran parte prevenible por la progresión lenta que presenta el SIL. En los países de ingresos altos, la incidencia y la mortalidad por cáncer de cuello uterino se ha reducido a más de la mitad, debido al acceso de la vacunación contra el VPH y la introducción de programas formales de detección.

A pesar de que la prevención a través de la vacunación es una herramienta importante en la disminución de casos de CaCu, la vacuna no es terapéutica por lo que es indispensable entender la relación entre el cáncer, el sistema inmune y el VPH. El VPH16 es el virus más asociado a la oncogénesis, por lo que es importante estudiar cuales son los mecanismos por los que promueve la evasión del sistema inmune, y favorece la progresión del cáncer. IL-2 se ha reportado asociado con la progresión del Cancer. Debido a que nosotros no lo detectamos en células VPH-16+. Queremos comprender si la expresión de IL-2 cambia por acción de los oncogenes de VPH-16. IL-2 es una molécula importante en la regulación del sistema inmune y además de ser un factor de crecimiento que ha demostrado ser importante en la proliferación de las líneas celulares de CaCu asociado a VPH-18. Las células C-33A, tumorales pero carentes de VPH expresan IL-2, pero las células tumorales que contienen VPH-16 no se ha logrado detectar el RNAm de IL-2 por PCR tiempo final.

Hipótesis

La presencia de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-16 altera la expresión de IL-2 en células de cáncer cervicouterino negativas a VPH (C33-A).

Objetivo general

Caracterizar molecularmente la expresión de IL-2 y sus receptores en una la línea celular de cáncer cérvico uterino negativa para VPH (células C33-A) y después de ser transfectadas con los Oncogenes E6/E7 de HPV-16.

Objetivos particulares

1) Determinar la presencia de GFP,E6 y E7 en las celulas transfectadas con el bicistron (sistemas N1 o Sleeping Beauty) a nivel de RNAm.

2) Determinar la presencia de IL-2 en las células control (C33-A, CaSki) y las celulas transfectadas con el bicistron (E6E7)a nivel de:

- a) RNAm
- b) Proteína
- c) Secreción

3) Analizar la presencia del receptor de IL-2 en células control y las celulas transfectadas a nivel de :

- a) RNAm
- b) Proteína

Estrategia experimental

Las células se descongelaron del repositorio almacenado en nitrógeno que pertenece al laboratorio 1. Posteriormente se cultivaron con los medios correspondientes para las líneas celulares C33-A, CaSki, HeLa y Jurkat (donada amablemente por el Dr. Vianey Ortiz Navarrete). La línea celular Jurkat se usó como control positivo de expresión de IL-2. Los medios de las células C33-A transfectadas fueron adicionados con el antibiótico de selección G418 (Geneticin de Thermo Fisher) correspondiente al gen de resistencia a Neomicina. Se utilizaron dos sistemas de transfección para ver los efectos de las oncoproteínas cuando son transcritas con promotores diferentes, lo que confiere una mayor o menor cantidad de proteína exógena en la célula transfectada. En el sistema N1 se utilizó un vector comercial pEGFP-N1, pero fue renombrado en este escrito como N1, para un mejor manejo, de igual forma que con el sistema SB (pSBbiGN).

Vector pEGFP-N1 (N1)

El bicistron E6/E7 fue amplificado mediante PCR a partir de cDNA de la línea celular CaSki. El producto de PCR se insertó en el vector pJet 2.1. Luego, se realizaron cortes con enzimas de restricción *Hind* III y *Bam* HI tanto en el plásmido pEGFP-N1 como en el vector pJet-E6E7C. El vector posee la zona del promotor el cual es el promotor de Citomegalo virus (CMV) y seguidamente los genes de interés, que se transformara en RNAm bicistrónico. Posteriormente, se realizó una ligación con los fragmentos mencionados, y se llevó a cabo una transformación de células competentes XL-10 Gold. Como resultado, se obtuvieron colonias que contenían el vector con el bicistron incorporado. Estos plásmidos se purificaron y se enviaron a secuenciar 3 clonas. Se confirmó que la secuencia obtenida correspondía al bicistron de CaSki, y se verificó que el marco de E7 estaba en fase con la proteína EGFP. Finalmente, se obtuvo una mayor cantidad de plásmido para su posterior transfección. El sistema está conformado por el promotor de Cito Megalovirus (CMV) y la región de genes de interés, en este caso los genes E6 y E7 de VPH-16, además cuenta con el gen reportero GFP, que esta fusionado al gen de E7.

Vector Sleeping beauty (SB) Se amplificó el bicistron E6E7 mediante PCR utilizando cDNA de la línea celular CaSki. Luego, se clonó el producto en el vector pJet2.1. Después de esto, se realizaron transformaciones en células competentes para incorporar el bicistron en pJet. Para confirmar la presencia del inserto en pJet, se llevó a cabo una corroboración. A continuación, se procedió a cortar el vector pSBbiGN y el pJet-E6E7 utilizando la enzima SfiI. Luego, se realizó la ligación del vector y el inserto y se llevaron a cabo transformaciones en células competentes XL10-Gold para asegurar que el vector contenga E6E7. Una vez verificada la presencia de E6E7 en el vector, se extrajo el plásmido para su secuenciación, y se confirmó que la secuencia correspondía al bicistron E6E7 de CaSki. Por último, se obtuvo una mayor cantidad del vector pSBbiGN/E6E7C para su posterior transfección.

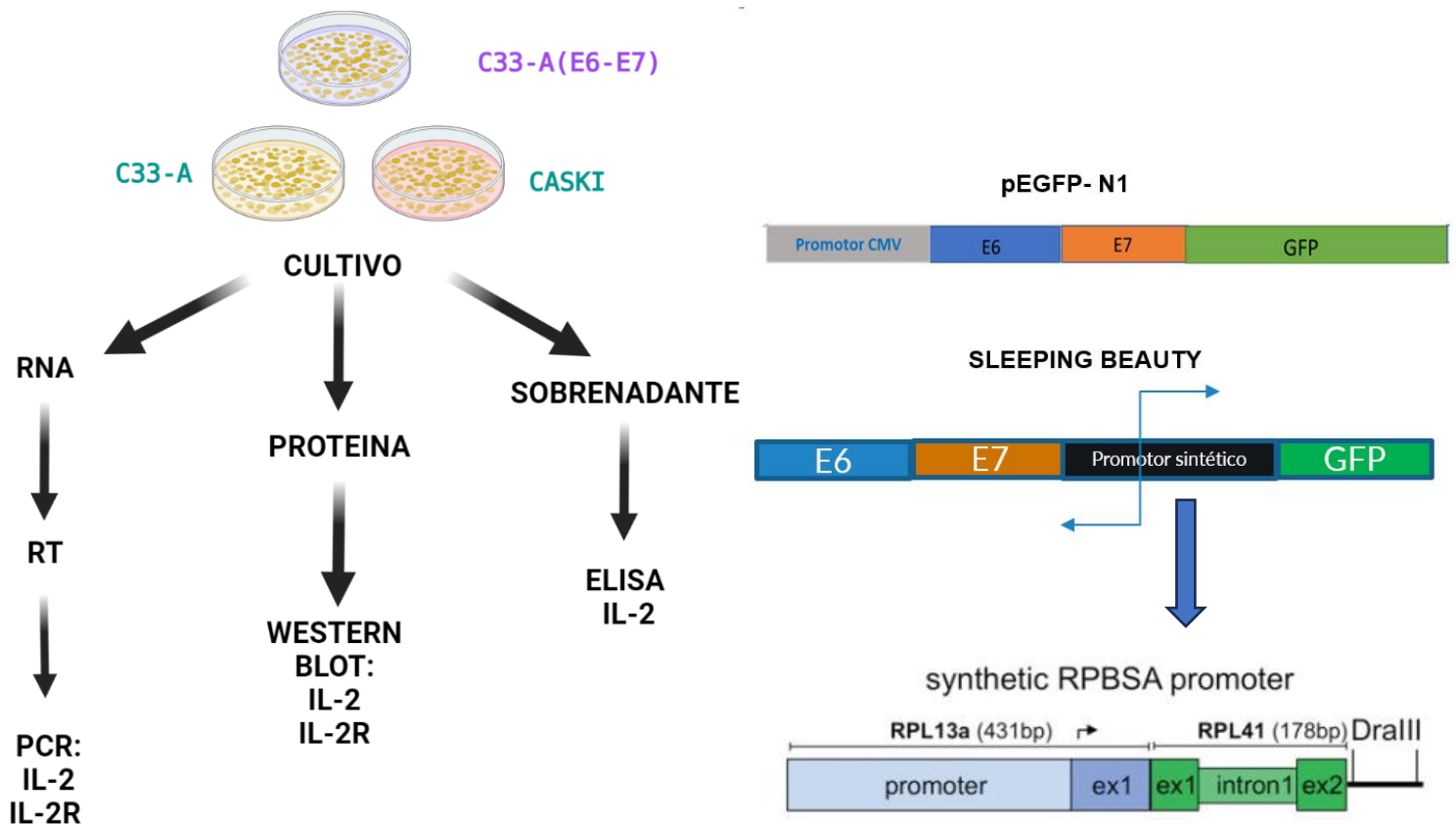


Figura 5. Estrategia experimental representada esquemáticamente

Esquema acompañado de los sistemas de transfección que se utilizaron. Tomado de (Kowarz et al., 2015)

Materiales y Métodos

En este estudio, se emplearon diversas líneas celulares de cáncer cervicouterino, incluyendo C33-A y C33-A transfectadas con el bicistron E6-E7 (C33ABE6-E7) utilizando dos construcciones: N1 y Sleeping beauty. Como controles, se utilizaron CaSki, una línea celular positiva para VPH-16, y Hela, una línea celular positiva para VPH-18. Además, se emplearon las células Jurkat como control positivo para la expresión de IL-2. Todas las líneas celulares se obtuvieron de ATCC.

Las células CaSki se cultivaron en medio RPMI, mientras que las C-33A en medio mínimo esencial de Eagle (MEM), ambos suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO₂. Se recuperaron células en diferentes tiempos, con confluencias aproximadas de 50% y 100%, respectivamente. Se obtuvo 1 mL de sobrenadante por cada caja de Petri en los diferentes tiempos y condiciones.

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA, se llevaron a cabo los siguientes pasos. Se eliminó el medio de las células y se lavó la caja con PBS 1X en dos ocasiones. Para las muestras con un 50% de confluencia, se agregaron 500 µl de trizol (Invitrogen), mientras que para las muestras con un 100% de confluencia, se utilizaron 1000 µl de trizol. Se despegaron las células de la caja utilizando un gendarme estéril y se disgregaron con una pipeta hasta reducir la viscosidad. Posteriormente, las células se transfirieron a un tubo eppendorf y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadieron 100 µl de cloroformo (por cada 500 µl de trizol) a cada tubo, se mezcló y se incubaron en hielo durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 1200 rpm durante 15 minutos a 4°C, obteniendo así la fase acuosa, que se transfirió a un nuevo tubo estéril. A continuación, se precipitó el RNA mediante la adición de 250 µl de isopropanol (por cada 500 µl de trizol) y se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó nuevamente la

muestra y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Finalmente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla que contenía el RNA se solubilizó en 30 μ l de agua libre de nucleasa y se almacenó a -70°C . Para verificar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 1X.

Tratamiento con DNasa free

En el tratamiento con DNasa, se utilizó el KIT DNA-FREE de BIORAD para 50 μ l de RNA. Se agregaron 3 μ l de Buffer de la DNasa al tubo con el RNA a tratar, luego se añadió 1 μ l de enzima y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se agregó otra vez 1 μ l de enzima y se incubó nuevamente a 37°C por 30 minutos adicionales. Para neutralizar la enzima, se agregaron 3 μ l de reactivo de inactivación, se agitó por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con TAE 1X.

Transcripción inversa

En la transcripción inversa, se extrajo el RNA total de las siguientes muestras: C-33A, CaSki, C33-A SBE6E7, SBMock, N1E6E7, N1Mock, Jurkat y PBMCs. El DNA complementario se sintetizó utilizando 10 μ g de RNA total y 4 μ l de oligo(dT) 10 μ M de Thermo Scientific. La mezcla se calentó a 70°C durante 10 minutos. En otro tubo, se preparó una mezcla con 8 μ l de Buffer 5X, 4 μ l de DTT 0.1 M, 4 μ l de dNTPs 2.5 mM y NFW (agua libre de nucleasa). Esta mezcla se agregó al tubo con el RNA y el oligo dT, y se incubó a 22°C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 2 μ l de enzima SSII y se incubó a 42°C durante 90 minutos.

Amplificación por PCR punto final

Las PCR para IL-2 fueron realizadas utilizando 1 µg/µl de cDNA. La mezcla de reacción para PCR se preparó de la siguiente manera: se utilizó Buffer (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM (Invitrogen), mezcla de dNTP 2.5 mM (Thermo Scientific), 1 U de polimerasa de DNA Taq (Invitrogen) y 144 µL de agua libre de nucleasas, junto con los oligos correspondientes. Las muestras fueron sometidas a 25 ciclos de amplificación, con las siguientes condiciones: 92°C durante 10 segundos, luego 92°C durante 20 segundos, a continuación 45°C durante 45 segundos y, finalmente, 72°C durante 7 minutos por ciclo. Cada experimento de PCR incluyó los siguientes controles negativos: cDNA de CaSki e IL-6, y también se utilizó la proteína E7, que no se expresa en C-33A. Además, se incluyó un tubo con la mezcla sin muestra.

Los productos amplificados mediante PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0% de BIORAD y las bandas resultantes se tiñeron con bromuro de etidio. Actina y GADHP fueron empleados como control interno en cada amplificación. Las condiciones se ajustaron para los genes a amplificar, por lo que las temperaturas varían, en el caso de los genes de los receptores, se utilizó la polimerasa Q5 de Biolab, la cual es de alta afinidad y específica para la amplificación de genes con altos porcentajes de GCs. Los experimentos de PCR incluyeron controles negativos y muestras de referencia para garantizar la calidad de los resultados.

Tabla 2. Secuencias utilizadas para los ensayos de PCR.

	Forward	Reverse
IL-2	GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCC	TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG
IL-2Rα	CAGCTCATATGCACAGGTGAAATG	GTTCTTCTACTCTTCCTCTGTCTCC
IL-2Rβ	CAGACCTGGTGGATTTTCAGCCACC	CTACACCAAGTGAGTTGGGTCCTGAC
IL2Rγ	GAGGATCTTGTTACTGAATACCACGG	GGTTTCAGGCTTTAGGGTGTAACATG
E7	ATGCATGGAGATACACCTACATTGC	TGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCA
GADPH	GACCCCTTCATTGACCTCAAC	GTGGCAGTGATGGCATGGACT
Actina	GAAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	CACACGGAGTACTTGCGCTC
IL-6	GCAGCAAAGAGGCACTGGCAG	GTTCTGGAGGTACTIONTAGGTATAC

ELISA de il-2 en sobrenadantes de cultivos de CaCu

Para evaluar si C-33A, CaSki, C33-A SBE6E7, SBMock, N1E6E7, N1Mock y Jurkat produjeron y secretaron IL-2 como un posible mecanismo autocrino para la regulación del crecimiento, se realizó un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para detectar la presencia de IL-2 en los sobrenadantes recolectados de sus respectivos cultivos en diferentes momentos. Para las células C33-A y las transfectadas, se llevó a cabo una curva de

recolección de sobrenadantes, comenzando a las 24 horas y recolectando cada 12 horas hasta las 72 horas. Se utilizó el kit de ELISA (BD OptEIA-555190) para medir la IL-2 en los sobrenadantes. Se sensibilizó una placa ELISA de 96 pocillos con buffer de carbonatos (pH 9,2) al que se añadió anticuerpo de captura diluido 1:250, y se dejó cerrada toda la noche a 4 °C. Luego, se lavó la placa tres veces con tampón PBS-T (PBS con Tween 20 al 0,1%, pH 7,2). Se bloqueó con PBS a pH 7.2 + SFB 10% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS-Tween. Después del tiempo de bloqueo, se lavó tres veces más, se preparó la curva con el estándar de referencia y se añadieron 100 µL de muestra de sobrenadante sin diluir en cada pocillo, para luego incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se lavó cinco veces con PBS+Tween. Se agregó la mezcla de revelado, que consistía en una combinación de conjugado de peroxidasa IgG anti-ratón y biotina diluidos en PBS+ SFB 10%, a cada pocillo, y luego se incubó durante 1 hora. Finalmente, se lavó la placa siete veces con agitación durante 30 segundos, seguido de la adición de 50 µL de TMB de Santa Cruz a cada pocillo. La reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 1N y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA. Las concentraciones de IL-2 se calcularon utilizando una curva estándar.

Extracción de proteína y Western blot

La obtención de las proteínas se realizó empleando la solución RIPA (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1% y proteasa) para la extracción. Se agregaron 500 µL por caja de Petri con una confluencia de entre el 70-80%. Las células fueron disgregadas con la ayuda de un gendarme, y la muestra se sometió a sonicación para disminuir la viscosidad. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, BIO-RAD) utilizando el Transblot de BIORAD (Transferencia en seco). Las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en solución salina tamponada con Tris 1× complementada con Tween-20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura

ambiente. Luego, se añadieron los anticuerpos primarios específicos y los secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) en las siguientes diluciones: anti-IL-2 (1:750), anti-CD122 (1:500) y anti-CD132 (*Cell signaling technology*) o anti-CD25 (1:250, Santa Cruz), Después de lavar con TBST (solución salina tamponada con Tris y Tween-20 al 0,1%), las bandas de proteínas se visualizaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia Femto. La densitometría se realizó con Clarity Western ECL Substrate y las imágenes fueron foto documentadas en el ChemiDoc MP Imaging System. Beta actina se utilizó como control de carga.

Análisis de citometría de flujo (facs)

Las células ($2,5 \times 10^6$) se sembrarán una noche antes en cada una de las cajas de Petri. Las células C-33A se cultivarán durante un máximo de 24 horas y se liberaron de las placas de cultivo mediante una incubación de 5 minutos con solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). Se realizó la eliminación de la tripsina a través de neutralización con suero y centrifugado a 4°C por 5 min a 1500 rpm. Se procedió a lavar la pastilla resultante con PBS 1X y se resuspendieron las células en PBS 1X. Se realizó la detección de fluorescencia en las células transfectadas, debido a que poseen GFP (Proteína verde fluorescente) tanto en el sistema N1 en donde la proteína GFP está fusionada a E7 y en el sistema SB que traduce GFP de forma separada. Como control negativo se utilizaron las células C33-A sin transfectar.

Resultados

Objetivo 1: Determinar la presencia de E6 y E7 en las células transfectadas con el bicistron (sistemas N1 y Sleeping Beauty):

Para investigar el efecto de las oncoproteínas en la regulación de la expresión de IL-2, se utilizaron células transfectadas en el laboratorio 1 (datos no publicados Bio. Raúl Bonilla, auxiliar de laboratorio) con los siguientes sistemas como se explica en el diseño experimental, con el sistema N1, y el sistema SB, el gen reportero en los dos sistemas es GFP, por lo cual se midió el porcentaje de células que emiten fluorescencia mediante Citometría de flujo. En términos generales se observó una eficiencia de transfección mayor de 75% con los 2 vectores y 70% y 83% respectivamente con los vectores control (Figura 6).

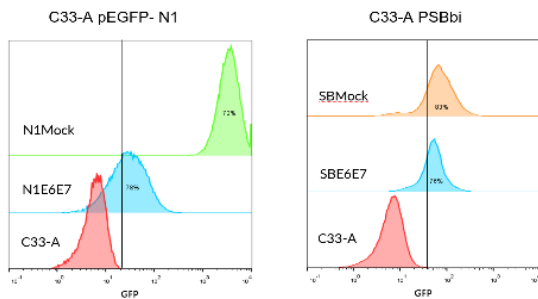


Figura 6. Análisis de porcentaje de células fluorescentes

Análisis de porcentaje de células fluorescentes: En poblaciones celulares con crecimiento de 24 horas de cultivo. Se observan porcentajes similares de fluorescencia en los dos sistemas.

Se realizó una curva de extracción de 16, 24, 36 y 48 hrs. y se observó que, si bien a las 48 horas la obtención de RNA es mayor, como era de esperar no detectamos transcrito de IL-2 en C-33A. Se decidió tomar como primer tiempo de extracción para RNA tota las 24 hrs. de cultivo, porque las cantidades de RNA obtenidos de cultivos de menor tiempo son escasas. En las células C-33A transformadas con el vector la expresión de los oncogenes se observa a partir de las 12 hrs. de cultivo; en células con expresión constitutiva en el vector N1, la expresión es más baja, pero claramente detectable. Solo se detecta claramente los 2 transcritos principales de los oncogenes E6/E7 de VPH-16, el bicistron completo y la forma

de E6**I*, este último es el transcrito más abundante en tumores y líneas celulares (Figura 7A). La expresión de los oncogenes se confirmó con la detección del transcrito del oncogén E7 (Figura 7B). La expresión es mayor en las células transfectadas con el vector SB debido a que contiene un promotor más fuerte, que el de CMV presente en el vector N1.

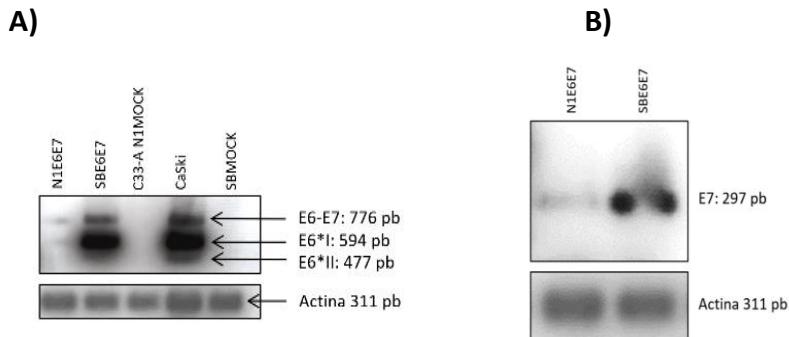


Figura 7. Expresión de los RNAs mensajeros bicistronicos de E6 y E7

A) En las células transfectadas con el bicistron (sistemas N1 y Sleeping Beauty): Se observa una mayor cantidad de los 3 transcritos que corresponden a las formas de splicing alternativo del bicistron. En donde observamos una mayor cantidad relativa entre las células transfectadas con el sistema SBE6E7, y una cantidad menor en células transfectadas con N1E6E7. El RNA se extrajo de células con cultivo de 24 horas. **B)** Detección de la presencia de RNA mensajero de E7: En las células transfectadas con los dos sistemas y un mayor número de ciclos, en donde se observa que las cantidades de transcrito son diferentes en los dos sistemas, siendo mayor en células transfectadas con SBE6E7.

Objetivo 2: Determinar la presencia de IL-2 en las células control (C-33A, CaSki) y en las células transfectadas con el bicistron (E6E7), por presencia de RNAm y proteína.

La presencia de los transcritos de IL-6 e IL-2 fue determinada a las 24 horas de cultivo en C-33A y CaSki. En C-33A no se detecta el transcrito de IL-6 pero si el de IL-2 y en CaSki es el caso contrario, está presente el mRNA de IL-6 pero no se detectó el de IL-2 (Figura 8A). En las células transfectadas con los Oncogenes de E6/E7 no se detectó el transcrito de IL-2, a comparación de las células transfectadas con los MOCK en los dos sistemas. Notablemente

se detectó el mRNA de IL-2 en las células transfectadas con los vectores únicamente (MOCK), lo que corresponde con lo observado previamente en las células C-33A sin transfectar. Este dato deberá analizarse con más profundidad en experimentos futuros, con más tiempos de cultivo. El resultado es razonable porque en CaSki tampoco se detecta el mRNA, sugiriendo un efecto de los oncogenes de VPH-16 en el nivel de mRNA de IL-2 (Figura 8B).

En cuanto a los niveles del RNA de IL-6 en las células C-33A transfectadas con los 2 vectores diferentes. No se observó ningún cambio y continuo sin detectarse en C-33A (Figura 8C).

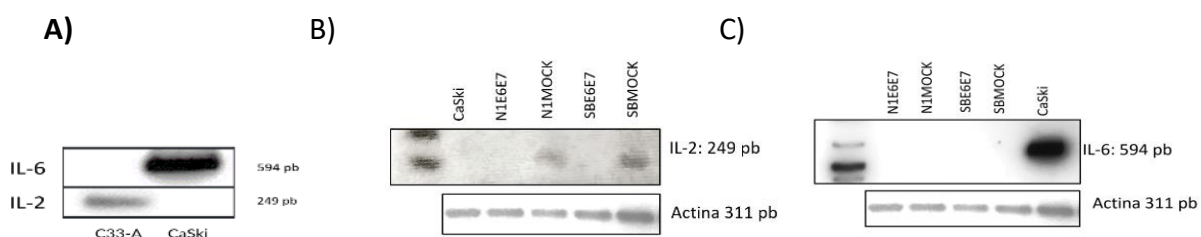


Figura 8. RT-PCR de las células para corroborar antecedentes a diferente tiempo

Detección del mRNA de IL-2 e IL-6 en células C-33A transfectadas y sin transfectar con los oncogenes de E6/E7 de VPH-16. En panel. A) se observa la expresión del mRNA de IL-2 en células C-33A y la nula expresión del mRNA IL-6. En panel B) Se observa la expresión del mRNA de IL-2 en células C-33A transfectadas con los MOCK (en los vectores N1 o SB). C) Amplificado por RT-PCR del gen de IL-6 en C-33A transfectadas con los dos sistemas Positiva a VPH-16, el amplificado se detecta en CaSki a las 24 horas, como en los antecedentes del laboratorio de RNAm de 48 horas.

En la detección de la proteína de IL-2 mediante ensayos de WB; inesperadamente se detectó una proteína de 50kDa aproximadamente, se esperaba un peso de 18 kDa (Figura 9A). Cabe destacar que en el western inicialmente se detectaron 3 bandas de entre 55 y 43 kDa (Figura 9A), pensamos que pudiese tratarse de agregados con otras macromoléculas porque se trató la muestra con SDS durante la transferencia y solo se detectó la banda de 50 kD (Figura 9B). Interesantemente, se detectó una disminución de la proteína en presencia de los oncogenes (Figura 9A) en comparación con el MOCK. En el panel B, se corroboró la disminución de IL-2 de las células transfectadas con N1E6E7 con respecto a las células

transfectadas con el MOCK, también se observa una disminución aparente de IL-2 en las células transfectadas con SBE6E7 con respecto a las células SBMock. Este dato está en línea con la disminución de transcrito de IL-2 en presencia de los oncogenes E6/E7 de VPH.

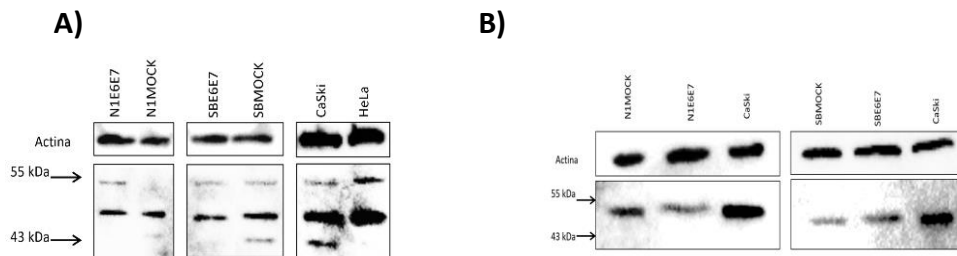


Figura 9. Expresión de la proteína de IL-2 en las células transfectadas y los controles

Detección de la proteína IL-2 con peso aproximado de entre 43-55 kDa, en células C-33A transfectadas con los oncogenes E6E7, y los respectivos mock en los dos sistemas. Proteínas totales utilizando buffer RIPA, extractos de 24 horas de cultivo. En el panel A) Se observa una aparente disminución de la proteína en las células transfectadas con los oncogenes de VPH-16, también se detectan bandas adicionales en todos los carriles, también se detecta IL-2 en CaSki y HeLa. En el panel B) Se observa IL-2 en CaSki y en las células transfectadas con N1E6E7 se presenta una disminución con respecto al Mock, a diferencia de las células transfectadas con SBE6E7 que presenta un aumento aparente de IL-2 con respecto a su Mock.

En la detección de la secreción de IL-2 por la técnica de ELISA observamos secreción de IL-2 en el sobrenadante de las células C-33A sin transfectar en tiempos tempranos, por el contrario, en las células C-33A transfectadas con el vector N1, pareciera incrementar la secreción a partir de las 42 hrs. (Figura 10). Interesantemente en las células C-33A transfectadas con SB el incremento de secreción de IL-2 es mayor con el tiempo y los valores son más altos que los observados en las células transfectadas con el vector N1 que correlaciona con el aumento aparente que observamos en el WB, también se observa el aumento las 42 hrs. pero disminuye a partir de las 56 hrs. (Figura 10B). Se detecto un aumento de IL-2 en sobrenadantes de células transfectadas con los oncogenes con los dos sistemas. Además las concentraciones de IL-2 en el sobrenadante de CaSki fueron mayores

que en las células C-33A y (Control positivo). Cabe destacar que en células CaSki no se detectó el mRNA de IL-2. Los datos anteriores sugieren que los oncogenes promueven la secreción de IL-2, lo que explicaría la disminución aparente de proteína de IL-2 observada por western blot. Estos datos requieren una investigación más detallada.

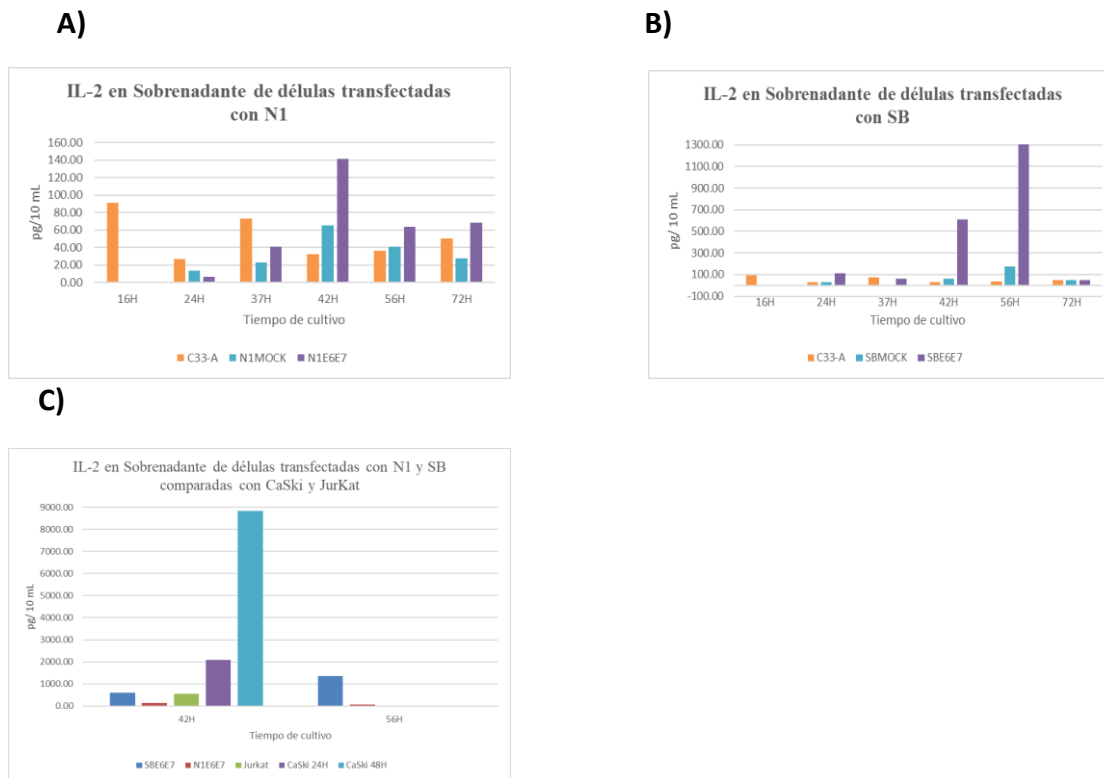


Figura 10. Secreción de IL-2 en células C-33A, transfectadas y CaSki

Se realizó una curva de obtención de sobrenadantes de células en cultivo y se utilizó la técnica de ELISA para medir la concentración de IL-2 en el sobrenadante. Se observó un aumento significativo de IL-2 en las células SBE6E7 a las 42 y 56 horas en comparación con las células C-33A y SBMOCK. En la gráfica **A)**, se compararon las concentraciones de IL-2 en los sobrenadantes de células C-33A sin transfectar y transfectadas con N1E6E7 y N1MOCK, mostrando un aumento de IL-2 en las células transfectadas con los oncogenes desde las 42 hasta las 56 horas. En la gráfica **B)**, se analizaron las concentraciones de IL-2 en los sobrenadantes de células C-33A sin transfectar y transfectadas con SBE6E7 y SBMOCK, evidenciándose un aumento de IL-2 en las células transfectadas con los oncogenes desde las 42 hasta las 72 horas. En la gráfica **C)**, se evaluaron las concentraciones de IL-2 en los sobrenadantes de las células SBE6E7 y N1E6E7 desde las 24 hasta las 72 horas de cultivo, comparándolas con Jurkat a las 24 horas y CaSki a las 24 y 42 horas de cultivo. Se observó que CaSki presentó la mayor concentración de IL-2 a las 42 horas.

Objetivo 3: Analizar la presencia del receptor de IL-2 en células control y las células transfectadas:

En la detección de los mRNAs de las cadenas que componen al receptor se realizó la RT-PCR para el transcrito de CD25 que corresponde a la cadena alfa, a las 24 hrs. de cultivo, en el cual se observó una disminución de transcrito en las células transfectadas con N1E6E7 con respecto a las células N1MOCK, además en las células SBE6E7 se observa una disminución mayor con respecto al MOCK. En CaSki se observa una banda más prominente (Figura 13). Se observó diferencias en el transcrito de CD25 en los dos sistemas por lo que se realizó RT-PCR para comparar las cantidades de transcrito en los dos sistemas (Figura 13A) y se observó una mayor cantidad de mRNA en las células SBE6E7 al comparar con las células N1E6E7. Estos datos son consistentes con la disminución del mRNA de IL-2 en presencia de los oncogenes E6/E7 de VPH-16.

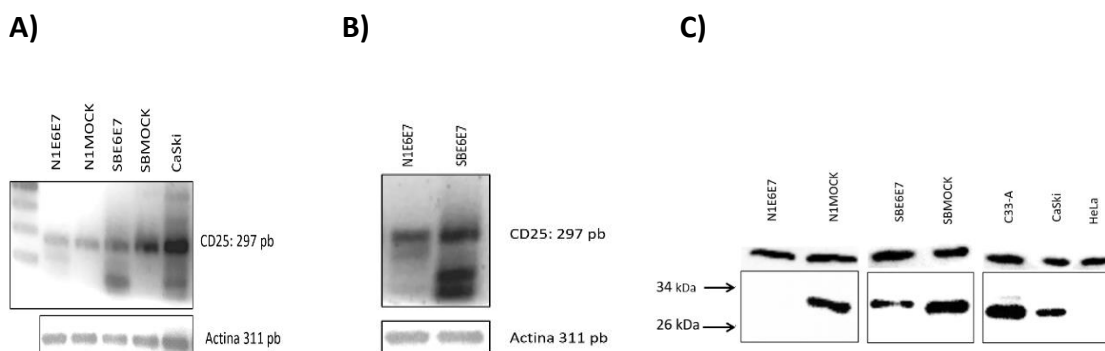


Figura 11. Expresión del mRNA de CD25 en células transfectadas y CaSki

A) RT-PCR de CD25 a las 24 hrs. de cultivo. Se observa una aparente disminución del mRNA en las células N1E6E7 con respecto a las células N1MOCK. En CaSki se detecta mayor cantidad de transcrito que en las células transfectadas con el MOCK. **B)** Expresión de mRNA de CD25 en las células transfectadas con los oncogenes: Se observan una mayor presencia de CD25 con las células transfectadas con SBE6E7 en comparación con las células transfectadas con N1E6E7, además se observan bandas adicionales de menor tamaño en las células transfectadas con el bicistron y en CaSki. **C)** Expresión de la proteína CD25, Western blot de C-33A, C-33A transfectadas con los dos sistemas, CaSki y HeLa. Se detecta una disminución de la proteína CD25 en las células N1E6E7 con respecto a N1MOCK y en las células SBE6E7 también se observa una disminución con respecto a

las células SBMOCK. En CaSki también está presente la proteína, y en HeLa no es detectada. La extracción de proteína total se realizó a las 24 horas de cultivo con RIPA.

En la detección de la proteína (Figura 11C), se registró una banda de aproximadamente 30 kDa, en las células transfectadas con N1E6E7, no se detectó la banda, a diferencia de las células N1MOCK en donde si se detectó la banda, en el sistema SB, también se detectó una disminución en la proteína de CD25 en las células SBE6E7 con respecto al MOCK. En CaSki también se detectó la proteína, a diferencia de células HeLa en donde no se detectó (Figura 11C). Estos datos siguieren un efecto negativo de los oncogenes E6/E7 de VPH-16 en los niveles del mRNA y proteína de CDC25.

La presencia de la cadena Beta en las células transfectadas se determinó por RT-PCR (Figura 12A), y se detectó un aumento en las células que poseen en los oncogenes en SBE6E7 y N1E6E7, comparados con su respectivo Mock. En células CaSki se determinó que está presente el transcrito de CD122 y de forma más abundante que en todas las células transfectadas. Posteriormente se buscó conocer la expresión de la proteína de CD122 en estas células a través de Western blot (Figura 12B), y lo que encontramos es que interesantemente, también se observa una disminución en la proteína de las células que poseen los oncogenes de VPH-16. Siendo las células SBE6E7 las que presentan una mayor disminución en los dos sistemas, y su expresión se asemeja a la expresión de CD122 en células CaSki.

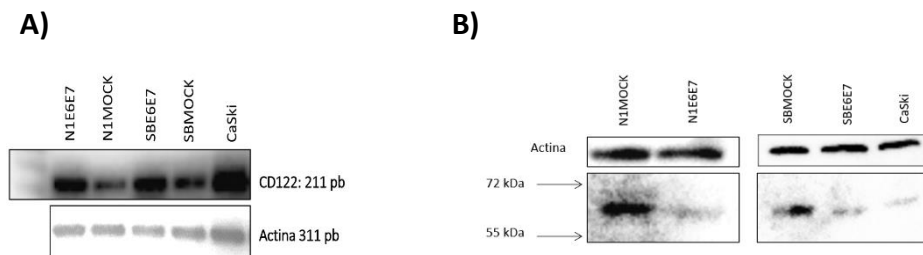


Figura 12. Expresión de CD122 en células transfectadas y CaSki

A) Expresión del mRNA de CD122 Se observa un aumento del mRNA en N1E6E7 en comparación con N1MOCK. De igual manera en el sistema SB, en donde se detecta aumento en las células que poseen los oncogenes. **B)** Western blot de células transfectadas y CaSki a las 24 hrs. de cultivo. Se observa una disminución aparente de

la proteína en las células transfectadas con los oncogenes, en SBE6E7 la disminución con respecto al SBMOCK es más evidente, en C-33A se detecta una mayor cantidad en comparación con CaSki.

En la determinación de la presencia de la cadena gama (CD132) del receptor de IL-2, se realizó RT-PCR para conocer si estaba presente en las células, sin embargo, hemos tenido problemas en la amplificación del transcrito. Quizás sus niveles de transcrito son bajos o de vida media muy corta, deberemos realizar experimentos a diferentes tiempos de cultivo en el futuro, por lo que no se obtuvo una imagen. Por lo contrario, a nivel proteínas utilizando un anticuerpo monoclonal en los ensayos de western blot (Figura 13), y se reconoció la banda con el peso esperado (43 kDa) para la proteína CD132. En células transfectadas con N1E6E7 no detectamos diferencias con respecto al mock, lo mismo para las células SBE6E7. El ensayo se hizo con extracción de proteína a las 24 de cultivo en las células transfectadas en los 2 sistemas. Sin embargo, es necesario más experimentos a diferentes tiempos de cultivo para tener más claro cuál es el tiempo de expresión máxima de estas proteínas y sus mRNAs, para todos los componentes del receptor de IL-2. Finalmente, los oncogenes E6/E7 de VPH-16 parecen ejercer un efecto negativo sobre los niveles de los transcritos de IL-2, CDC25, CD122, y algo similar sucede con los niveles de proteínas, sin embargo, dado que IL-2 aumenta su secreción en presencia de los oncogenes, en el futuro, deberá descartarse que las proteínas de CD25 y CD122 un sufran procesamiento en presencia de los oncogenes y también sean secretadas al medio de cultivo.

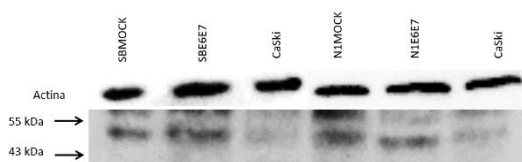


Figura 13. Expresión de la proteína CD132, en las células transfectadas y CaSki

Se observa una disminución aparente de la proteína en las células transfectadas con el bicistron, en SBE6E7 la disminución con respecto al SBMOCK es más evidente, en C-33A se detecta una mayor cantidad en comparación con CaSki. La extracción de proteína total se realizó a las 24 horas de cultivo.

Discusión

El objetivo de este proyecto fue investigar cómo los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 afectan la expresión de IL-2, una citocina que como mencionamos anteriormente, ha sido descrita como un posible blanco terapéutico, debido a su participación en la progresión de ciertos tipos de cáncer como son cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de mama y CaCu (Chen et al., 2020; Rangel-Corona et al., 2010). La presencia de las citocinas en tumores puede deberse a la infiltración de macrófagos y otras células del sistema inmunológico en el tejido maligno, lo cual con anterioridad se creía mejoraba el pronóstico del paciente; en la actualidad se ha descrito que las células malignas pueden regular positivamente la infiltración de macrófagos, pero esto favorece la progresión del tumor. Se ha estudiado el papel de IL-2 citocinas en CaCu, pero en solo en líneas celulares positivas a VPH-18. En algunos trabajos de investigación se han utilizado solo líneas celulares de CaCu positivas a VPH-18 como son CaLo, INBL y HeLa. por lo que es importante conocer que ocurre en el caso de la expresión de la IL-2 en CaCu que contienen el tipo viral con mayor incidencia el VPH-16, así como, en alguna línea celular negativa a VPH.

Para este estudio, se empleó la línea celular C-33A, una línea de cáncer cervicouterino negativa para VPH y conocida por su expresión del transcrito para IL-2, tanto en la literatura científica como en nuestro laboratorio.

Para analizar el impacto de los oncogenes de VPH-16 en la regulación de IL-2, se utilizaron células C-33A transfectadas con los oncogenes E6/E7, mediante dos sistemas de expresión diferentes. El sistema pEGFP-N1 (N1) y el vector *sleeping Beauty* (SB). Estos sistemas presentan 2 escenarios interesantes porque los promotores que dirigen la expresión de los oncogenes tienen una fuerza diferente, siendo el vector *sleeping beauty* el de expresión más fuerte. Para el sistema N1, donde se observó mediante citometría de flujo (Figura 6) que aproximadamente el 70-78% de las células de la población mostraban fluorescencia debido a la presencia de la proteína GFP, lo que indirectamente nos indica una tasa de transfección superior al 70%. En el sistema SB, aunque el porcentaje de transfección es similar, es importante señalar que los 2 sistemas difieren en su composición. Mientras que en el

sistema N1 la proteína E7 está fusionada a la GFP, lo que proporciona una indicación proporcional de la cantidad de oncoproteína E7 producida en las células, en el SB la expresión de GFP es dirigida por un promotor independiente al de los oncogenes. Los resultados de este estudio podrían proporcionar información valiosa sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre los oncogenes del VPH y la expresión de IL-2, lo que podría contribuir a un mayor entendimiento de su papel en la progresión del cáncer cervical o abrir nuevas posibilidades terapéuticas dirigidas a la regulación de expresión de IL-2 en este contexto.

Con esto en mente, el siguiente paso fue verificar la presencia de los transcritos de los oncogenes en ambas transfectantes, mediante RT-PCR tiempo final para el bicistron E6/E7. Se observaron los 3 transcritos, productos del splicing alternativo del bicistron. Las cantidades de los transcritos varían entre las células transfectadas, pero el sistema SBE6/E7, se asemejan más lo observado en las células CaSki, mientras que las células transfectadas con N1E6/E7 presentan una menor cantidad de transcrito. Para verificar si las cantidades de transcrito eran tan diferentes, se decidió realizar RT-PCR específicamente para el oncogén E7 (ver Figura 7B). Esto confirmó de manera más clara que los sistemas presentan una expresión exógena muy diferente de las oncoproteínas.

En experimentos previos en nuestro laboratorio se detectó el transcrito de IL-2 en células en las células C33-A, pero no se detectó en células CaSki después de 48 horas de cultivo. Por lo tanto, se verifico este dato y el resultado mostro la amplificación del transcrito de IL-2 en células C-33A y no fue detectado. Posteriormente, se realizó análisis de RT-PCR para determinar la presencia de IL-2 en C-33A transfectadas con los oncogenes de E6/E7, pero solo se detectó en las células control transfectadas con los vectores N1 o SB, pero no se detectó el transcrito de IL-2 en las células con presencia de los oncogenes, con ninguno de los 2 vectores. La disminución aparente del transcrito de IL-2 en las células transfectadas con los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 sugiere que estos genes podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio en la producción o en la disminución la vida media del transcrito, lo cual está respaldado por los antecedentes (Hua et al., 1993). No descartamos que la falta de

detección del transcrito sea una limitación de la técnica de PCR de punto final debido a su baja sensibilidad o que el transcrito pueda ser detectado en etapas más tempranas del cultivo. En cuanto a la producción de la proteína interleucina 2 se analizó en extractos proteicos totales, mediante la técnica de *Western blot* (WB). El resultado mostro una disminución de la proteína de IL-2, en las células que poseen el bicistron E6/E7, comparadas con su respectivo *mock*. Interesantemente, en los extractos de proteína obtenidos de las células CaSki se observó en alta cantidad de IL-2, a pesar de que no se detectó su mRNA.

La IL-2 juega un papel crucial en la activación y proliferación de células T, y es esencial en la respuesta inmunológica contra infecciones y células tumorales. Por lo tanto, la inhibición de su expresión podría tener un impacto significativo en la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y eliminar células infectadas o transformadas. Además, la presencia de IL-2 en las células C33-A y CaSki indica que podría utilizarse como factor de crecimiento en células malignas, aunque su nivel de mRNA es diferente si se compara una célula libre de VPH como C-33A y otra positiva para VPH-16 como CaSki.

Cabe destacar que para la proteína IL-2 no se observó el peso molecular esperado (18 kDa). El anticuerpo monoclonal se unió a una banda con un peso molecular entre 43 y 55 kDa, lo cual concuerda con reportes de anticuerpos comerciales que indican cambios en el peso de IL-2 en líneas celulares cancerosas, presentando variantes con pesos similares a los que encontramos en diferentes líneas celulares, pero solo al utilizar brefeldina, un inhibidor de la glicosilación, se logró identificar la banda de 18 kDa.

En la literatura se ha reportado que el cáncer cervical aumenta la glicosilación de proteínas importantes en la transformación y progresión del cáncer, como un mecanismo de inhibición de la función de proteínas o como estabilizador de las proteínas, es decir para aumentar su vida media y prolongar las vías de activación (Xu et al., 2021). El hallazgo de diferentes posibles variantes de peso molecular para IL-2 en células cancerosas y su relación con la alteración de glicosilación en el cáncer cervical, abre puertas para futura investigación sobre los mecanismos de regulación alterados en cáncer para la expresión de algunas citocinas por la célula tumoral, como es el caso de IL-2. Por ejemplo, en su artículo, el Dr. Zhiwei Xu

demonstró que los inhibidores químicos de la O-GlcNAcilación inhiben la transformación maligna mediada por las oncoproteínas del VPH, ya que la O-GlcNAcilación del factor nuclear κ B (NF- κ B) aumenta la progresión del cáncer. Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH pueden modificar la expresión de fucosiltransferasa o manosidasa, la maquinaria responsable de la conformación de diferentes estructuras involucradas en la transformación maligna del cáncer de cuello uterino a través de diferentes mecanismos.

Para conocer los niveles de IL-2 en el sobrenadante de las células, se realizó un ensayo tipo ELISA para IL-2 (Figura 10) utilizando un anticuerpo monoclonal diferente al utilizado en el *Western blot*. Esto confirmó la presencia de IL-2 en estas células, y además se encontró que las células transfectadas con el sistema SB mostraron mayor cantidad de IL-2 en comparación con las células control transfectadas con el *mock*. Ambos sistemas de transfección con los oncogenes mostraron un aumento significativo de la secreción de IL-2 a partir de las 42 horas. Este hallazgo sugiere que la expresión de los oncogenes E6/E7 podría estar modulando de manera positiva la secreción de IL-2, lo que podría tener implicaciones en la respuesta inmunológica contra el VPH-16. Sería interesante profundizar en los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión y secreción de IL-2 y su posible interacción con las vías metabólicas alteradas por los oncogenes E6 y E7.

La comparación con la célula control Jurkat activada con el anticuerpo CD3/CD28 (activa el TCR) , mostro que las células CaSki presentaron aparentemente niveles más elevados de IL-2, en condiciones de cultivo normales y sin ningún tipo de activación.

El tercer objetivo de este estudio es conocer la expresión de las cadenas del receptor, ya que su presencia está directamente implicada en la cantidad y funcionalidad de IL-2, la cual se sabe que tiene una retroalimentación positiva a través de las vías de señalización que activan la transcripción del gen IL-2 y otros genes blancos como CD25, la subunidad del receptor responsable de la alta afinidad. Además, CD25 tiene funciones intrínsecas en el sobrenadante, funcionando como un inhibidor de la unión de IL-2 con el receptor cuando CD25 es cortado (Damoiseaux, 2020). Similarmente con lo observado para IL-2 los ensayos de RT-PCR para CD25, mostraron una disminución del transcrito en las células transfectadas

con el bicistron. Intrigantemente, la banda de CD25 fue más abundante en células CaSki comparado con C-33A. A nivel de proteína CD25 también mostro una disminución aparente en las células que poseen el bicistron.

En la RT-PCR para la cadena beta (CD122) (Figura 12A), se observó un aumento del transcrito en las células que poseen el bicistron en ambos sistemas. Nuevamente, CaSki presentó mayores cantidades relativas del transcrito de CD122 en comparación con C-33A. Sin embargo, a nivel de proteína (Figura 12B), se encontró que hay una disminución en las células que poseen el bicistron. Interesantemente también se observó baja expresión de proteína en las células CaSki. Es importante mencionar que en HeLa no se detectó la subunidad beta a nivel de proteína, lo cual está respaldado por investigaciones previas (De Oca B. et al., 2010), donde se menciona que HeLa no expresa el receptor de IL-2 y, por lo tanto, no produce la proteína CD122.

En el caso de CD132 (Figura 13), los transcritos observados son tenues en el gel de agarosa, pero no se aprecian en fotografía, por lo que deberá mejorarse este ensayo. Aunque sí observamos el transcrito en CaSki y HeLa. En cuanto a la proteína CD132 se encontró presente en todas las células transfectadas, control y con los oncogenes, pero sin diferencia aparente. Notablemente su expresión fue baja en células CaSki. Sin embargo, la cadena gama, también conocida como cadena común, puede estar presente en las células, pero no formar parte del receptor de IL-2, ya que también es compartida por el receptor de otras citocinas.

Conclusión

Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 parecen ejercer un efecto negativo sobre los niveles de los transcritos de IL-2y CDC25 pero un aumento del transcrito de CD122, mientras que los niveles de proteínas de IL-2, CD2y CD122 se afectan negativamente, sin embargo, dado que IL-2 aumenta su *shedding* (“secreción”) en presencia de los oncogenes; en el futuro, deberá descartarse que las proteínas de CD25 y CD122 un sufran procesamiento en presencia de los oncogenes y también sean secretadas al medio de cultivo.

Perspectivas

- 1) Determinar la presencia de IL-2 en la membrana celular mediante Citometría de flujo.
- 2) Investigar la localización de IL-2 y su posible unión a su receptor mediante inmunofluorescencia.
- 3) Identificar la presencia del receptor en las membranas de las células sin transfectar y transfectadas utilizando Citometría de flujo.
- 4) Realizar ensayos de inhibición de glicosilación para comprobar glicosilaciones en la IL-2 y/o su receptor en cáncer.
- 5) Realizar un ensayo para conocer la vida media del transcrito de IL-2
- 6) Ensayo de proliferación con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) utilizando IL-2 en el cultivo
- 7) Ensayo funcional para IL-2 usando células CTLL2 (dependientes de IL-2) y los sobrenadados de cultivo de C-33A, C-33-A transfectadas, CaSki y HeLa.

Bibliografia

- Abbas, A. K. (2020). The Surprising Story of IL-2: From Experimental Models to Clinical Application. *The American Journal of Pathology*, 190(9), 1776–1781. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.05.007>
- Arbyn, M., Tommasino, M., Depuydt, C., & Dillner, J. (2014). Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? *The Journal of Pathology*, 234(4), 431–435. <https://doi.org/10.1002/PATH.4424>
- Balaji, H., Demers, I., Wuerdemann, N., Schrijnder, J., Kremer, B., Klussmann, J. P., Huebbers, C. U., & Speel, E. J. M. (2021). Causes and Consequences of HPV Integration in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: State of the Art. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 4089, 13(16), 4089. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13164089>
- Barillari, G., Bei, R., Manzari, V., & Modesti, A. (2021). Infection by High-Risk Human Papillomaviruses, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Squamous Pre-Malignant or Malignant Lesions of the Uterine Cervix: A Series of Chained Events? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS222413543>
- Brianti, P., de Flammineis, E., & Mercuri, S. R. (n.d.). *Review of HPV-related diseases and cancers*.
- Cancer, I. A. for R. on. (2012). Biological agents. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*.
- Chargari, C., Arbyn, M., Leary, A., Abu-Rustum, N. R., Basu, P., Bray, F., Chopra, S., Nout, R., Tanderup, K., Viswanathan, A. N., Zacharopoulou, C., Soria, J. C., Deutsch, E., Gouy, S., & Morice, P. (2022). Increasing global accessibility to high-level treatments for cervical cancers. *Gynecologic Oncology*, 164(1), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.10.073>
- Chen, K., Satlof, L., Stoffels, G., Kothapalli, U., Ziluck, N., Lema, M., Poretsky, L., & Avtanski, D. (2020). Cytokine secretion in breast cancer cells – MILLIPLEX assay data. *Data in Brief*, 28, 104798. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2019.104798>
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Aguado, T., & Franceschi, S. (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 89(1), 101. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6601024>
- Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, 393(10167), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
- De Oca B., P. M., Malardé, V., Proust, R., Dautry-Varsat, A., & Gesbert, F. (2010). Ectodomain shedding of interleukin-2 receptor β and generation of an intracellular functional fragment. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22050–22058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.093088>
- della Fera, A. N., Warburton, A., Coursey, T. L., Khurana, S., & McBride, A. A. (2021). Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 321, 13(2), 321. <https://doi.org/10.3390/V13020321>

- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, *30*(SUPPL.5), F55–F70. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.06.083>
- Doorbar, J., Zheng, K., Aiyenuro, A., Yin, W., Walker, C. M., Chen, Y., Egawa, N., & Griffin, H. M. (2021). Principles of epithelial homeostasis control during persistent human papillomavirus infection and its deregulation at the cervical transformation zone. *Current Opinion in Virology*, *51*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.09.014>
- Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., & Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* *2005* *4*:1, *4*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-4-38>
- Dunne, E. F., & Markowitz, L. E. (2006). Genital human papillomavirus infection. *Clinical Infectious Diseases*, *43*(5), 624–629. <https://doi.org/10.1086/505982/2/43-5-624-TBL001.GIF>
- Einstein, M. H., Schiller, J. T., Viscidi, R. P., Strickler, H. D., Coursaget, P., Tan, T., Halsey, N., & Jenkins, D. (2009). Clinician’s guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *The Lancet Infectious Diseases*, *9*(6), 347–356. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70108-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70108-2)
- Fan, M. Y., Low, J. S., Tanimine, N., Finn, K. K., Priyadharshini, B., Germana, S. K., Kaech, S. M., & Turka, L. A. (2018). Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs. *Cell Reports*, *25*(5), 1204-1213.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.002>
- Gaffen, S. L. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, *14*(2), 63–77. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0862>
- Giannini, S. L., Al-Saleh, W., Piron, H., Jacobs, N., Doyen, J., Boniver, J., & Delvenne, P. (1998). Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clinical and Experimental Immunology*, *113*(2), 183. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2249.1998.00639.X>
- Hussain, S. S., Lundine, D., Leeman, J. E., & Higginson, D. S. (2021). Genomic Signatures in HPV-Associated Tumors. *Viruses* *2021*, Vol. *13*, Page *1998*, *13*(10), 1998. <https://doi.org/10.3390/V13101998>
- Jenkins, D. (2007). Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease Markers*, *23*(4), 199–212. <https://doi.org/10.1155/2007/874795>
- Kajitani, N., & Schwartz, S. (2022). The role of RNA-binding proteins in the processing of mRNAs produced by carcinogenic papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2022.02.014>
- Kaynarcalidan, O., & Oğuzoğlu, T. Ç. (2021). The oncogenic pathways of papillomaviruses. *Veterinary and Comparative Oncology*, *19*(1), 7–16. <https://doi.org/10.1111/VCO.12659>
- Kowarz, E., Löscher, D., & Marschalek, R. (2015). Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnology Journal*, *10*(4), 647–653. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201400821>

- LiVolsi, V. A. (2002). Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 5th ed. *Human Pathology*, 33(11), 1149. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(02\)70046-4](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(02)70046-4)
- Miinger, K., & Phelps, W. C. (1993). The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. In *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Muñoz, N., Kjaer, S. K., Sigurdsson, K., Iversen, O.-E., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Brown, D. R., Koutsky, L. A., Tay, E. H., Garcia, P. J., Ault, K. A., Garland, S. M., Leodolter, S., Olsson, S.-E., Tang, G. W. K., Ferris, D. G., Paavonen, J., Steben, M., ... Haupt, R. M. (2010). Impact of Human Papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 Vaccine on All HPV-Associated Genital Diseases in Young Women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(5), 325–339. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp534>
- Narisawa-Saito, M., & Kiyono, T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Science*, 98(10), 1505–1511. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2007.00546.X>
- Papillion, A., Powell, M. D., Chisolm, D. A., Bachus, H., Fuller, M. J., Weinmann, A. S., Villarino, A., O'Shea, J. J., León, B., Oestreich, K. J., & Ballesteros-Tato, A. (2019). Inhibition of IL-2 responsiveness by IL-6 is required for the generation of GC-TFH cells. *Science Immunology*, 4(39). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAW7636>
- Paradkar, P. H., Joshi, J. V., Mertia, P. N., Agashe, S. V., & Vaidya, R. A. (2014a). Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 15(9), 3851–3864. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.9.3851>
- Paradkar, P. H., Joshi, J. V., Mertia, P. N., Agashe, S. V., & Vaidya, R. A. (2014b). Role of cytokines in genesis, progression and prognosis of cervical cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 15(9), 3851–3864. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.9.3851>
- Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C. F., & Weiss-Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, 50(3), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.013>
- Rosalia, R. A., Arenas-Ramirez, N., Bouchaud, G., Raeber, M. E., & Boyman, O. (2014). Use of enhanced interleukin-2 formulations for improved immunotherapy against cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*, 23, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.006>
- Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Immunol-042617-053352>, 36, 411–433. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053352>
- Salcedo, M., Pina-Sanchez, P., Vallejo-Ruiz, V., Monroy-Garcia, A., Aguilar-Lemarroy, A., Cortes-Gutierrez, E. I., Santos-Lopez, G., Montoya-Fuentes, H., Grijalva, R., Madrid-Marina, V., Apresa-Garcia, T., Hernandez, D. M., Jave-Suarez, L. F., Romero, P., Poot, A., Salgado, E., Ramos-Gonzalez, P., Gonzalez-Hernandez, R., Canton, J. C., ... Grijalva, I. (2015). Human Papillomavirus Genotypes among Females in Mexico: a Study from the Mexican Institute for Social Security.

Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(23), 10061–10066.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10061>

Saranath, D., Khan, Z., Tandle, A. T., Dedhia, P., Sharma, B., Contractor, R., Shrivastava, S., & Dinshaw, K. (2002). HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. *Gynecologic Oncology*, 86(2), 157–162.
<https://doi.org/10.1006/GYNO.2002.6735>

Schwartz, S. (2013). Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. *Virology*, 445(1–2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.034>

Stanley, M. A., & Sterling, J. C. (2014). Host Responses to Infection with Human Papillomavirus. In *Current problems in dermatology* (Vol. 45, pp. 58–74). S. Karger AG.
<https://doi.org/10.1159/000355964>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>

van Gerwen, O. T., Muzny, C. A., & Marrazzo, J. M. (2022). Sexually transmitted infections and female reproductive health. *Nature Microbiology*, 7(8), 1116–1126. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01177-x>

Wang, X., Huang, X., & Zhang, Y. (2018). Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02896>

Yang, E. J., Quick, M. C., Hanamornroongruang, S., Lai, K., Doyle, L. A., McKeon, F. D., Xian, W., Crum, C. P., & Herfs, M. (2015). Microanatomy of the cervical and anorectal squamocolumnar junctions: a proposed model for anatomical differences in HPV-related cancer risk. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 28(7), 994–1000. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.54>