

IMPACTO DEL EMPLEO DEL INTERFERÓN ALFA COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO EN EL CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Silvio E Perea,¹ Omar López Ocejo,¹ Rolando García Milián,¹ Manuel J Araña,¹
Pedro López-Saura¹ y María de los Ángeles Ríos²

¹Departamento de Biología Celular, División de Farmacéuticos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, Ciudad de La Habana.

²Departamento de Biología, División de Investigaciones. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Ciudad de La Habana.

Introducción

El virus papiloma humano (VPH) perteneciente a la familia Papovaviridae, constituye un grupo heterogéneo de virus de ADN de doble cadena que infecta las células de la capa basal del epitelio y se replica y expresa en estrecha coordinación con el programa de diferenciación del mismo. Entre las lesiones más comunes en humanos figuran la papilomatosis laríngea, el condiloma acuminado y cervical, las verrugas vulgares y plantares, las displasias anogenitales y los carcinomas.

En estudios epidemiológicos realizados por diferentes grupos en el mundo, ha sido posible la identificación de la presencia del ADN viral en tumores de localizaciones que incluyen el cérvix uterino, vulva, laringe, próstata y pulmón, entre otras. Así, el VPH es considerado agente etiológico del cáncer del tracto genital.

El cáncer cervical uterino es la segunda causa de muerte entre las mujeres de todo el mundo. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América ocurren cada año 13 000 nuevos casos de cáncer de cérvix y 4 500 muertes por esta enfermedad. En países subdesarrollados como México, Perú y otros de América Latina, estas neoplasias constituyen un gran problema de salud actual y se convierten en la primera causa de muerte entre mujeres por cáncer.

El desarrollo del cáncer de origen epitelial a causa de la infección mantenida por VPH constituye un proceso que, después de una larga latencia, pasa a un estadio pre-maligno, conocido como neoplasia intraepitelial en el cual se experimentan cambios fenotípicos de las células infectadas y, finalmente, la lesión evoluciona a carcinoma *in situ*.

Durante muchos años, el tratamiento convencional de cáncer invasivo del cérvix uterino ha sido llevado a cabo mediante cirugía, radiación o ambas. La quimioterapia ha sido sólo restringida a aquellos pacientes con enfermedad avanzada que no admiten ningún otro tratamiento. Recientemente, se han usado diferentes agentes en combinación con la radioterapia en intentos de potenciar los efectos de las radiaciones y reducir la incidencia de recurrencias. De esta forma, se han reportado estudios de

fase II usando mitomycin C y 5-fluorouracilo en combinación con radiación para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, así como también la adriamicina y el bleomicin. Por su parte, en estudios de fase III, el efecto radiosensibilizador del cisplatino y la hidroxiurea, han sido también demostrados en el tratamiento de estas neoplasias. Sin embargo, no ha existido una evidencia clara que demuestre que la quimioterapia pudiera resultar beneficiosa en el mejoramiento de la calidad de vida e incremento de la sobrevida de pacientes con cáncer de cérvix. Así, la carencia de un impacto de la quimioterapia en la sobrevida y las muertes anualmente producidas en todo el mundo en mujeres con cáncer de cérvix uterino, indican la necesidad urgente de una terapia más efectiva para esta enfermedad.

El interferón (IFN) alfa ha sido usado con eficacia en el tratamiento de enfermedades asociadas al VPH, como condiloma acuminado, neoplasia intraepitelial cervical y papilomatosis laríngea. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales el IFN pudiera producir la regresión de las lesiones asociadas a los VPHs aún no han sido esclarecidos.

En el caso particular de la neoplasia intraepitelial cervical, el tratamiento con IFN ha sido introducido en la última década. Aunque la terapéutica más usada en la actualidad para este tipo de lesión asociada a la infección por VPH, consiste en la conización y la excisión diatérmica de la zona transformada. Otros métodos usados en el mundo para el tratamiento de estas entidades premalignas han sido la criocirugía y electrocirugía. Sin embargo, la mayor desventaja de los tratamientos que conllevan cirugía es que generalmente se requiere de personal especializado para su ejecución y en ocasiones equipamientos caros. Además, implican la hospitalización del paciente, uso de anestesia y a veces de tales métodos que producen un sangramiento prolongado y trastornos en la fertilidad futura de la paciente debido a la incompetencia del útero o estenosis.

Los IFNs, desde su descubrimiento en 1957, han sido considerados como citocinas que ejercen funciones paracrinias, que incluyen el establecimiento

Selección de los trabajos premiados por la Academia de Ciencias de Cuba como los resultados científicos más relevantes de 1996.

Selection of papers awarded by the Cuban Academy of Sciences as the most relevant scientific results of 1996.

de un estado antiviral mediante la supresión de la replicación y/o expresión de diferentes virus, efecto antimitótico, e inmunomodulador.

Sobre la base de los antecedentes señalados, en este trabajo nos propusimos evaluar la efectividad del IFN alfa como regulador de la expresión genética del VPH en el cáncer cervico-uterino mediante el uso de aproximaciones de oncología experimental, así como la evaluación en ensayos clínicos de eficacia.

Los objetivos fundamentales de este trabajo son:

1. Evaluar el efecto del tratamiento a largo plazo con IFNs tipo alfa sobre el fenotipo maligno de células de adenocarcinoma de cervix (HeLa), así como sobre la expresión del VPH 18.

2. Evaluar el efecto a corto plazo del IFN alfa sobre la expresión del VPH 18 en células HeLa, profundizando así en el mecanismo molecular de regulación de la expresión viral por la citocina.

3. Demostrar en un ensayo de eficacia el efecto *in vivo* de la terapia con IFN alfa sobre los niveles de expresión de algún tipo de VPH oncogénico en pacientes con cáncer cervico-uterino invasivo asociado a estos virus.

4. Demostrar la eficacia del tratamiento del condiloma cervical con IFN alfa 2b tóxico.

Efecto del tratamiento a largo plazo con IFN alfa sobre el fenotipo maligno de células HeLa

Para el estudio del efecto del tratamiento prolongado con IFN alfa en cultivo, usando como modelo las células HeLa (adenocarcinoma cervico-uterino que expresan VPH 18), se analizaron diferentes parámetros fenotípicos de la célula maligna al cabo de los 41 días de tratamiento crónico con las preparaciones de IFN alfa leucocitario y alfa 2b recombinante. El análisis del parámetro de tumorigenicidad se siguió hasta un año después del tratamiento.

Expresión del VPH 18 y de la enzima 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2-5 A)

Los resultados de las experiencias de Northern Blots demostraron que ambas preparaciones de IFN alfa redujeron considerablemente los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) viral después de 41 días de tratamiento, con respecto a las células que sólo recibieron medio de cultivo. El IFN alfa leucocitario fue más selectivo que el IFN alfa 2b, en términos de regulación de la expresión viral. Paralelamente, se detectaron niveles incrementados de ARNm de la 2-5 A sintetasa en las células tratadas con IFN respecto a las no tratadas. Debido a que esta enzima ha sido considerada como un marcador de respuesta al IFN, su incremento en nuestras condiciones experimentales fue indicativo de una acción eficaz de ambas preparaciones de IFN en el modelo empleado.

Clonogenicidad en medio semisólido y tumorigenicidad en ratones atímicos

Entre los parámetros asociados con el fenotipo tumoral, se determinó la capacidad de las células expuestas al IFN de formar colonias en medio agar después de los 2, 7 y 41 días de tratamiento, así como la capacidad de generar tumores en animales inmunosuprimidos a los 41 días de exposición de las células a los IFNs alfa.

Los resultados indicaron que el tratamiento de las células HeLa durante 2 y 7 días no modificó la clonogenicidad de éstas, mientras que en el caso en que el tratamiento con ambas preparaciones de IFN alfa fue prolongado hasta 41 días, se observó una reducción significativa del número de colonias formadas en el medio agar. Estas evidencias denotan que este rasgo fenotípico de la célula maligna es modificado por el tratamiento a largo plazo con IFN y que, además, es posterior a la inhibición del virus por la citocina.

Estudios morfológicos

Se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para evaluar cambios morfológicos y se determinó el índice mitótico como rasgo particular del fenotipo maligno de las células.

Los resultados experimentales demostraron una reducción del índice mitótico en las células tratadas con ambas preparaciones de INF respecto a las células controles. Adicionalmente, se observaron cambios fenotípicos notables inducidos por el tratamiento durante 41 días con IFNs alfa, los cuales incluyeron la disminución del pleomorfismo celular y de células gigantes multinucleadas (Figura 1). Ambos parámetros demuestran cambios fenotípicos inducidos por la exposición crónica de estas células a los IFNs alfa.

Tumorigenicidad de células HeLa tratadas durante un año con IFNs alfa

Debido a que las células expuestas durante 41 días con IFNs alfa no produjeron modificación en la capacidad de generar tumores en animales atímicos, este ensayo se reintentó después de haber tratado las células crónicamente con IFN durante un año. Los resultados de estas experiencias demostraron que las células expuestas durante ese tiempo perdieron la capacidad tomorigénica (Tabla 1). Así, en estas condiciones, parecen modificarse otros parámetros claves relacionados con el fenotipo tumorigénico de la célula, los cuales no fueron cambiados previamente durante el tratamiento.

Tabla 1. Tumorigenicidad de células HeLa tratadas con IFNs alfa durante un año.

Tratamiento	Control	IFN alfa 2b	IFN leucocitario
Prendimiento / Total	6 / 10	0 / 10	0 / 10
%	60	0	0

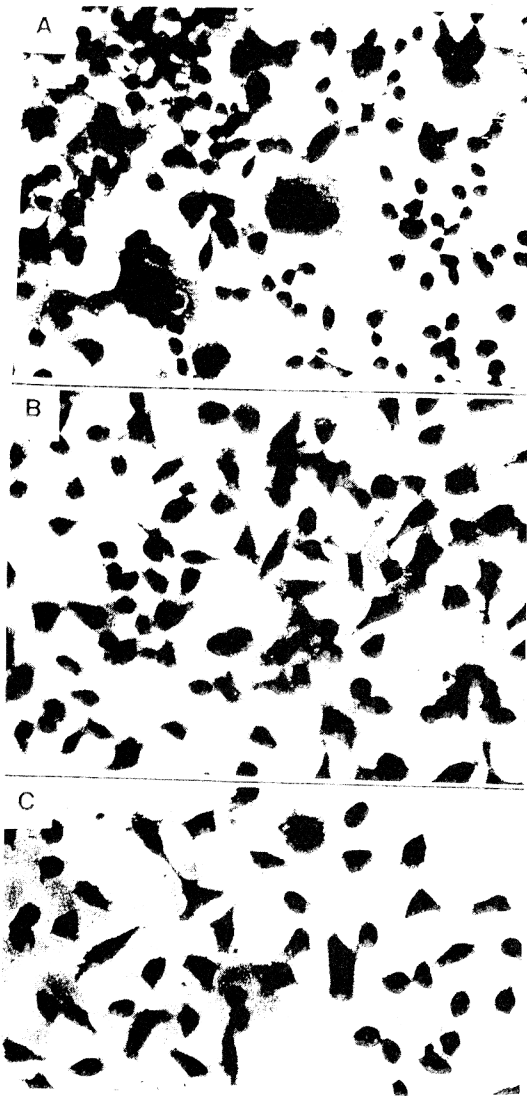


Figura 1. Tinción de células HeLa con hematoxilina-eosina. A) células no tratadas, B) células tratadas con IFN leucocitario y C) células tratadas con IFN alfa 2b recombinante.

Mecanismo molecular de regulación del VPH 18 por IFN alfa

Se investigaron los posibles blancos moleculares del VPH 18 que pudieran ser sensibles a los efectos del IFN alfa. Para ello se usó el mismo modelo de células HeLa y el tratamiento con IFN alfa 2b a corto plazo.

Modulación de los niveles de ARNm del VPH 16 mediada por la terapia con IFN alfa en pacientes con carácter cérvico-uterino

Sobre la base de nuestros hallazgos *in vitro*, el objetivo inmediato fue investigar si la terapéutica con IFN alfa era capaz de modular los niveles de

expresión de ARNm de tipos oncogénicos de VPH *in vivo*. Para esta finalidad, se realizó un ensayo piloto en colaboración con el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (Ciudad de La Habana), en el cual sólo se pretendió evaluar la eficacia de la terapia con IFN alfa en un número reducido de pacientes con carcinoma cervical en términos de regulación de la expresión genética del virus.

Análisis de niveles de ARNm del VPH 16 en pacientes con carcinoma cervical tratados con IFN alfa

En estos estudios, el análisis molecular se realizó a partir de ADN o ARN total obtenido de biopsias de tumores de tres pacientes, tanto al inicio como al final del esquema de tratamiento con IFN alfa.

La presencia de ADN de VPH 16 fue primeramente investigada mediante reacción en cadena de la polimerasa, empleando sondas específicas complementarias a regiones del gen E7 del VPH 16. Los resultados de este análisis mostraron que las biopsias de los tres pacientes contenían secuencias de ADN correspondientes al VPH 16, lo cual está en correspondencia con numerosos reportes epidemiológicos previamente publicados en los cuales se le atribuye a este tipo de virus un importante papel en el desarrollo del carcinoma epitelial.

Conjuntamente con la verificación de la presencia de ADN viral, se analizó el patrón de transcripción de IFN alfa sobre los niveles de ARNm viral. El hecho más impactante de estas experiencias lo constituyó la reducción selectiva de los niveles de ARNm del VPH 16 por el tratamiento con IFN. Este efecto, en términos cuantitativos, representó 67 % de la reducción de la expresión viral en el paciente FMG y un 44 % en el paciente CCB (Figura 2). Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no

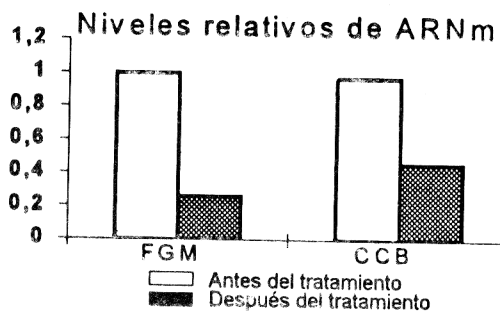


Figura 2. Efecto de la terapia con IFN alfa sobre los niveles de ARNm del VPH 16 en pacientes con cáncer cérvico-uterino. El ARN total de biopsias de tumores y líneas celulares se fraccionó en gels de agarosa al 1 %. El ARN en los gels se transfirió a membranas de nylon (Hybond-N, Amersham, UK), se fijaron mediante exposición a UV y posteriormente las membranas se hibridaron con el ADN del VPH 16 y el ADNc del GAPDH, previamente radiomarcados. Los autoradiogramas del análisis de Northern blot del VPH 16 se analizaron por densitometría, y los valores se normalizaron con respecto a los niveles de transcripción del GAPDH.

existen reportes previos que indiquen un efecto inhibitorio del IFN alfa sobre los niveles de expresión VPH oncogénicos en tumores de pacientes asociados a tales virus.

Discusión

En este trabajo hemos estudiado las acciones producidas por las preparaciones de IFN alfa leucocitario y de origen recombinante sobre células de adenocarcinoma de útero humano (HeLa) expuestas crónicamente a estas citocinas.

Anteriormente, se había reportado que el VPH 18 se encuentra integrado en el genoma de las células HeLa a razón de 20 copias por genoma celular y que expresa ARNm correspondiente a las oncoproteínas E6/E7/E1. En nuestras experiencias de Northern Blots, observamos que los IFNs alfa redujeron considerablemente los niveles de ARNm viral desde las 48 horas de incubación y este efecto fue mantenido a lo largo del estudio. El hecho de que la preparación de IFN alfa leucocitario fuese más eficaz en el efecto inhibitorio sobre la expresión del virus puede deberse a la presencia de los diferentes subtipos de la familia de los IFNs alfa previamente descritos en esta preparación de origen natural y que pudieran cooperar en ese sentido. El hecho de que los cambios fenotípicos se produjeran con posterioridad al evento de inhibición de la expresión viral, es indicativo de que dicha regulación es primaria en el proceso de reversión fenotípica inducida por IFN en estas células y, además, es un evento necesario, pero no suficiente.

Teniendo en cuenta que, después del tratamiento crónico con IFNs alfa, las células HeLa sólo experimentaron una reversión parcial del fenotipo maligno a los 41 días, nosotros continuamos el tratamiento con la citocina en cultivo y analizamos la capacidad tumorigénica al cabo de un año de tratamiento crónico. De manera espectacular, no hubo aparición de masa tumoral en los animales inocula-

dos con las células expuestas durante un año a ambas preparaciones de IFN alfa. Así, se puede concluir que, bajo estas condiciones experimentales, dicha citocina indujo un fenotipo no tumorigénico, probablemente mediante la modulación en el tiempo de otros parámetros relacionados con la tumorigenicidad.

De forma general, el proceso de reversión fenotípica inducida por IFN alfa es un proceso secuencial de múltiples eventos, donde la inhibición del VPH parece ser uno de los eventos moleculares iniciales.

En el modelo de las células HeLa, el IFN alfa parece regular los niveles de VPH 18 a través de la represión de los transcritos virales nacientes, probablemente mediante la represión de promotores celulares más que de promotores virales. Además, parece existir un segundo nivel de control de la maquinaria transcripcional viral por IFN a través del *splicing*. Sin embargo, se deben abordar, en el futuro próximo experiencias adicionales para la confirmación definitiva de este otro nivel de regulación de la expresión viral por IFN.

Los resultados presentados en este trabajo indican que el tratamiento con IFN alfa modula los niveles de expresión del VPH en pacientes con cáncer cervical invasivo asociado con estos virus oncogénicos y así pudiera ser un pre-requisito para la regresión del tumor por la terapia con esta citocina. Sin embargo, debido a que este estudio piloto sólo pretendió evaluar la eficacia del IFN en un número reducido de pacientes en cuanto a los niveles de ARNm viral, se impone la realización de ensayos clínicos de mayor envergadura con el objetivo de confirmar nuestros hallazgos.

Finalmente, las evidencias observadas en esta parte del trabajo, constituyen un elemento de originalidad desde el punto de vista de la primacía y de la perspectiva del empleo del IFN alfa en el cáncer invasivo cervical, en combinación con otras biomoléculas que modulen la expresión viral y/o estimulen la respuesta inmune específica del tumor.