



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**

**“INTERLEUCINA 18 Y SU RECEPTOR (IL-18R $\alpha$ ) EN LA  
CARCINOGENESIS CERVICAL”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A :  
HILDA JIMÉNEZ WENCES**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. GLORIA FERNÁNDEZ TILAPA**

**CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2007.**



**INTERLEUCINA 18 Y SU RECEPTOR (IL-18R $\alpha$ ) EN LA  
CARCINOGENESIS CERVICAL**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero, México.

Bajo la dirección de

Dra. Gloria Fernández Tilapa y

la asesoría de

M en C. Ma. Elena Moreno Godínez

M en C. Amalia Vences Velázquez

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dr. Vicente Madrid Marina

Dr. Alejandro Millán Vega

Con la colaboración de

**Instituto Estatal de Cancerología, Acapulco, Gro.**

Oncólogo. Marco Antonio Terán Porcallo

**Clínica de Displasias “Alameda”, Chilpancingo, Gro.**

Med Cir. Patricia Romero Neri

*Proyecto financiado por la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la Secretaría de Educación, a través del Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI 3.0).*

Durante el período febrero 2005 a julio 2006 la C. Hilda Jiménez Wences, recibió beca del CONACYT.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Las metas se logran no sólo venciendo obstáculos personales, se adquieren vinculando procesos en la vida. Gracias a todas aquellas personas que fueron esenciales en este proyecto que con su comprensión, apoyo y constante ánimo, me ayudaron a conquistar mis sueños y a anhelar siempre lo mejor. Sin duda, este trabajo no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de mucha gente que contribuyeron en esta investigación, que como una familia me brindaron la oportunidad de interactuar y adquirir conocimientos a nivel personal y profesional.*

*A mi Directora de Tesis: **Dra. Gloria Fernández Tilapa** por su asesoramiento y estímulo para seguir creciendo intelectualmente, por su disposición permanente e incondicional para aclarar mis dudas, por sus sugerencias durante la redacción de esta Tesis, pero sobre todo por su amistad, su apoyo y dedicación. Me siento realmente afortunada por haber trabajado bajo su dirección, por haber dirigido este trabajo con mucho entusiasmo, interés y dedicación pero sobre todo por su amabilidad y su paciencia.*

*A mis Sinodales: M en C. Ma Elena Moreno Godínez, M en C. Amalia Vences Velázquez, Dra. Berenice Illanes Aguiar, Dr. Vicente Madrid Marina y Dr. Alejandro Millán Vega, por sus sugerencias, correcciones y críticas en la redacción de este trabajo. Gracias por su apoyo.*

*A la M en C. Eugenia Flores Alfaro por su asesoramiento y disponibilidad.*

*A Dinorah y Fabiola por sus enseñanzas en las técnicas de laboratorio, por haber acudido siempre en mí auxilio con paciencia y disposición. Sin su apoyo este trabajo no habría sido posible. Pero sobre todo, por su amistad invaluable.*

*A la M en C. Mónica Virginia Saavedra Herrera por ser un ejemplo de compañerismo por que sin conocerme y sin dudarlo me brindo su apoyo. Gracias*

*A mis Maestros por que en conjunto hacen posible que logremos nuestros objetivos.*

## DEDICATORIAS

*A Dios, por ponerme en este camino de abundancia, amor y bienestar*

*A mis padres Hilda y Gamaliel, quienes me infundieron las bases que guían mi vida. Gracias por haberme brindado su amor, comprensión y apoyo, por creer en mí y en mis sueños, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones. Mamá, tu amor ha sido suficiente para vivir.*

*A mi mamá Lichita. Gracias por ser la fuerza, la unión y la sabiduría que ha guiado nuestra familia, por regalarme una mamá y unos tíos maravillosos.*

*A mis hermanos Yadira y Juan, por su amor incondicional y por ser cada uno para mí un ejemplo de vida y un modelo a seguir. Dios escogió a los mejores hermanos para mí. Gracias por su apoyo.*

*A mis Sobrinos Oscar y Miriam a los que adoro, son mis piojitos que alegran mi vida. Espero que pronto estemos juntos y que el espíritu del amor sea la base de nuestra unión como familia.*

*A mis Tías Verónica y Leticia. Gracias por que nunca me han dejado sola, no solo forman parte de esta fase de mi vida: son parte de mi formación y vida, son mi refugio y mi fortaleza. Las quiero mucho.*

*A mis tíos Simón, Francisco, José Luís, Víctor, Saúl, Isaac y Horacio, por que son un ejemplo de esfuerzo, triunfo y fortaleza.*

*A mis primos. Recuerden que con esfuerzo y dedicación los sueños y las metas se pueden lograr.*

*A mis amigos: Pedro, Juanchi, Miguel, Toñito, Ebzadrel, David, Marleni, Dinorah, Fabiola, Maritsa, Aurora y Toñita por sus consejos y apoyo. Por todas esas horas que hemos compartido juntos. Gracias por su amistad*

*A mis hijos: Javier, Júnior, Andrés, Jorgito, Hiram, Hugo, Rosita, Maribel, Janet y Zacapala, por apoyarme en todo momento, los quiero mucho. Gracias por ser una familia para mí.*

*A Julio: Por estar a mi lado en todo momento.*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Abreviaturas	I
Índice de Cuadros	II
Índice de Figuras	III
Resumen	IV
Abstract	V
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	19
REFERENCIAS	21

## ABREVIATURAS

<b>CaCU</b>	Cáncer Cérvico Uterino
<b>CN</b>	Negativo a Lesión Intraepitelial o Malignidad
<b>DEPC</b>	Dietil Pirocarbonato
<b>Fas</b>	Proteína Fas
<b>Fas-L</b>	Ligando Fas
<b>GM-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
<b>ICE</b>	Enzima Convertidora de la IL-1 $\beta$ o Caspasa I
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón Gamma
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>IL-18R<math>\alpha</math></b>	Cadena Alfa del Receptor de la IL-18
<b>IL-18R<math>\beta</math></b>	Cadena Beta del Receptor de la IL-18
<b>IL-18R</b>	Receptor de la IL-18
<b>LEIGA</b>	Lesión Escamosa Intraepitelial de Grado Alto
<b>LEIGB</b>	Lesión Escamosa Intraepitelial de Grado Bajo
<b>LTC</b>	Linfocitos T Citotóxicos
<b>NK</b>	Células Asesinas Naturales
<b>Th1</b>	Células T Helper Tipo-1
<b>VPH</b>	Virus del Papiloma Humano

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Frecuencia de la expresión del RNAm de IL-18 e IL-18R $\alpha$ con respecto al grado de lesión.	10
Cuadro 2. Riesgo de LEIGB, LEIGA y CaCU asociado a la falta de expresión de IL-18	11
Cuadro 3. Nivel de expresión del RNAm de la IL-18 en CN, lesiones precancerosas y CaCU	13
Cuadro 4. Frecuencia de los genotipos virales del VPH y expresión del RNAm de IL-18	14



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Acción sinérgica de la IL-12 e IL-18 en la producción de IFN- $\gamma$ en células Th1.	5
Figura 2. Expresión del RNAm de IL-18 y $\beta$ -actina.	10
Figura 3. Expresión del RNAm de IL-18R $\alpha$ .	10
Figura 4. Semicuantificación del RNAm de la IL-18 en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.	12
Figura 5. Semicuantificación de la IL-18R $\alpha$ en CN	12

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la expresión del RNAm de la IL-18 y de la cadena  $\alpha$  de su receptor (IL-18R $\alpha$ ) en lesiones premalignas y cáncer cérvico uterino. **Material y métodos.** Entre agosto de 2005 y abril de 2006, se analizaron 225 muestras de cDNA, de las cuales, 192 procedían de casos de lesión premaligna o cáncer cérvico uterino (CaCU), diagnosticados por histopatología, distribuidos en tres estratos: a) lesión escamosa intraepitelial de grado bajo (LEIGB) n= 119, b) lesión escamosa intraepitelial de grado alto (LEIGA) n= 38 y c) CaCU n= 35. Se incluyeron 33 muestras de raspados cervicales negativos a lesión intraepitelial o malignidad (CN). La expresión del mensajero de la IL-18 y de IL-18R $\alpha$  se detectó mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen, como control positivo para IL-18 se utilizó RNA de células HeLa y para IL-18R $\alpha$  se utilizó RNA de células mononucleares de sangre periférica de una paciente con Leucemia Granulocítica Crónica. **Resultados.** La proporción de muestras que expresaron el RNAm de IL-18, fue mayor en los estratos de CN y CaCU con un 45.7% y 48.5% respectivamente, mientras que sólo el 27.7% de muestras de LEIGB y 23.7% de aquellas con LEIGA expresaron ese mensaje. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas obtenidas de la semicuantificación del RNAm de la IL-18 entre CN y LEIGB ( $p=0.028$ ) y entre LEIGB y CaCU ( $p=0.042$ ). El RNAm de la IL-18R $\alpha$  sólo se detectó en el 5.7% (2/35) de las muestras de CN, mientras que en lesiones precancerosas y CaCU la expresión fue indetectable. De las muestras analizadas, el 60% resultó VPH<sup>positiva</sup>/RNAm de IL-18 <sup>negativa</sup> y el 25 % fueron VPH<sup>positiva</sup>/RNAm de IL-18 <sup>positivas</sup>. De las muestras con infección por VPH 16 el 71 % fueron negativas al RNAm de IL-18. **Conclusiones.** La presencia del RNAm de la IL-18 se detectó en los 4 estratos, sin embargo, la expresión del mensajero de la IL-18R $\alpha$  fue nula en lesiones intraepiteliales y CaCU. Estos hallazgos pueden sugerir una modulación negativa de la respuesta inmune Th1. Es posible que el VPH, a través de sus oncoproteínas, esté interfiriendo la expresión de IL-18 o la señalización (IL-18R $\alpha$ ) por esta citocina, disminuyendo así la respuesta inmune celular y contribuyendo a la patogénesis viral y la carcinogénesis.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine IL-18 and  $\alpha$ -chain of its receptor (IL-18R $\alpha$ ) mRNA expression in pre-malignant lesions and cervical cancer. **Material and methods:** Between August 2005 and April 2006 we analyzed 192 specimens of pre-malignant lesion or cervical cancer cases. The cervical tissues were histologically classified as low grade intraepithelial squamous lesion (LGSIL) in 119 cases, high grade intraepithelial squamous lesion (HGSIL) in 38 and squamous cell carcinoma (SCC) in 35. We also included 33 samples from cervical scrapes coming from cytological normal women (CN). The patients had not been previously treated. The expression of IL-18 and IL-18R $\alpha$  was analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers for each gene; we used RNA from HeLa cells as a positive control for IL-18, and for IL-18R $\alpha$  peripheral mononuclear blood cell RNA from a patient with chronic granulocytic leukaemia. **Results:** Sample proportion expressing IL-18 mRNA was higher in the CN and cervical cancer groups with 45.7% and 48.5% respectively, while only 27.7% LGSIL samples and 23.7% of those with HGSIL expressed this messenger. We observed statistically significant differences between the medians obtained by IL-18 mRNA semi-quantification between CN and (LGSIL) ( $p=0.028$ ) and between LGSIL and cervical cancer ( $p=0.042$ ). IL-18R $\alpha$  mRNA only was detected in 5.7% (2/35) of the CN samples, while in pre-malignant lesions and cervical cancer expression was undetectable. A total of 60% specimens from cases were HPV<sup>positive</sup>/IL-18<sup>negative</sup> mRNA and 25% were HPV<sup>positive</sup>/IL-18<sup>positive</sup> mRNA. Of all the samples with infection by HPV16, 71% were negative to IL-18 mRNA. **Conclusions:** IL-18 mRNA was detected in four groups, however IL-18R $\alpha$  messenger expression was null in intraepithelial lesions and cervical cancer. These findings suggest a negative modulation to the Th1 immune response. It is possible that HPV, through its oncoproteins, is interfering in IL-18 and IL-18R $\alpha$  expression or signaling by this cytokine, decreasing the immune cell response and contributing to viral pathogenesis and carcinogenesis.

## INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres de 25 y más años de edad, después del carcinoma mamario.<sup>1,2,3</sup> La edad promedio en que se presenta el CaCU es de 52 años y la distribución de los casos es bifásica, con un pico entre los 35-39 años y otro entre los 60 a los 64 años.<sup>1</sup> Según la OMS, cada año se registran alrededor de 500 000 nuevos casos de CaCU, de los cuales cerca de 45% fallecen.<sup>5</sup> México y América Central presentan la tasa de incidencia y mortalidad más altas por esta patología. En el año 2003 el INEGI reportó una tasa de mortalidad de 8.3 casos por cada 100 000 mujeres en México y de 13.7 por cada 100 000 mujeres en el estado de Guerrero.<sup>3</sup>

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasivas; lesión escamosa intraepitelial de grado bajo (LEIGB) y lesión escamosa intraepitelial de grado alto (LEIGA), hasta llegar a CaCU, de acuerdo con la proporción y grosor del epitelio cervical comprometido.<sup>5,6</sup> El factor etiológico que determina la aparición y progresión de la neoplasia a CaCU es la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH), especialmente si se trata de un genotipo de alto riesgo oncogénico.<sup>3,5,7,8,9,10,11,12</sup> Sin embargo, la infección por sí misma no es suficiente para desarrollar cáncer cervical y sus etapas precursoras.<sup>7</sup> Para que una mujer desarrolle CaCU se requiere de varios factores adicionales que, en conjunto, inducen la progresión de una infección viral persistente a una LEIGB la cual posteriormente puede evolucionar a LEIGA y, finalmente, culminar en un cáncer cervical.<sup>5,6,13</sup> Entre estos factores se encuentra el estado funcional del sistema inmune del hospedero.<sup>9,10,12</sup> Se ha observado que pacientes con deficiencia inmune celular presentan altas tasas de infección por VPH y que es más probable que mujeres con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) desarrollen lesiones de alto grado y CaCU.<sup>1,3,6,7,8</sup>

La respuesta inmune celular tiene un papel importante en el control de las neoplasias asociadas a VPH, las cuales frecuentemente revierten como resultado de una respuesta inmune celular de tipo Th1.<sup>6,13,14,15</sup> Los mecanismos inmunes antitumorales son efectuados fundamentalmente por los LTC (Linfocitos T Citotóxicos), por células asesinas naturales (NK) y por macrófagos.<sup>6,13,14</sup>

Una disfunción de la respuesta inmune celular puede facilitar la progresión a cáncer.<sup>16,17</sup> Algunos autores han reportado inmunocompromiso celular en lesiones cervicales asociadas a VPH, representada por disminución de linfocitos intraepiteliales, especialmente de células CD8<sup>+</sup> tanto en infección viral como en lesiones cervicales, sugiriendo que hay una deficiencia inmune local asociada a infección por VPH.<sup>6,9,13,18</sup>

La producción local de citocinas es un evento temprano durante la respuesta inmune innata contra células tumorales, determina el tipo de respuesta inmune adaptativa que será estimulada (respuesta inmune celular, Th1, o respuesta inmune humoral, Th2) y, además, determina la magnitud de la protección inmune.<sup>15,19,12</sup> Entre estas citocinas se encuentran el IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-12 e IL-18 producidas por monocitos/macrófagos.<sup>6,13,16</sup> Se propone que uno de los mecanismos por el cual las células infectadas por VPH y células malignas escapan a la vigilancia inmune, involucra cambios en la producción local de citocinas y la pérdida de respuesta a éstas, provocando una alteración en el balance Th1/Th2 de la inmunidad local.<sup>6,13,15,19,20,21,22</sup>

La IL-18, también llamada factor inductor del interferón- $\gamma$  (IGIF), es una citocina proinflamatoria de 18 kDa, producida por macrófagos activados por antígenos virales o antígenos específicos de tumor.<sup>23,24,25,26,27,28</sup> Otras fuentes de IL-18 son los queratinocitos, células de Kupffer, células epiteliales, células dendríticas, condrocitos articulares, fibroblastos, osteoblastos, y células secretoras de la glándula pituitaria y corteza adrenal.<sup>14,23,24,25,26,27,29</sup> La IL-18 es sintetizada como una molécula de 24 kDa que requiere ser cortada por la enzima convertidora de la IL-1 $\beta$  (ICE o caspasa1) para generar el monómero de 18 kDa biológicamente activo.<sup>23,24,25,26,28,31,32</sup> La IL-18 posee propiedades pleiotrópicas tales como la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), expresión del ligando de Fas (FasL), inducción de las quimiocinas CC y CXC, y aumento de la producción del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF).<sup>14,25,26</sup> La IL-18 juega un papel importante en la respuesta de tipo Th1, por su capacidad para inducir la producción del interferón gamma y aumentar la actividad citotóxica de los LTC y de las células NK; además, posee la capacidad de inducir la producción de otros mediadores proinflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral

(TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que permite aumentar la proliferación de células T, la activación de los LTC y aumentar la actividad de las células NK a través de la interacción Fas-FasL.<sup>14,24,26,29</sup> Aunque la IL-18 está involucrada en el desarrollo de células Th1, un estudio reciente ha revelado una fuerte inducción de citocinas Th2-tales como IL-4, IL-5, e IL-13 y la producción de IgE- en sinergismo con IL-2 - en una gran variedad de modelos murinos. En ausencia de IL-12 e IFN- $\gamma$ , la IL-18 y la IL-2 inducen la expresión de IL-13, aumentando así la respuesta de tipo Th2.<sup>26,30</sup> Cuando el IFN- $\gamma$  es suprimido, la IL-18 puede ser un cofactor en el desarrollo de la respuesta inmune tumoral por la inducción de IL-13, dependiendo del tipo celular. Por lo tanto la IL-18 puede actuar como un fuerte coinductor de las citocinas Th1 y Th2 *in vivo*.<sup>24,25,29,31</sup>

La IL-18 media sus actividades biológicas a través de un receptor heterodimérico consistente de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$  (IL-18R $\alpha$  y IL-18R $\beta$ ).<sup>23,29,32,34,35</sup> Este receptor se expresa en un subgrupo de células T vírgenes, células NK, macrófagos, neutrófilos y condrocitos, así como en una gran variedad de tejidos - incluyendo el bazo, hígado, pulmón, corazón, timo, intestino grueso y delgado.<sup>23,29,32</sup> La cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) se une al ligando, mientras que la cadena  $\beta$  (IL-18R $\beta$ ) es la cadena transductora de señal. Altos niveles de IL-18R $\alpha$  se relacionan con la capacidad de IL-18 para inducir una producción significativa de IFN- $\gamma$ ; sin embargo, la cadena  $\alpha$  por si sola posee una baja afinidad por su ligando, mientras que el complejo IL-18R (cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-18R) posee una alta afinidad por la citocina.<sup>23,24,26,29,32,34,35</sup>

Estudios recientes han demostrado que la expresión de IL-18R es selectiva y persistentemente expresada en células Th1 pero no en células Th2, y existe cierto grado de variación en los niveles de expresión del RNAm de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$ . Las células Th1 activadas expresan niveles altos del RNAm de IL-18R $\alpha$  mientras que las células B y el resto de células T expresan niveles bajos.<sup>26,29,32</sup> Las células Th2 activadas expresan IL-18R $\beta$ , a diferencia del resto de las células Th1. Sólo las células Th1 polarizadas expresan niveles significativos del RNAm de ambas cadenas.<sup>29</sup> Debido a que IL-18R $\alpha$  es selectivamente expresado sobre la superficie de células Th1, pero no en células Th2, éste puede ser considerado como un marcador de superficie celular.<sup>26,29</sup> La expresión del IL-18R sobre las células T

vírgenes comienza después de ser estimuladas con IL-12.<sup>23</sup> Por lo tanto, la expresión de IL-12 es un prerrequisito para la actividad de IL-18 sobre las células T. Una vez que el IL-18R es inducido, la IL-12 y la IL-18 recíprocamente modulan la expresión de sus receptores (figura1).<sup>24,26,35</sup>

La IL-18 muestra actividad antitumoral y antiangiogénica en varios modelos tumorales, por lo que es concebible que la pérdida de la producción de IL-18 bioactiva sea un medio por el cual las células tumorales evitan la síntesis local de IFN- $\gamma$  y así la respuesta de tipo Th1.<sup>21,23,26,27,29,36,37,38,39,40</sup> En biopsias de carcinoma de colon se encontró una expresión de IL-18 mucho más baja en secciones tumorales que en secciones del colon normales del mismo individuo; evento frecuentemente acompañado por la ausencia de transcritos de ICE, que da como resultado una falta de IL-18 bioactiva, y la consecuente falla en la producción de IFN- $\gamma$ .<sup>21</sup> Células de cáncer de mama genéticamente modificadas con la transfección del gen de la IL-18 pierden su tumorigenicidad.<sup>37</sup> Se ha observado que pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV (pacientes metastásicos) presentan niveles significativamente más altos de IL-18 en suero, en comparación con pacientes en estadio IIIB.<sup>41</sup> Por otra parte, se ha encontrado que las concentraciones de IL-18 en suero son significativamente más altas en pacientes con carcinoma celular escamoso de cuello y cabeza en contraste con los niveles séricos de IL-18 en individuos control, independientemente de su actividad biológica.<sup>42,43</sup>

Aunque el papel de la IL-18 en la patogénesis por el VPH aún no ha sido determinado, se ha reportado que E6 se une a la IL-18 y la degrada por la vía de la ubiquitinación.<sup>44</sup> Experimentos de cotransfección con promotores de IL-18 demostraron que E6 no afecta la actividad del promotor p1 y p2, sugiriendo que la desregulación de la expresión de IL-18 por E6 es indirecta.<sup>44</sup> La disminución de los niveles de IL-18 por E6 podría interferir en los procesos inflamatorios locales. En otro estudio encuentran que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH 16 inhiben la producción de IFN- $\gamma$  inducida por IL-18 en células NK y células mononucleares de sangre periférica humana, al reducir la unión de la IL-18 a su receptor.<sup>45</sup> Ensayos de competencia revelaron además que las oncoproteínas E6 y E7 se unen de forma competitiva a la cadena  $\alpha$  del IL-18R, y que de esta forma contribuyen a la

patogénesis o carcinogénesis cervical.<sup>45</sup> Estos estudios muestran que la desregulación de la respuesta inmune inducida por IL-18 causado por las oncoproteínas E6 y E7 es uno de los mecanismos por el cual las células de cáncer cervical infectadas por VPH escapan a la respuesta inmune.<sup>45</sup> Otro estudio reporta que la IL-18 madura en su forma mutante (IL-18E42A) no es susceptible a la inhibición de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.<sup>46</sup>

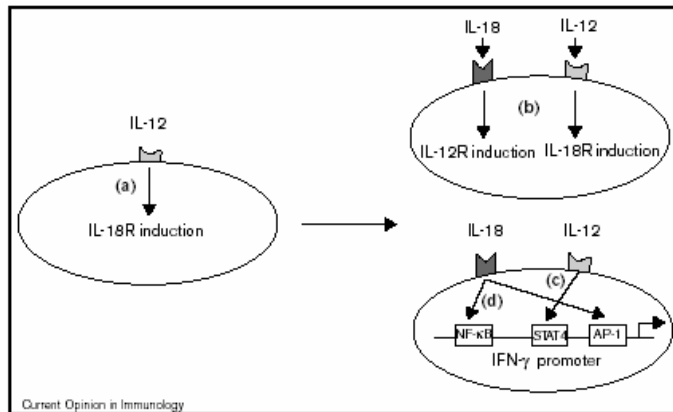


Fig. 1. Acción sinérgica de la IL-12 e IL-18 en la producción de IFN- $\gamma$  en células Th1.<sup>23</sup>

En la actualidad se desconoce mucho sobre el comportamiento del sistema inmunológico en un proceso de carcinogénesis. Estudios *in vitro* en líneas celulares han demostrado que la IL-18 posee una actividad antitumoral, induciendo la activación secuencial de las células NK y LTC. Por lo tanto, es posible que la baja producción de IL-18 o de su receptor en células blanco sea un medio por el cual las células tumorales previenen la respuesta local de tipo Th1. El papel de la IL-18 y de su receptor no ha sido evaluado en el proceso evolutivo del CaCU. Por tal motivo, el propósito de este trabajo es valorar la expresión del RNAm de la IL-18 y de la cadena  $\alpha$  del IL-18R en lesiones premalignas y CaCU, así como determinar si existe relación entre su expresión y el proceso de la carcinogénesis cervical.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Muestras.**

Se realizó un estudio de casos y controles con datos y muestras del banco de cDNA del Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero. El grupo de casos estuvo conformado por 119 muestras provenientes de mujeres con diagnóstico de LEIGB, 38 de LEIGA y 33 muestras de CaCU, confirmado por histopatología. El grupo de referencia se conformó por 35 muestras de raspados cervicales negativos a lesión intraepitelial o malignidad diagnosticados por Papanicolaou (PAP), y con diagnóstico molecular (PCR) negativo a infección por VPH.

### **Células mononucleares y líneas celulares.**

Para la obtención de un control positivo a la expresión del RNAm de IL-18 se obtuvo RNA total de la línea celular HeLa y RNA total de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una paciente con leucemia granulocítica crónica como control positivo a la expresión de IL-18R $\alpha$ .

### **Extracción de RNA total y síntesis de DNA complementario (cDNA).**

Se realizó la extracción del RNA total de la línea celular HeLa, CMSP, de raspados cervicales y de las biopsias homogeneizadas, por el método de TRIzol (con 200  $\mu$ l de cloroformo, 500  $\mu$ l de isopropanol y 20  $\mu$ l de LiCl 4M). El RNA total se resuspendió en 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril tratada con DEPC y posteriormente se trató con DNasa I FPLCpure™, para eliminar el DNA contaminante. La cuantificación del RNA se realizó en un biofotómetro (Eppendorf) en el que se determinó su concentración y pureza. Se utilizaron 2.5  $\mu$ g de RNA total para sintetizar el cDNA, el cual se utilizó como base para la amplificación de las secuencias génicas de  $\beta$ -actina, IL-18 e IL-18R $\alpha$ , por PCR. Para la transcripción reversa (RT) se utilizaron 0.5  $\mu$ l de Oligo dT<sub>12-18</sub>, 50 mM, Retrotranscriptasa MMLV (Moloney Murine Leukaemia Virus), dNTP's (0.9 mM), Buffer RT 1X (Tris-HCL 250 mM pH. 8.3, KCL 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM ), DDT (0.01M), 2 U de inhibidor de RNasas (Amersham) y H<sub>2</sub>O DEPC para un volumen final de 25  $\mu$ l. Se incubó la reacción a 70 °C por 10 minutos, para el alineamiento del oligo dT a las colas de poli-A de los mensajeros, y la extensión se llevó a cabo a 37°C por 1.5

horas; para inactivar la MMLV-RT se incubó la reacción a 90 °C por 10 minutos. Finalmente, el cDNA se guardó a -20 °C hasta su empleo para la PCR.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

A cada una de las muestras de cDNA se les realizó una PCR para el gen constitutivo  $\beta$ -actina, para valorar la integridad del RNAm, evaluar la síntesis del cDNA y semicuantificar el nivel de expresión del gen de la IL-18 y de la IL-18R $\alpha$ . La secuencia de oligonucleótidos que se utilizó para amplificar un fragmento del gen  $\beta$ -actina fue la siguiente: sentido 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3', y antisentido 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: se utilizaron 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X, dNTP's 0.15 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 10 pmol de Oligo sentido y antisentido, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa recombinante, y 2.0  $\mu$ l del cDNA. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l. El programa de amplificación consistió en un ciclo a 94°C por 5 min y 29 ciclos de 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg; con un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min, obteniéndose un producto de 540 pb. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, en un fotodocumentador Gel Documentation Systems (Gel Doc 2000TM) (BIO-RAD).

Sólo las muestras que fueron positivas a este gen se sometieron a PCR, para valorar la expresión de los transcritos de la IL-18 y de la cadena  $\alpha$  de su receptor, utilizando los siguientes oligonucleótidos: IL-18, sentido 5' ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GA 3', antisentido 5' AAT AGC TAG TCT TCG TTT TGA AC 3', IL-18R $\alpha$ : sentido 5' GTT GAG TTG AAT GAC ACA GG 3', antisentido 5' TCC ACT GCA ACA TGG TTA AG 3', respectivamente.

Para la PCR de la IL-18 se utilizaron 2.5  $\mu$ l de Buffer 10X, dNTP's 0.15 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 10 pmol de Oligo sentido y antisentido, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa recombinante, y 2.0  $\mu$ l del cDNA. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu$ l. El programa de amplificación para la IL-18 consistió en un ciclo a 94°C por 5 min y 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 40 seg. y 71°C por 45 seg; con un ciclo de extensión final a 71 °C por 4 min, obteniéndose un producto de 587 pb. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de

agarosa al 1.8%, teñidos con bromuro de etidio, en un fotodocumentador Gel Documentation Systems (Gel Doc 2000TM) (BIO-RAD).

Para la PCR de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-18 se utilizaron 2.5  $\mu$ l de Buffer 10 X, dNTP's 0.15 mM,  $MgCl_2$  2.5 mM, 10 pmol de Oligo sentido y antisentido, 1 U de Taq DNA polimerasa platinum 2.0  $\mu$ l del cDNA. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ l. El programa de amplificación para la IL-18R $\alpha$  fue un ciclo de 5 min a 94°C y 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 40 seg; seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C por 3 min, obteniéndose un producto de 422 pb. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, y teñidos con bromuro de etidio en un fotodocumentador Gel Documentation Systems (Gel Doc 2000TM) (BIO-RAD).

#### **Semicuantificación del RNAm de la IL-18 y de IL-18R $\alpha$ .**

Para semicuantificar el RNAm de la IL-18 y de IL-18R $\alpha$  la densidad de la banda del producto de PCR de la IL-18 y de la cadena  $\alpha$  de su receptor se normalizó con la densidad del producto de PCR de  $\beta$ -Actina. Se calculó la relación unidades de densidad de cada gen/unidades de densidad  $\beta$ -Actina. La densidad de las bandas se cuantificó en un fotodocumentador Bio Rad utilizando el programa Quantity one Gel Doc Acquisition Window.

#### **Análisis Estadístico.**

El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS 12.0 y STATA 8.0. Se obtuvieron frecuencias de la expresión del RNAm de la IL-18 y de la IL-18R $\alpha$ , se calcularon cuartiles para comparar el nivel de expresión del RNAm de la IL-18 en los cuatro estratos y se hizo la comparación de medianas del nivel de RNAm utilizando las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Las asociaciones entre las variables se hicieron mediante el cálculo de OR e intervalos de confianza. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

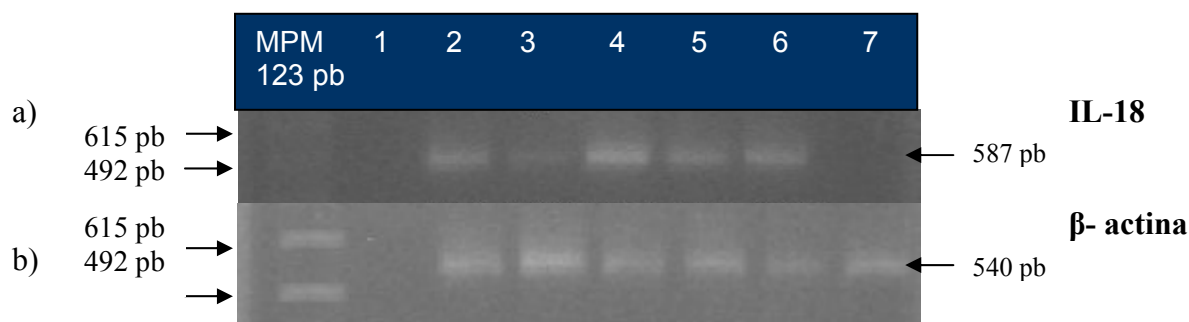
## RESULTADOS

Se estudiaron 225 muestras de mujeres, que contaban con un diagnóstico citológico o histopatológico y con resultados de PCR para detectar infección por VPH. Se analizaron 35 muestras de raspados cervicales negativas a lesión intraepitelial o malignidad, 119 muestras de LEIBG, 38 muestras de LEIAG y 33 muestras de CaCU. Las muestras con CN no presentaron infección por VPH, mientras que el 83.2% de muestras con LEIBG, 76.3% con LEIAG y el 100% con CaCU fueron VPH positivas, siendo los VPHs de alto riesgo oncogénico los más frecuentes, 95.4%. El genotipo más prevalente, 68%, fue el VPH 16, seguido por el VPH-18 (8.5%), VPH- 31 (6.5%) y el VPH 58 (5.2%), todos clasificados como de alto riesgo oncogénico.

### **Expresión del RNAm de IL-18 y de IL-18R $\alpha$ en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.**

Para valorar la integridad del RNA y la síntesis correcta del cDNA, las muestras fueron sometidas a PCR para el gen constitutivo  $\beta$ -actina (figura 2b), obteniéndose un producto de 540 pb. Las muestras que fueron positivas al RNAm de  $\beta$ -actina fueron sometidas a PCR para la detección del mensajero de la IL-18 y de la IL-18R $\alpha$ . Solo una muestra fue eliminada del estudio, los productos de amplificación fueron de 587 pb para IL-18 y de 422 pb para IL-18R $\alpha$  (figura 2a y 3). La proporción de muestras que expresaron el RNAm de IL-18 fue mayor en el grupo con CN y CaCU con un 45.7% (16/35) y 48.5% (16/33) respectivamente, mientras que en lesiones premalignas se encontró que el 27.7% (33/119) de LEIGB y el 23.7% (9/38) de LEIGA, expresaron el mencionado transcrito, cuadro 1.

De las muestras analizadas, solo el 5.7% del grupo con CN expresaron la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-18 (2/35), mientras que en las muestras con LEIGB, LEIGA y CaCU la expresión del RNAm de IL-18R $\alpha$  fue nula (Cuadro 1).



**Figura 2. Expresión del RNAm de IL-18 y  $\beta$ -actina.** a) MPM: Marcador de peso molecular DNA ladder de 123 pb. Carril 1: Control negativo, se sustituyó el cDNA por agua. 2: Control positivo (cDNA sintetizado a partir de RNA de células HeLa). Carril 3-6: Muestras de CaCU que expresan el mensaje de IL-18. Carril 7: Muestra de CaCU negativa al RNAm de la IL-18. b) MPM: Marcador de peso molecular DNA ladder de 123 pb. Carril 1: Control negativo, se sustituyó el cDNA por agua. Carril 2-7: Muestras positivas al RNAm del gen constitutivo  $\beta$ -actina.



**Figura 3. Expresión del RNAm de IL-18R $\alpha$ .** MPM: Marcador de peso molecular DNA ladder de 123 pb. Carril 1: Control negativo, se sustituyó el cDNA por agua. Carril 2: Control positivo (cDNA sintetizado a partir de RNA de CMSP de una paciente con leucemia granulocítica crónica), Carril 4: Muestra de CN positiva al RNAm de IL-18R $\alpha$ . Carril 3,5-7: Muestras de CN negativas al RNAm de IL-18R $\alpha$ .

**Cuadro 1. Frecuencia de la expresión del RNAm de IL-18 e IL-18R $\alpha$  con respecto al grado de lesión.**

Diagnóstico	Total de muestras analizadas	Expresión del RNAm de IL-18		Expresión del RNAm de IL-18R $\alpha$	
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)
<b>*CN</b>	35	19 (54.3)	16 (45.7)	33 (94.3)	2 (5.7)
<b>LEIGB</b>	119	86 (72.3)	33 (27.7)	119 (100)	0 (0)
<b>LEIGA</b>	38	29 (76.3)	9 (23.7)	38 (100)	0 (0)
<b>CaCU</b>	33	17 (51.5)	16 (48.5)	33 (100)	0 (0)

\*Negativo a lesión intraepitelial o malignidad

El análisis de asociación arrojó 2.2 veces el riesgo de desarrollar LEIGB en ausencia del RNAm de la IL-18 y de 2.7 veces el riesgo de desarrollar LEIGA en ausencia del RNAm de esa citocina, sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa. Cuadro 2.

Cuadro 2. Riesgo de LEIGB, LEIGA y CaCU asociado a la expresión del RNAm de IL-18

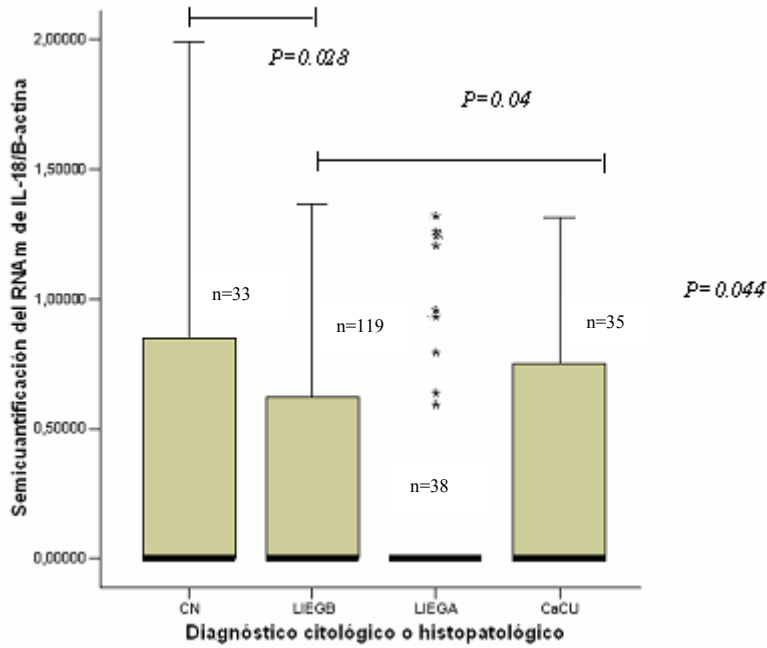
Diagnóstico	No. de Muestras		OR	IC95%
	Negativas al RNAm de la IL-18	Positivas al RNAm de la IL-18		
* CN	19	16		
LEIGB	86	33	2.2	(0.929 – 5.106)
LEIGA	29	9	2.7	(0.897 – 8.408)
CaCU	17	16	0.8	(0.310 – 2.580)

\* Negativo a lesión intraepitelial o malignidad

El grupo de CN se utilizó como categoría de referencia para la expresión del RNAm de la IL-18

#### Semicuantificación del transcrito de IL-18 en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.

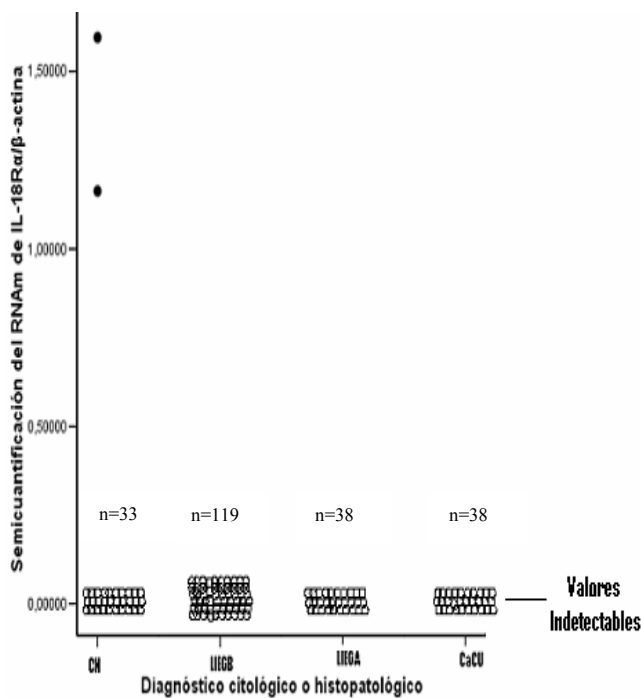
El análisis de los niveles de expresión del RNAm de la IL-18 se realizó de forma semicuantitativa, con la finalidad de valorar diferencias entre las medianas de los 4 grupos de estudio. Las diferencias globales de las medianas de los niveles de expresión del RNAm de la IL-18 entre los cuatro grupos se realizó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, este análisis nos indicó una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los diferentes grupos ( $p=0.044$ ). Para observar entre qué grupos se encontraban las diferencias se aplicó la prueba de Mann-Whitney, los valores de la mediana fue 0 en los cuatro grupos y los intervalos tuvieron un comportamiento distinto en cada grupo: CN el rango fue de 0.0-1.99 ( $\bar{X}= 0.46$ ,  $DE \pm 0.58$ ), en LEIGB de 0.0-1.36 ( $\bar{X}= 0.24$ ,  $DE \pm 0.41$ ), en LEIGA el rango fue de 0.0-1.32 ( $\bar{X}= 0.24$ ,  $DE \pm 0.45$ ) y en CaCU de 0.0-1.31 ( $\bar{X}= 0.39$ ,  $DE \pm 0.44$ ), dicho análisis arrojó diferencias significativas entre las medianas del grupo de CN y LEIGB ( $p=0.028$ ) y entre LEIGB y CaCU ( $p=0.042$ ). No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de las lesiones premalignas y entre CN y CaCU. Figura 4.



**Figura 4.** Análisis de la expresión del RNAm de la IL-18 en muestras con CN, LEIGB, LEIGA, CaCU. Valores normalizados a la expresión del RNAm de β-actina. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

### Semicuantificación del transcrito de IL-18Rα en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.

El RNAm de la IL-18Rα solo se detectó en el 5.7% (2/35) de las muestras de CN, las cuales presentaron una densidad de sus bandas de 1.59 y de 1.16 unidades de IL-18/unidades de β-actina, mientras que en lesiones precancerosas y CaCU la expresión fue indetectable. Figura 5



**Figura 5.** Semicuantificación del RNAm de IL-18Rα en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU, el cual se normalizó a la expresión del gen β-actina

### Nivel de expresión del RNAm de IL-18 en CN, LEIGB, LEIGA y CaCU.

Con la finalidad de determinar el nivel de expresión del RNAm de la IL-18 por estrato se calcularon cuartiles. Las muestras a las cuales no se les detectó el mensajero de la IL-18 se clasificaron en un grupo aparte como expresión nula. De el total de las muestras que expresaron el RNAm de la IL-18, el 25.7% presentaron una expresión mínima, el 70.3% una expresión moderada y solo el 4% tuvieron una expresión alta. De estas últimas dos procedían de raspados cervicales negativos a lesión intraepitelial o malignidad y una de LEIGB, cuadro 3.

Cuadro 3. Nivel de expresión del RNAm de la IL-18 en CN, lesiones precancerosas y CaCU.					
Diagnóstico	Total de muestras analizadas	*Nivel de expresión del RNAm de la IL-18			
		Nula (0)*	Mínima (0.33 – 0.66)*	Moderada (0.67 – 1.33)*	Alta (1.34 – 2.00)*
<b>*CN</b>	35	19 (54.3%)	3 (8.6%)	11 (31.4%)	2 (5.7%)
<b>LEIGB</b>	119	86 (72.3%)	10 (8.4%)	22 (18.5%)	1 (0.8%)
<b>LEIGA</b>	38	29 (76.3%)	2 (5.2%)	7 (18.4%)	-
<b>CaCU</b>	33	17 (51.5%)	4 (12.2%)	12 (36.4%)	-
<b>TOTAL</b>	225	151	19/74 (25.7%)	52/74 (70.3%)	3/74 (4%)

CN: Negativo a lesión intraepitelial o malignidad  
 \*Unidades de IL-18/unidades de  $\beta$ -actina

### Expresión del RNAm de IL-18 e infección por VPH en lesiones precancerosas y CaCU.

De las muestras analizadas, el 60% resultó VPH<sup>positiva</sup>/RNAm de IL-18<sup>negativa</sup> y el 25% fueron VPH<sup>positiva</sup>/RNAm de IL-18<sup>positivas</sup>. De las muestras con infección por VPH 16 el 71 % fueron negativas al RNAm de IL-18, para el VPH 18 el 85% y para el VPH 58 sólo el 13%. Cuadro 4.



Cuadro 4. Frecuencia de los genotipos virales del VPH y expresión del RNAm de IL-18.

Genotipo de VPH	Expresión del RNAm IL-18	
	Positivo	Negativo
<b>16</b>	30/104 (29%)	74/104 (71%)
<b>18</b>	2/13 (15%)	11/13 (85%)
<b>31</b>	4/10 (40%)	6/10 (60%)
<b>33</b>	1/3 (33%)	2/3 (67%)
<b>45</b>	3/6 (50%)	3/6 (50%)
<b>58</b>	7/8 (87%)	1/8 (13%)
<b>59</b>	-	2/2 (100%)
<b>61</b>	-	1/1 (100%)
<b>66</b>	-	2/2 (100%)
<b>CP8304</b>	-	2/2 (100%)
<b>81</b>	-	1/1 (100%)
<b>IM</b>	-	2/2 (100%)
<b>NT</b>	1/7 (14%)	6/7 (86%)

IM: Infección múltiple, NT: No tipificado

## DISCUSION

La Interleucina 18 aumenta la defensa inmune contra células tumorales por la inducción de IFN- $\gamma$ , y posee la capacidad de aumentar la actividad citotóxica de las células NK y células T, así como la capacidad de aumentar la producción de otros mediadores proinflamatorios tales como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .<sup>22,24,26,27,38,40,43</sup> La IL-18 ejerce una acción antitumoral en sistemas murinos inhibiendo la angiogénesis y en varios tipos de líneas celulares de tumor induce apoptosis.<sup>14,26,22,27,36,39,41</sup> Aunque también, se ha reportado fracaso de la IL-18 para suprimir el crecimiento tumoral.<sup>42</sup> Existen reportes que documentan niveles elevados de la proteína de IL-18 en suero de pacientes con cáncer renal, esofágial, de ovario, nasofaríngeo, oral, gástrico, de mama y carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza.<sup>27,28,33,37,41,43,44,48,49,51</sup>

En nuestro estudio encontramos que la proporción de muestras que expresaron el RNAm de IL-18 fue mayor en CN y CaCU que en lesiones premalignas. Nuestros resultados no se pueden comparar directamente con los de otros autores debido a que no hay reportes sobre el estudio del RNAm de la IL-18 en tejido cervical, sin embargo, concuerdan con los reportados por otros investigadores en otros tipos de cáncer. *Hu y col.*, analizaron 5 biopsias de carcinoma de nasofaringe (NPC) y 3 biopsias de pacientes control con diagnóstico de inflamación inespecífica, negativo a NPC; y reportan expresión del RNAm de la IL-18 en ambos grupos de estudio, sin embargo, sólo encuentran presente la proteína en cáncer.<sup>49</sup> La presencia del RNAm de IL-18 en muestras citológicamente normales puede deberse a que en las muestras se identificó proceso inflamatorio y presencia de distintos tipos bacterianos, aunque no se puede descartar la participación de traumatismos ocasionados por relaciones sexuales. Probablemente el RNAm de esta citocina se esté produciendo para que la proteína module esos procesos inflamatorios.

La alta proporción de muestras que expresaron el RNAm de la IL-18 en CaCU podría deberse a que es producido por las células cancerosas, ya que después de la transformación maligna las células adquieren la habilidad de disminuir o aumentar la expresión de citocinas, como la IL-18,<sup>15,16,21</sup> probablemente con la finalidad de modular así el microambiente del tumor y la respuesta inmunológica.

Al actuar de forma autócrina IL-18 regula la expresión del Fas-L y la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno, con lo cual favorece el crecimiento tumoral.<sup>20</sup> La expresión del RNAm de IL-18 en lesiones premalignas no se puede comparar con otros estudios debido a que no hay información al respecto, los estudios realizados por otros autores es a nivel de proteína en diferentes estadios de otros tipos de cáncer: Naumnik y col., encontraron que pacientes con cáncer de pulmón poseen niveles séricos más altos de la proteína IL-18 que los pacientes sanos y fue significativamente más alta en pacientes en etapa IV (pacientes con metástasis) comparado con los de la etapa IIIB.<sup>41</sup> Por otra parte, Gunel y col., y Merendino y col., encontraron que los niveles séricos de la proteína IL-18 fueron más altos en pacientes con cáncer de mama y metástasis comparados con aquellos que no presentaron metástasis.<sup>52,53</sup> Los resultados de estos estudios sugieren que la expresión de la proteína de IL-18 aumenta con la gravedad de la patología.<sup>41,52,53</sup> Con base en nuestros resultados, y los hallazgos reportados en otros tipos de cáncer, podemos sugerir que la ausencia del RNAm de la IL-18 probablemente esté jugando un papel importante en los eventos tempranos de la carcinogénesis cervical por falta de respuesta inmunológica de tipo Th1 hacia la infección por VPH o hacia las células transformadas permitiendo así su progresión. En el caso de las muestras que si expresaron el mensaje es probable que se encuentre activa la respuesta inmune celular para evitar la progresión de las lesiones y la infección por VPH.

Del total de muestras que expresaron el RNAm de la IL-18, el 25.7% presentaron una expresión mínima, el 70.3% una expresión moderada y solo el 4% tuvieron una expresión alta. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas obtenidas de la semicuantificación del RNAm de la IL-18 entre CN y LEIGB ( $p=0.028$ ) y entre LEIGB y CaCU ( $p=0.042$ ). Estos datos nos sugieren que la disminución de expresión del mensajero en lesiones premalignas puede estar favoreciendo la progresión de la enfermedad, ya que no se encontró diferencias entre las medianas de las lesiones precancerosas. Hasta el momento, no hay reportes acerca de los niveles del RNAm de esta citocina en CaCU, sin embargo, nuestros resultados concuerdan con Riedel y col., quienes no encontraron diferencias significativas entre la expresión del RNAm de la IL-18 en pacientes con carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza en

comparación con sus controles sanos.<sup>43</sup> El análisis de asociación arrojó que existe el riesgo de desarrollar LEIGB y LEIGA en ausencia del RNAm de la IL-18 probablemente por falta de respuesta inmunológica de tipo Th1 lo cual favorece la progresión a cáncer, sin embargo en CaCU la expresión del RNAm de IL-18 sugiere que la proteína es probablemente un factor que favorece el crecimiento tumoral al modular el microambiente.

Sólo el 5.7% de las muestras de CN expresaron la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-18, mientras que en lesiones premalignas y CaCU no se encontró expresión de este gen. Estos resultados se ven respaldados por otro estudio realizado en el laboratorio de Investigación Clínica por Padilla-Islas (datos no publicados).<sup>54</sup> quien analizó las mismas muestras para buscar el RNAm de las 2 subunidades de IL-12. Ninguna muestra de lesión intraepitelial y CaCU expresó el mensajero de p35 ni de p40. Solo 9 muestras de CN expresaron el mensaje de IL-12p35 y 2 muestras el de IL-12p40; Las dos muestras que expresaron el RNAm de la IL-18R $\alpha$  expresaron el mensaje de IL-12p35 pero no de IL-12p40. Es posible que en estas muestras los transcritos de p40 hubieran pasado a proteína y se secretaran como IL-12p75 o como homodímero p40-p40, ambos capaces de unirse al receptor de IL-12 y por lo tanto de inducir la expresión de IL-18R $\alpha$ . La falta de expresión de IL-18R $\alpha$  en muestras de CN positivas a una de las cadenas de IL-12, probablemente se deba a la falta de expresión del heterodímero funcional IL-12p75. Se ha reportado que la producción de IL-12 es un prerrequisito para la expresión del IL-18R sobre la superficie de células T y NK.<sup>24,26,35,38</sup> La capacidad de IL-18 para favorecer la respuesta Th1 está determinada por la expresión selectiva del IL-18R sobre las células Th0 y Th1, de manera que la falta de expresión del mensajero de la IL-12 y de la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-18, pueden sugerir una modulación negativa de la respuesta inmune Th1. Esta propuesta se respalda por los estudios realizados por Carvajal-Franco (datos no publicados)<sup>55</sup> quien analizó algunas muestras que incluí en mi estudio, y reporta que el 95% de muestras con LEIGB, LEIGA y CaCU expresan el RNAm de TGF- $\beta_1$ , lo cual nos podría sugerir la inmunosupresión en LEIGB, LEIGA y CaCU por esta citocina. La inmunosupresión en CaCU ha sido fundamentada por otros autores como Alcocer-González y col., quienes informan que las muestras de cáncer cervical, presentan una expresión predominante de citocinas inmunosupresoras las cuales

desregulan la respuesta inmune específica de tumor.<sup>9</sup> La expresión de los 2 mensajeros en las muestras de CN probablemente se deba por que presentan proceso inflamatorio.

Por otra parte, la respuesta inmune celular tiene un papel importante en el control de las neoplasias asociadas a VPH, existen estudios que reportan reducción de los niveles de expresión de citocinas tipo I en lesiones cervicales inducidas por VPH. De las muestras analizadas en nuestro estudio, el 60% presentaron infección por VPH y no expresaron el RNAm de la IL-18 y sólo el 25 % presentaron tanto la infección por VPH como el mensajero de la IL-18. Estos resultados concuerdan con los reportados por de Gruijl y col., quienes reportan frecuencias bajas de expresión del RNAm de citocinas tipo I en el sitio de infección de lesiones cervicales asociadas a VPH. En un estudio *in vitro* realizado por Cho y col., observaron que la expresión del oncogén E6 del VPH 16 puede evadir la inmunovigilancia a través de la IL-18, sugiriendo que una vez que E6 se une a IL-18, IL-18 puede ser degradada por vía de la ubiquitinación.<sup>45</sup> Por otra parte Lee y colaboradores (2001), a través de ensayos de competencia *in vitro*, sugieren que las proteínas extracelulares E6 y E7 del VPH-16 pueden inhibir la producción local de IFN- $\gamma$  inducida por IL-18, al impedir la unión de la IL-18 a la cadena  $\alpha$  de su receptor inhibiendo los efectos de la cascada río abajo que sigue a la activación del receptor de la IL-18.<sup>46</sup> Por lo tanto, estos resultados apoyarían la hipótesis de que es posible que el VPH esté modulando la respuesta inmunológica de manera que favorezca su persistencia en el tejido epitelial, contribuyendo así a la patogénesis viral y a la carcinogénesis.

## CONCLUSIONES

1. La mayor proporción de muestras que expresaron el mensajero de la IL-18 se observó en muestras de CN y CaCU y disminuye en lesiones premalignas, no se detectó el RNAm de la IL-18R $\alpha$  en lesiones precancerosas ni en CaCU. Solo el 5.7% de las muestras de CN expresaron el mensajero de la IL-18R $\alpha$ . Estos resultados sugieren una modulación negativa de la respuesta inmune Th1 en lesiones premalignas y en CaCU.
2. Del total de las muestras que expresaron el RNAm de la IL-18, el 25.7% presentaron una expresión mínima, el 70.3% una expresión moderada y el 4% tuvieron una expresión alta. Los resultados sugieren que los niveles de expresión del mensajero de esta citocina disminuyen significativamente en las etapas premalignas del CaCu, lo que posiblemente se esté reflejando en una falta de respuesta inmunológica hacia la infección por VPH o hacia las células en proceso de transformación.
3. El análisis de asociación indica que en ausencia del RNAm de la IL-18 hay riesgo de desarrollar LEIGB y LEIGA, probablemente por falta de respuesta inmunológica de tipo Th1 que favorece la progresión a cáncer; sin embargo, en CaCU la expresión del RNAm de IL-18 sugiere que la proteína es probablemente un factor que favorece el crecimiento tumoral.
4. El 60% de las muestras VPH positivas, no expresaron el mensajero de la IL-18 y solamente el 25% de las muestras presentaron tanto la infección por VPH como el mensajero de la IL-18. El 71% de las muestras que fueron VPH-16 positivas, no expresaron el mensajero de la IL-18. Estos hallazgos sugieren que probablemente el VPH 16 puede estar modulando la respuesta desencadenada por esta citocina, a favor de la persistencia de la infección y la lesión.

La falta de expresión del RNAm de la IL-18, y de IL-18R $\alpha$  tanto en lesiones precancerosas como en CaCU en conjunto nos sugieren una modulación negativa de la respuesta inmune Th1. Es probable también que la respuesta Th1 esté abatida debido a niveles mínimos de expresión de IL-18 e IL-18R $\alpha$  y que ésta alteración se deba a las funciones atribuidas a la proteína E6 del VPH para

modular la respuesta desencadenada por esta citocina, por lo que es importante indagar los posibles mecanismos involucrados.

**Perspectivas del trabajo.**

Puesto que el estudio fue realizado a nivel de expresión del RNAm, surgen inquietudes sobre la expresión de esta citocina en el proceso de la carcinogénesis cervical: es importante investigar si el mensaje se está traduciendo a proteína y cuál es el nivel de expresión de la IL-18 y la IL-18R $\alpha$  en el espectro de citología normal a CaCU. Es primordial también saber si la proteína pro-IL-18 se está procesando a la forma madura, biológicamente activa, para de esta forma saber como se comporta la expresión de IL-18 en la historia natural del CaCU.

## REFERENCIAS

1. Tjiong MY, Out TA, Schegget JT, Burger MP, Vange NV. Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: A review. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 9-17.
2. Gariglio P, Rangel LM. Virus y Cáncer. *Salud Pública de Mex* 1992; 34(3):1-15.
3. Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol* 2003; 16:1-17.
4. Serman F. Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus del papiloma humano. Perspectivas en prevención y tratamiento. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2002; 67(4):318-323.
5. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2003. *Salud Pública Mex* 2005; 47(2):171-187.
6. Nicol AF, Gomes-Fernandes AT, Bonecini-Almeida MG. Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection – Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(1):1-12.
7. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, *et al.* Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998;113:183-189.
8. Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:2436-2440.
- 9.- Alcocer-Gonzalez JM, Berumen J, Tamez-Guerra GR, Bermudez-Morales MV, Peralta-Zaragoza O, Moreno J. In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* 2006;19(3):481-491.
10. Van-Poelgeest MI, Nijhuis ER, Kwappenberg KM, Hamming IE, Wouter-Drijfhout J, Fleuren GJ. Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV 16 L1, E2 and E6 antigens during HPV 16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer* 2006;118(3):675-683.
11. Fernández AP, Goncalves MA, Duarte G, Cunha FQ, Simoes RT, Donadi EA. HVP 16, HVP 18, and HIV infection may influence cervical cytokine intralesional levels. *Virology* 2005, 334(2):294-298.
12. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJLM, Snijders PJF. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J. Clin. Pathol* 2005;58:1096-1100.



13. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 209-220.
14. Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, *et al.* Interleukin-12 and Interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998; 101(6):1441-1452.
15. Mitra R, Singh S, Khar A. Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5:1-19.
16. Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest* 1993; 91: 1005-1010.
17. Davis CB, Gillies SD. Immunocytokines: amplification of anti-cancer immunity. *Cancer Immunol immunother* 2003; 52:297-308.
18. Annemieke DJ, Mariette I, Van-Poelgeest E, Jeanette M, Van DH, Wouter DJ. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with Impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 2004;64(15):5449-55.
19. Guimaraes GM, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: Current concepts. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(1):1-9.
20. Hazelbag S, Fleuren GJ, Baelde JJ, Schuurin E, Kenter GG, Gorter A. Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001;83(2):235-43.
21. Pages F, Vives V, Sautés FC, Fossiez F, Berger A, Cugnenc PH, *et al.* Control of tumor development by intratumoral cytokines. *Immunology Lett* 1999; 68:135-139.
22. Cho D, Song H, Man KY, Houh D, Young HD, Park H. Endogenous Interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 2000;60:2703-2709.
23. Liew FY, McInnes IB. Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response. *Ann Rheum Dis* 2002;61(II):ii100-ii102.
24. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin immunol* 2000; 12(1):59-63.
25. Sugawara I. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes infect* 2000; 2(10):1257-1263.
26. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses. *Annu Rev. Immunol* 2001; 19:423-474.

27. Soheir AL, Eissa MD, Samar A, Zaki MD, Shereen M, El-Maghraby MD. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J. Egyptian Nat.* 2005;17(1):51-55.
28. Gaggero A, De Ambrosis A, Mezzanzanica D, Piazza T, Rubartelli A, Figini M. A novel isoform of pro-interleukin-18 expressed in ovarian tumors is resistant to caspase-1 and -4 processing. *Oncogene* 2004;23(45):7552-7560.
29. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 213-219.
30. Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol and immunopathol* 2002; (88):1-12.
31. Reddy P. Interleukin-18: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):405-410.
32. Sergi B, Penttila I. Interleukin 18 receptor. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18:55-61.
33. Vidal VF, Mendoza L, Telleria N, Salado C, Valcarcel M, Gallot N. Clinical and experimental approaches to the pathophysiology of interleukin-18 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006. 14:125-131.
34. Kim SH, Reznikov LL, Stuyt RJL, Selzman CH, Fantuzzi G, Hoshino T, Young HA, Dinarello CA. Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R $\beta$  chain. *J Immunol* 2001; 166:148-150.
35. Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. Selective expression and functions of Interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 1998; 188(8):1485-1492.
36. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J* 1999; 13:2195-2202.
37. Han MY, Zheng S, Yu JM, Peng JP, Guo QS, Wang JL. Study on Interleukin-18 gene Transfer into human breast cancer cells to prevent tumorigenicity. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; 5(4):472-476.
38. Logan TF, Robertson MJ. Interleukin 18 and 21: biology, mechanisms of action, toxicity, and clinical activity. *Curr Oncol Rep.* 2006;8(2):114-119.
39. Lorey SL, Huang YC, Sharma V. Constitutive expression of Interleukin-18 and Interleukin-18 receptor mRNA in tumour derived human B-cell lines. *Clin Exp Immunol* 2004; 136:456-462.
40. Takahashi HK, Weitz SG, Iwagaki H, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. Hypothesis: the antitumor activities of statins may be mediated by IL-18. *J Leukoc Biol* 2006;80(2):215-219.

41. Naumnik W, Chyczewska E, Kovalchuk O, Talalaj J, Izycki T, Panek B. Serum levels of Interleukin-18 (IL-18) and soluble interleukin-2 receptor (sIL-12R) in lung cancer. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004; 49:246-251.
42. Yamashita K, Iwasaki T, Tsujimura T, Sugihara A, Yamada N, Ueda H. Interleukin-18 inhibits lodging and subsequent growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow. *Oncol reports* 2002; 9: 1237-1244.
43. Riedel F, Adam S, Feick P, Haas S, Gotte K, Hormann K. Expression of IL-18 in patients with head and Neck squamous cell carcinoma. *J Mole Med* 2003; 13:267-272.
44. Martone T, Bellone G, Pagano M, Beatrice F, Palonta F, Emanuelli G. Constitutive expression of interleukin-18 in head and neck squamous carcinoma cells. *Head Neck* 2004;26(6):494-503.
45. Cho YS, Kang JW, Cho M, Cho CW, Lee S, Cho Y-K, et al. Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18. *FEBS Lett* 2001;501:139-14.
46. Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, et al. Both E6 and E7 oncoproteins of Human Papillomavirus 16 Inhibit IL-18-Induced IFN- $\gamma$  production in Human peripheral blood mononuclear and NK Cells. *J Immunol* 2001; 167:497-504.
47. Lee KA, Cho KJ, Kim SH, Lim JS, Cho DH, Song Ms. IL-18 E42A mutant is resistant to the inhibitory effects of HVP-16 E6 and E7 oncogenes on the IL-18-mediated immune response. *Cancer Lett* 2005; 229(2):261-270.
48. Akahiro J, Konno R, Ito K, Okamura K, Yaegashi N. Impact of serum interleukin-18 levels as a prognostic indicator in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2004;9(1):42-46.
49. Hu H, Fai TK, Ni CY, Lu J, Feng P, Tieh CC. Expression of interleukin-18 by nasopharyngeal carcinoma cells: A factor that possibly initiates the massive leukocyte infiltration. *Hum Pathol* 2004;35:722-728.
50. Arici A, Matalliotakis I, Goumenou A, Koumantakis G, Vassiliadis S, Mahutte NG. Altered expression of interleukin-18 in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003;80:889-894.
51. Thong-Ngam D, Tangkijvanich P, Lerknimitr R, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Diagnostic role of serum interleukin-18 in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2006;12(28):4473-4477.
52. Gunel N, Coskun U, Sancak B, Gunel U, Hasdemir O, Bozkurt S. Clinical importance of serum interleukin-18 and nitric oxide activities in breast carcinoma patients. *Cancer*. 2002;1;95(3):663-667.

53. Merendino RA, Gangemi S, Ruello A, Bene A, Losi E, Lonbardo G. Serum levels of interleukin-18 and ICAM-1 in patients affected by breast cancer: preliminary considerations. *Int J Biol Markers*. 2001;16(2):126-9.
54. Padilla-Islas F. Expresión de IL-12 en mujeres con lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino. Tesis 2006.
55. Carbajal-Franco E. Análisis semicuantitativo del RNAm de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e IL-4 y sus implicaciones en la carcinogénesis cervical. Tesis 2005.