

# La oncoproteína E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH 16) es capaz de inducir resistencia al efecto citostático del IFN- $\alpha_{2b}$

✉ Alejandro Moro,<sup>1</sup> Andrea Calixto,<sup>1</sup> Eduardo Suárez,<sup>2</sup> Manuel de J Araña,<sup>1</sup> Silvio E Perea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, La Habana 10600, Cuba. Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: farma3@cigb.edu.cu <sup>2</sup>Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

## Introducción

Los interferones (IFN) son importantes citoquinas con efectos antiproliferativo, antiviral y de aumento de la respuesta inmune. Debido a estas propiedades, los IFN son utilizados en la terapia de enfermedades virales y no virales. Sin embargo, algunos estudios clínicos demuestran que puede haber recurrencia o ausencia de respuesta con frecuencia. Los mecanismos de esta resistencia no se conocen aún y se especula que la presencia del virus del papiloma humano (VPH) y su interacción con moléculas de señalización inducidas por los IFN, pudieran formar parte de estos mecanismos de resistencia. Aunque se conoce bien la vía de señalización desde los receptores de los IFN hasta el núcleo, aún queda por estudiar la relación entre los factores de transcripción activados, los genes reguladores del ciclo celular y las oncoproteínas.

En este estudio [1] se comparan los efectos del IFN- $\alpha_{2b}$  sobre los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los genes de la  $p27^{Kip1}$  y la 2'-5' Oligoadenilato-sintetasa (2'-5' OAS) en una línea celular sensible (NCI-H82) y otra resistente (H82R). Además, se introdujo la oncoproteína E7 en la línea NCI-H82 y se evaluó la respuesta al IFN- $\alpha_{2b}$  y la inducibilidad de los genes de  $p27^{Kip1}$  y 2'-5' OAS.

Se demostró por primera vez mediante un ensayo antiproliferativo *in vitro* que la oncoproteína E7 es capaz de inducir resistencia al efecto citostático del IFN- $\alpha_{2b}$ . Además, se obtuvo la expresión diferencial del gen regulador del ciclo celular  $p27^{Kip1}$ , cuya expresión fue correlacionada con el fenotipo de respuesta al IFN.

## Resultados y Discusión

### Efecto del IFN- $\alpha_{2b}$ sobre $p27^{Kip1}$ y 2'-5' OAS en las líneas celulares NCI-H82 y H82R

Dos líneas celulares con diferente respuesta al IFN- $\alpha_{2b}$  fueron comparadas para determinar si esta citoquina era capaz de alterar la abundancia del ARNm del gen  $p27^{Kip1}$ . Se llevó a cabo un experimento cinético con muestras tomadas a las 0, 8, 24, 48 y 72 horas posterior a la adición del IFN- $\alpha_{2b}$ . Se aisló el ARN total y se desarrolló una reacción de transcripción reversa, seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los productos de la RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y se obtuvo una imagen digital del patrón de separación. En la línea celular sensible (NCI-H82) se obtuvo que el IFN- $\alpha_{2b}$  induce un aumento en los niveles de ARNm de  $p27^{Kip1}$  a partir de 24 h, con un máximo a las 48 h aproximadamente tres veces superior a los niveles del transcrito en ausencia de IFN- $\alpha_{2b}$ . En ausencia de IFN- $\alpha_{2b}$  no hubo variación en los niveles de  $p27^{Kip1}$ . Este hecho descarta la posibilidad de que la inducción observada se deba a algún factor inespecífico presente en el suero o en el medio de cultivo.

La inducción del gen de la 2'-5' OAS se tomó como control de la unión del IFN- $\alpha_{2b}$  a su receptor y del desencadenamiento de la vía de señalización. En el caso de la línea NCI-H82, se observó un máximo de inducción 8 h después de la adición del IFN- $\alpha_{2b}$ , con disminución progresiva, lo que se corresponde con la cinética de inducción temprana reportada para este gen en la literatura. En ausencia de IFN- $\alpha_{2b}$  (control negativo) no se expresó el gen de la 2'-5' OAS. Resulta interesante que en las células de la línea H82R, no se expresó el gen de la 2'-5' OAS con la misma cinética que en las células sensibles, mientras que los niveles de  $p27^{Kip1}$  no variaron en ningún momento después de la adición del IFN- $\alpha_{2b}$ . La inducción del gen de la 2'-5' OAS en la línea sensible, descarta la posibilidad de afectación del receptor del IFN- $\alpha_{2b}$  en estas células. Este constituye el primer reporte en el mundo sobre la expresión diferencial del gen  $p27^{Kip1}$  en células sensibles y en células resistentes al efecto antiproliferativo del IFN- $\alpha_{2b}$ . Los resultados reflejados aquí tienen gran importancia debido a que el IFN- $\alpha_{2b}$  ha sido aprobado en Cuba y en el mundo para la terapia de diversas enfermedades por sus efectos antivirales, antiproliferativos y de aumento de la respuesta inmune. Cierta porcentaje de las personas tratadas con IFN- $\alpha_{2b}$  no responden o muestran recurrencia después de un período de tratamiento determinado. En este trabajo se muestran los resultados de un estudio comparativo realizado en células sensibles y en células resistentes, acerca del efecto del IFN- $\alpha_{2b}$  sobre un gen regulador del ciclo celular  $p27^{Kip1}$ , que ya se ha demostrado que está relacionado con la detención del ciclo celular. El gen  $p27^{Kip1}$  puede que se exprese como parte de la vía de señalización de esta citoquina. Los resultados de este trabajo sugieren que el gen  $p27^{Kip1}$  pudiera ser un mediador clave en el efecto antiproliferativo del IFN- $\alpha_{2b}$ , y que si no se expresa pueden aparecer células resistentes. Este resultado ayuda en el establecimiento de las bases para una terapia racional, ya que es probable que no respondan aquellos pacientes que tengan el gen  $p27^{Kip1}$  mutado o afectada su inducibilidad por IFN- $\alpha_{2b}$ . Sería posible entonces identificar, previo al tratamiento, los mejores candidatos para una terapia efectiva.

### Efecto de la oncoproteína E7 del VPH 16 sobre la respuesta de las células NCI-H82 frente al IFN- $\alpha_{2b}$

La expresión del oncogén E7 del VPH 16 induce la entrada en la fase S del ciclo celular en presencia de señales antiproliferativas. En este estudio se investigaron los niveles relativos del gen  $p27^{Kip1}$  mediante RT-PCR en células sensibles al IFN- $\alpha_{2b}$  transfectadas con el gen E7. Los niveles de  $p27^{Kip1}$  no variaron después de la adición del IFN- $\alpha_{2b}$ . Esto coincide con lo observado

Selección de las investigaciones premiadas por la Academia de Ciencias de Cuba en 1998.

Selection of researches awarded by the Cuban Academy of Sciences in 1998.

✉ Autor de correspondencia

1. Moro A, Calixto A, Suárez E, Araña M de J, Perea SE. Differential expression of the  $p27^{Kip1}$  mRNA in IFN-sensitive and resistant cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;245:752-6.

2. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz J, Jansen-Dürr P. *Oncogene* 1996;13:2323-2330.

para los niveles de ARNm de p27<sup>Kip1</sup> en las células resistentes. La respuesta de las células transfectadas al IFN- $\alpha_{2b}$  fue evaluada mediante un ensayo anti-proliferativo, con la utilización de las líneas NCI-H82 y H82R como controles (Figura). Se obtuvo que las células NCI-H82 son muy sensibles: concentraciones tan bajas como 7,5 UI/mL de IFN- $\alpha_{2b}$  producen 30% de inhibición. Sin embargo, en el caso de las células transfectadas y H82R hubo muy poca variación, con niveles de crecimiento relativo entre 77 y 97%. El análisis estadístico de estos resultados mostró diferencias significativas entre la línea NCI-H82 y las células H82R y las transfectadas con el gen E7. En teoría se pudiera explicar la ausencia de respuesta de las células transfectadas, si se toma como base un reporte previo [2] que indica que la capacidad de E7 de superar ciertas formas de detención del ciclo celular en G0/G1, se debe en parte a su unión al inhibidor p27<sup>Kip1</sup>, lo que trae como consecuencia que p27<sup>Kip1</sup> no pueda inhibir la actividad quinasa asociada a la ciclina E/Cdk2. Los VPH han sido identificados como agentes causales de diversas lesiones epiteliales proliferativas como el condiloma acuminado y las verrugas comunes. Estos virus han emergido rápidamente como la enfermedad viral de transmisión sexual de mayor prevalencia en la actualidad. Según estimados, uno de cada tres individuos sexualmente activos está infectado con algún tipo de VPH. Aproximadamente un millón de casos nuevos son diagnosticados cada año. También se

ha señalado, como factor etiológico del cáncer de cérvix, que aproximadamente 90-95% de los pacientes con cánceres cervicales invasivos contienen ADN de VPH. Por otra parte, los IFN han sido aprobados para la terapia de diversas enfermedades. Sin embargo, estudios clínicos demostraron que con frecuencia hay recurrencia o ausencia de respuesta. Los mecanismos de resistencia no se conocen, aunque la presencia de las proteínas de los VPH y sus interacciones con las moléculas de señalización celular pudieran estar involucrados en esta resistencia.

En este trabajo se establecen, por primera vez, las bases moleculares de la resistencia de tipos oncogénicos de los VPH al tratamiento con IFN- $\alpha_{2b}$ . La posible vinculación de la presencia de oncoproteínas con la resistencia al tratamiento, permitiría establecer una racionalidad en la terapia con el IFN- $\alpha_{2b}$ . El clínico sabría antes del comienzo del tratamiento y teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de detección de VPH, si el paciente responderá o no al mismo. Esto mejoraría la calidad de vida del paciente, pues le evitaría someterse a protocolos con poca probabilidad de éxito y obligaría a diseñar nuevos protocolos que aumenten la eficacia del tratamiento, mediante la inclusión de nuevos fármacos cuya actividad combinada resulte más efectiva que el IFN- $\alpha_{2b}$  solo. De este modo, aumentaría el número de pacientes curados y, por lo tanto, la eficiencia del sistema nacional de salud.

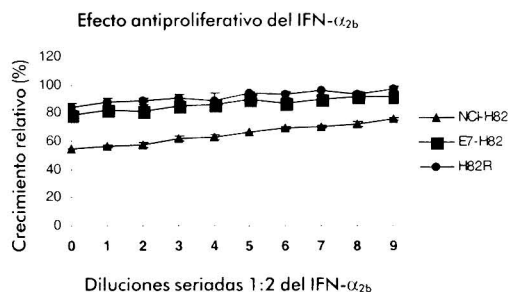


Figura. La transfección del gen E7 del VPH 16 en la línea celular NCI-H82 induce resistencia al efecto antiproliferativo del IFN- $\alpha_{2b}$ . Se utilizó un rango de concentraciones de IFN- $\alpha_{2b}$  (Heber Biotec, Cuba) de 7,5 UI/mL a 4 000 UI/mL. Se utilizaron diluciones seriadas 1:2 y se determinó la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico. Los datos son presentados como por cientos de células no tratadas. Los puntos representan la media de las mediciones de tres ensayos diferentes y las barras representan la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células NCI-H82.

## Desarrollo de una nueva metodología para la caracterización estructural de la N-glicosilación de proteínas naturales o recombinantes

✉ José A Cremata, Omar Quintero, Raquel Montesino, Rossana García

Laboratorio de Glicoproteínas. División de Bioindustrias.  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 6162, Ciudad de La Habana, Cuba.  
Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: glycolab@cigb.edu.cu

### Introducción

Se describe una metodología nueva, sencilla y sensible para el análisis y caracterización estructural de oligosacáridos *N*-enlazados de glicoproteínas naturales o recombinantes. Esta metodología está incluida en las llamadas técnicas de perfil de mapeo bidimensional de oligosacáridos neutros y sialilados, mediante el empleo del ácido 8-amino-1,3,6-naftalen trisulfónico (ANTS) como agente derivatizante fluorescente.

✉ Autor de correspondencia

Como principales virtudes de esta metodología se destacan:

1. Se requieren sólo picomoles de oligosacárido para su caracterización, lo que representa microgramos de la glicoproteína de interés a diferencia de los métodos tradicionales (RMN), que utilizan cantidades superiores en dos ordenes de magnitud.
2. Permite prescindir, en muchos casos, del uso de métodos físico-químicos de análisis muy especializados y