

I. Las verrugas y el cáncer genital. Modelo para la terapéutica genética del cáncer cervical.

Alejandro García Carrancá

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70-228, C.P. 04510, México D.F.

(Recibido, Diciembre 15, 1992; aceptado, febrero 2, 1993)

Resumen

El cáncer del cuello uterino constituye un problema de enorme magnitud en México. La mayoría de los tumores de esta región contienen secuencias integradas de papilomavirus humanos (HPV) y expresan activamente dos oncogenes virales cuyos productos son responsables de la immortalización de las células tumorales. Existe un gen de papilomavirus, denominado E2, que reprime la expresión de los oncogenes y que normalmente se pierde durante la integración de las secuencias virales al genoma celular. Recientemente iniciamos la producción de tumores humanos en ratones atímicos a partir de líneas celulares derivadas de carcinomas de la región genital. Los tumores generados con células HeLa crecen menos al ser inoculados con preparaciones de DNA que contienen el gen E2 de papilomavirus. Consideramos de gran importancia la posibilidad de desarrollar este modelo para evaluar la utilidad de genes específicos en la terapéutica genética de los tumores del cuello uterino.

Palabras clave: Cáncer genital-Papilomavirus-Terapéutica genética

Summary

Cervical carcinoma represents the major cause of death among Mexican women. Most of these tumors contain integrated sequences of human papillomavirus (HPV), that actively express two viral oncogenes. These oncogenes are responsible for the immortalized state of tumoral cells. A viral gene, known as E2, represses the expression of viral oncogenes in HPV types infecting the genitals. The E2 gene is usually lost during viral DNA integration into the cellular genome. We have produced tumors in athymic (nude) mice with human cell lines derived from cervical carcinomas. Tumors generated with HeLa cells grow less when inoculated with DNA preparations containing the papillomavirus E2 gene. Development of this model appears to be of interest in the evaluation of different genes for the therapy of cervical carcinomas.

Key words: Genital cancer-Papillomaviruses-Gene therapy.

Introducción

El cáncer cérvico-uterino constituye la primera causa de muerte por neoplasias entre las mujeres mexicanas. Las neoplasias del cuello uterino presentan manifestaciones clínicas diversas, pero la mayoría de ellas tiene al menos un componente en común, la presencia de secuencias de DNA de ciertos tipos de papilomavirus humanos (HPVs). Las infecciones con HPV provocan proliferaciones benignas de los epitelios, como las verrugas de la piel y los condilomas

en los genitales. En algunas ocasiones la infección con estos virus contribuye al desarrollo de proliferaciones malignas (carcinoma) de los genitales¹.

Hasta ahora se han descrito más de 65 tipos diferentes de HPV, los cuales se han dividido en dos grupos funcionales, los que infectan la piel y los que infectan las mucosas orales y genitales². Los que infectan preferentemente los genitales pueden ser nuevamente divididos en dos grupos; los que se

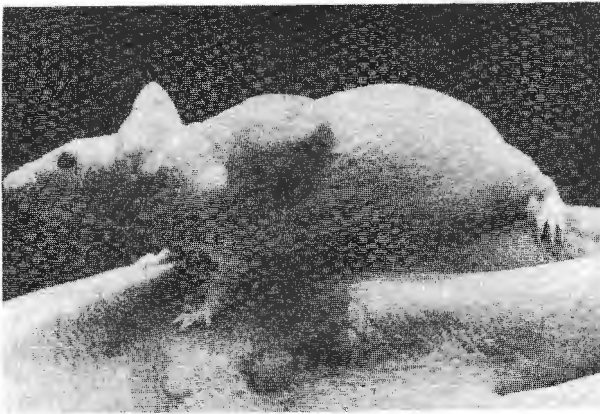


Fig. 1. Las verrugas y el cáncer genital. Las infecciones con papilomavirus humanos provocan proliferaciones de los epitelios y, en ocasiones, participan en el desarrollo de lesiones malignas. Se muestran las verrugas producidas por un HPV cutáneo y el tumor producido en un ratón atímico por la inyección subcutánea de una línea celular humana que contiene secuencias integradas de un HPV genital.

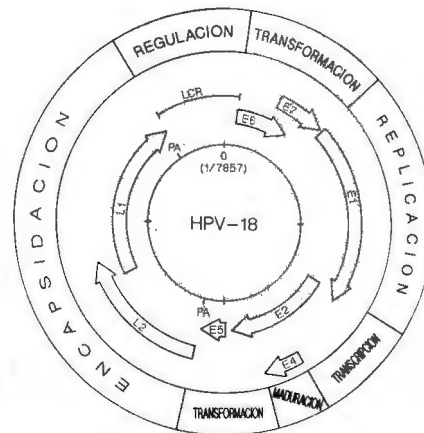


Fig. 2. Mapa genético de un papilomavirus genital. Se muestra el mapa genético del HPV tipo 18. Los genes tempranos (E) y tardíos (L) se transcriben con la misma orientación. Se indica la principal función de los diversos genes, así como la región que controla la expresión de los oncogenes E6 y E7 (LCR) y las señales de poliadenilación de los transcritos (pA).

encuentran en lesiones benignas (como los tipos 6 y 11) y aquellos que se encuentran frecuentemente en lesiones malignas (como los tipos 16, 18, 31, 33 y 35). La participación de los HPV en el desarrollo del cáncer genital fue sugerida desde hace algunos años; sin embargo, hasta hace poco tiempo se obtuvieron evidencias suficientes para involucrarlos directamente en el desarrollo del cáncer del cuello uterino³.

En la mayoría de los tumores de la región genital, el genoma de los HPV se encuentra presente en forma integrada al genoma celular⁴. Si bien no se ha detectado un patrón específico de integración en el DNA celular, la integración produce generalmente la ruptura de una región del genoma viral que contiene los genes E1 y E2⁵. El genoma de los HPV contiene dos oncogenes que immortalizan las células epiteliales humanas. Los productos de estos oncogenes (E6 y E7) interactúan con los productos de dos genes supresores de tumores, p53 y retinoblastoma (Rb). E6 interactúa y promueve la degradación de p53, mientras que E7 impide el funcionamiento normal del producto de Rb en el control del ciclo celular.

Existe un gen de los HPV, denominado E2, cuyo producto es un factor de transcripción que se une al DNA viral al reconocer la secuencia consenso ACCG-NNNN-CGGT (donde N puede ser cualquier base). La proteína E2 contribuye a la regulación de la expresión de los genes virales de diversas formas; activa fuertemente la transcripción al unirse a secuencias distantes del promotor, la reprime al unirse a secuencias localizadas cerca del promotor y,

finalmente, coopera con el producto del gen E1 para activar la replicación viral^{6,7}. Desde hace tiempo sabemos que, en el caso de los HPV que infectan los genitales, la proteína E2 reprime la transcripción de los oncogenes E6 y E7⁸, al unirse a una secuencia del DNA que se encuentra repetida dos veces, justo arriba de la caja TATA del promotor para E6 y E7⁹. En el caso de los tumores del cuello uterino, las secuencias virales se encuentran generalmente integradas, con pérdida de la región temprana que incluye al gen E2. Esto significa que, en los carcinomas cervicales, los oncogenes del virus (E6 y E7) se expresan fuertemente en ausencia del producto E2.

Con base en lo descrito anteriormente parece que la expresión continua de los oncogenes virales es incompatible con la presencia del producto del gen E2. Si el crecimiento de las células tumorales depende de la expresión continua de los oncogenes virales, surge la pregunta ¿Puede el gen E2 ser utilizado para inhibir la expresión de los oncogenes y, por consiguiente, el crecimiento de los tumores que contienen HPV integrado? La posibilidad de utilizar un gen viral para la terapéutica genética de tumores cervicales abre expectativas para el tratamiento de este tipo de tumores que tanto afectan a la población de nuestro país.

Material y Métodos

Se utilizaron ratones atímicos de la cepa Swiss-nu/nu (Taconic, New York) de cuatro a seis semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en el laboratorio en

jaulas con cubiertas y filtro. Las células HeLa (derivadas en 1951 de un carcinoma epiteloides y que contienen secuencias integradas del HPV tipo 18) se cultivaron en medio de Eagle, modificado por Dulbecco, en presencia de suero fetal de bovino al 10%, en una atmósfera húmeda que contenía 5% de CO₂. Las células se tripsinizaron de manera habitual, se resuspendieron en medio sin suero y se tiñieron con azul de tripano para determinar su número y viabilidad. La mayoría de las veces se obtuvieron preparaciones con más del 95% de viabilidad. Finalmente, las células se resuspendieron para tener un millón en 200 µl de medio sin suero. Cada ratón recibió una inyección subcutánea de un millón de células HeLa.

Resultados

a. Desarrollo del modelo. Formación de tumores de origen humano. Con el objeto de contar con un sistema modelo para ensayar nuevas estrategias para la terapéutica del cáncer genital, utilizamos la capacidad tumorigénica de algunas líneas celulares derivadas de neoplasias de la región genital. Las células HeLa (ATCC CCL2) fueron las primeras obtenidas de tejido humano que se mantuvieron continuamente por cultivo seriado. Esta línea se obtuvo, hace más de 40 años, a partir de la biopsia de un adenocarcinoma cervical de una mujer norteamericana, Henrietta Lacks. En el laboratorio utilizamos estas células para generar tumores en ratones atómicos. A la fecha, hemos inoculado más de 60 ratones con dichas células y siempre hemos obtenido formación de tumores. El tiempo de aparición de los tumores depende de la cantidad de células inoculadas; generalmente, un millón de células producen la aparición de tumores en 3 - 5 días. En la Fig. 1 se muestra el aspecto característico de algunas verrugas de la piel y el de un tumor de células HeLa, generado en un ratón atómico.

b. Efecto del gen viral E2 sobre el crecimiento de una línea humana que contiene secuencias de HPV. En nuestro laboratorio iniciamos una serie de experimentos que pretenden abordar esta pregunta ¿Puede ser útil el gen E2 de papilomavirus para la terapéutica genética de tumores humanos que contienen secuencias de HPV?. Para tal fin, se inició la generación de tumores de células HeLa en ratones atómicos (Figs. 1 y 3). Seleccionamos estas células porque contienen secuencias integradas del HPV tipo 18 (Fig. 2), el genoma viral se encuentra incompleto, debido a su integración al genoma celular, y los oncogenes E6 y E7 se expresan fuertemente en ausencia del producto del gen E2¹⁰.

Inicialmente, inyectamos un millón de células HeLa, por vía subcutánea, en 17 ratones atómicos. Después de unos días, al aparecer los tumores, ensayamos el efecto de inyecciones repetidas de preparaciones de DNA que contienen el gen E2 sobre el crecimiento de los tumores. Las inyecciones de DNA se realizaron directamente sobre los tumores de los ratones, en un volumen final de 200 µl. Como controles utilizamos preparaciones sin DNA, DNA que contiene el gen CAT, o una versión mutada del propio gen E2. Se encontró que de los 10 tumores inyectados con DNA de un plásmido que contiene el gen E2, 7 tuvieron un crecimiento menor, en ocasiones la mitad, que el de los 7 controles utilizados (un tumor no tratado, uno inyectado con solución salina, dos con un plásmido que contiene el gen CAT y tres con una versión mutada del propio gen E2). Los otros tres tumores tratados con E2 crecieron ligeramente menos que los controles, los cuales, excepto uno, crecieron más que los tratados con el gen E2. Es decir, la inyección repetida de tumores de células HeLa con DNA del gen E2 resulta en un crecimiento menor de los tumores respecto del que tienen aquellos inyectados con otro DNA o con solución salina (no se muestra).

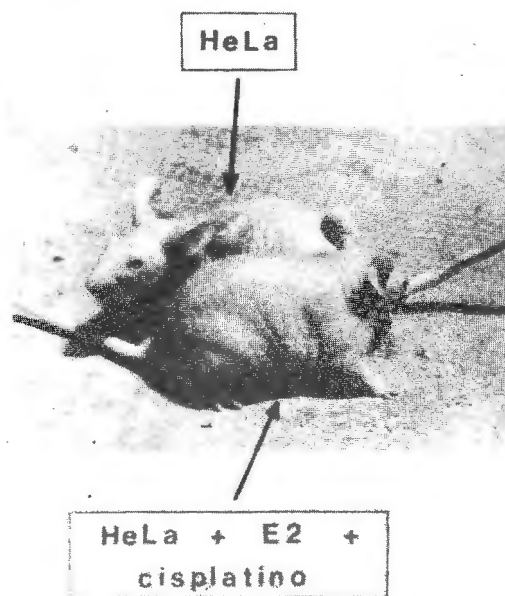


Fig. 3. Tumores de células humanas en ratones atómicos. Se muestran dos ratones inyectados simultáneamente con un millón de células HeLa. Uno de ellos no recibió ningún tratamiento (HeLa) y el otro recibió tres dosis (200 µg/dosis) de una preparación de DNA con el gen E2 y cisplatino (50 µg/dosis).

Discusión

La terapéutica genética ha pasado de las especulaciones a una realidad tangible en pocos años. El primer ensayo clínico se realizó en 1990 y, a la

fecha, más de una docena de protocolos han sido aprobados en todo el mundo. En la gran mayoría de esos protocolos se utilizan vectores virales, principalmente retrovirus, para la transferencia de los genes y, recientemente, se comenzaron a utilizar preparaciones de DNA envueltas en vesículas lipídicas (liposomas).

Nuestro trabajo pretende conocer la posible utilidad de un gen de papilomavirus (E2) para reducir el crecimiento de tumores de origen cervical que contienen secuencias virales integradas. Para ello, hemos producido tumores con células de neoplasias humanas (HeLa, principalmente) en ratones atímicos. Los tumores tratados con un plásmido que expresa el gen E2 crecen, en general, menos que aquellos tratados con otros plásmidos. Estos resultados son muy alentadores y nos impulsan a continuar este

estudio para conocer si los tumores producidos con otras líneas también crecen menos por efecto del gen E2. Además, la posibilidad de inyectar preparaciones de DNA directamente en los tumores constituye una alternativa atractiva para la terapéutica genética de algunas neoplasias.

Los resultados son aún preliminares, pero abren la posibilidad de utilizar este sistema modelo para desarrollar estrategias para la terapéutica genética de los tumores cervicales en México.

Agradecimientos. El autor desea agradecer a todos los miembros de su laboratorio, en especial a Ronit Ovseiovich, por su participación y apoyo continuo durante el desarrollo de este proyecto. Asimismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARMA) y a la Fundación Miguel Alemán A.C. por el apoyo económico brindado.

Referencias

- zur Hausen H, Schneider A. The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. En: Salzman NP, Howley PM, eds. The papovaviridae, Vol 2, The Papillomaviruses. New York: Plenum Press, 1987:245-63.
- DeVilliers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63:4898-903.
- zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Science* 1991;254:1167-73.
- Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985;66:1515-22.
- Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: A possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* 1987;61:3295-8.
- Ham J, Dostatni N, Gauthier JM, Yaniv M. The papillomavirus E2 protein: A factor with many talents. *TIBS* 1991;16:440-4.
- Guido M, Zamorano R, Garrido E, Gariglio P, García-Carrancá A. Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J Gen Virol* 1992;73:1395-400.
- Thierry F, Yaniv M. The BPV-1 E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J* 1987;6:3391-7.
- García-Carrancá A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1988;62:4321-30.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-4.