



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PAPEL DEL VPH EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
INTERLEUCINA-2 (IL-2R) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÉRVIX**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LEONARDO TRUJILLO CIRILO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. BENNY WEISS STEIDER
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR:

Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Dra. REBECA LÓPEZ MARURE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

CD. MX. OCTUBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/903/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **9 de agosto de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **TRUJILLO CIRILO LEONARDO** con número de cuenta **405032495** con la tesis titulada **“PAPEL DE VPH EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA-2 (IL-2R) EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÉRVIX”**, realizada bajo la dirección del **DR. BENNY WEISS STEIDER**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Vocal: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Vocal: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
Vocal: DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de septiembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado (Becario: 339561/CVU: 632814).

Al **Programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la UNAM (PAPIIT IN-222118) por el apoyo financiero para realizar este proyecto.

A mi tutor, el **Dr. Benny Weiss Steider** por guiarme durante el desarrollo de la tesis.

A los miembros de comité tutor, **Dra. María de Lourdes Mora García y Dra. Rebeca López Marure.**

Agradecimientos Personales

Antes que nada, quiero agradecer al **Dr. Benny Weiss Steider** y a la **Dra. Rosalva Rangel Corona** por su tutoría, cada uno de sus comentarios contribuyeron a mi formación académica.

Agradezco la asesoría de la **Dra. Rebeca López Marure** y **Dra. María de Lourdes Mora García**, sus observaciones permitieron llevar a un buen termino el proyecto de doctorado.

Agradezco la participación y observaciones de los miembros del jurado de examen de grado, **Dr. Alberto Monroy García**, **Dr. Edelmiro Santiago Osorio**, **Dr. Luis Sánchez Sánchez** y **Dra. Elena Arechaga Ocampo**.

El presente trabajo fue realizado en el **Laboratorio de Oncología Celular** de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Agradezco particularmente al **Dr. Alberto Monroy García** por proporcionarnos la línea celular HeLa-shE6/E7.

Dedicatorias

*Todos mis éxitos están dedicados a mi madre **Guadalupe Cirilo Flores** por enseñarme con su ejemplo que el esfuerzo, la perseverancia y dedicación nos encamina al éxito.*

Índice

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Marco teórico	8
2.1. Interleucina-2 y su receptor IL-2R	8
2.2. Virus del papiloma humano y carcinogénesis cervical	11
2.3. Regulación génica del VPH en CC	12
2.4. Epigenética del cáncer y VPH	13
2.5. Microambiente tumoral	16
2.6. Linfocitos en el microambiente tumoral	17
3. Planteamiento del problema	20
4. Justificación	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	22
7. Estrategia experimental	22
8. Material y métodos	23
8.1 Condiciones del cultivo celular	23
8.2. Transformación y transfección	24
8.3. PCR de colonias	24
8.4. Extracción de RNA y RT-PCR	24
8.5. Ensayo de proliferación	25
8.6. Ensayo de Western blot	26
8.7. Citometría de flujo	26
8.8. Adquisición de datos y comparación de la expresión de RNA	27
8.9. Análisis estadístico	27
9. Resultados	28
9.1 Líneas celulares de CC asociadas al VPH expresan la subunidad IL-2R β y γ c, mientras que la expresión de la subunidad IL-2R α se induce con IL-2 exógena	28
9.2. Análisis de la expresión del IL-2R en tumores de CC y su asociación con el VPH	30
9.3. Transfección de los genes E6 y E7 del VPH en la línea celular C33A	32
9.4. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 transfectadas con los genes virales E6 y E7 del VPH expresan el IL-2R	34
9.5. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentan su proliferación con 10 UI de IL-2 exógena, mientras que 100 UI de IL-2 las inhibe	36
9.6. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentan su proliferación en co-cultivo con linfocitos heterólogos	38
9.7. La línea celular HeLa-shE6/E7 no responde a los estímulos con IL-2 exógena y no prolifera en co-cultivo con linfocitos heterólogos	39
10. Discusión	41
11. Conclusión	45
12. Perspectivas	45
13. Literatura citada	46
14. Apéndice. Artículo requisito para la obtención del grado	60

Resumen

El carcinoma de cérvix (CC) es una de las neoplasias más importantes a nivel mundial, teniendo una alta incidencia principalmente en los países en vías de desarrollo como es el caso de México. Las oncoproteínas virales E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH) son las principales responsables de la transformación neoplásica del CC, con capacidad de regular la expresión génica de diferentes citocinas. Entre ellas, la Interleucina-2 (IL-2) es una de las más importantes del sistema inmune que media la homeostasis de las células hematopoyéticas que expresan el receptor de IL-2 (IL-2R). A pesar de que este receptor es característico de las células linfoides se ha demostrado su expresión en líneas celulares de CC positivas al VPH (VPH+) a diferencia de las líneas celulares negativas (VPH-). La expresión del receptor aumenta en función del estadio tumoral, tal como sucede con E6 y E7. Estos antecedentes nos hicieron especular una estrecha relación entre el VPH y la expresión del IL-2R en el CC. Por tanto, este trabajo tuvo como finalidad analizar si la infección del VPH induce la expresión del IL-2R en las células de CC. Al revisar los datos del Genotype Tissue Expression Project (GTEx) y The Cancer Genome Atlas (TCGA) identificamos una mayor expresión de las subunidades del IL-2R en muestras de tumores de CC en comparación de tejidos de cérvix normales. Adicionalmente, una correlación significativa de la subunidad IL-2R β en tumores VPH+. Para responder a nuestra pregunta de investigación se realizó la transfección de los genes virales *E6* y *E7* del VPH en la línea celular C33A VPH- para evaluar si inducían la expresión del IL-2R. Nuestros resultados corroboran que las líneas celulares de CC VPH+ expresan altos niveles de IL-2R en comparación con las líneas celulares VPH-, y que modifican su proliferación a diferentes concentraciones de IL-2 exógena al igual que las células negativas al VPH que fueron transfectadas con los genes *E6* y *E7*. Nuestros resultados sugieren que las proteínas E6 y E7 del VPH contribuyen a inducir la expresión de IL-2R. Las células de CC podrían utilizar el IL-2R para impulsar una proliferación aberrante utilizando a la IL-2 como un factor de proliferación. Adicionalmente, se demuestra que las células transfectadas con los genes *E6* y *E7* también proliferan en co-cultivo con linfocitos heterólogos. Para corroborar que E6 y E7 estaban relacionadas con los efectos de proliferación en células de CC mediados por IL-2, se utilizó células derivadas de la línea celular HeLa en las que la expresión de E6/E7 se encuentra disminuida mediante shRNA. Encontramos que pierde la capacidad de responder a los estímulos de IL-2, de manera similar a lo que sucede con las líneas celulares VPH-. Finalmente, en este trabajo se discute la importancia del IL-2R como un posible mecanismo de escape inmune que utilizan las células tumorales.

Abstract

Cervical carcinoma (CC) is one of the most important neoplasms worldwide, having a high incidence mainly in developing countries, such as Mexico. The human papillomavirus (HPV) E6 and E7 viral oncoproteins are mainly responsible for the neoplastic transformation of CC, with the ability to regulate the gene expression of different cytokines. Among these, Interleukin-2 (IL-2) is one of the most important in the immune system that mediates the homeostasis of hematopoietic cells that express the IL-2 receptor (IL-2R). Although this receptor is characteristic of lymphoid cells, its expression has been demonstrated in HPV-positive CC cell lines (HPV+) as opposed to negative cell lines (HPV-). Receptor expression increases depending on the tumor stage, as occurs with E6 and E7. These antecedents made us speculate a close relationship between HPV and IL-2R expression in CC. Therefore, this work aimed to analyze whether HPV infection induces IL-2R expression in CC cells. By reviewing data from the Genotype Tissue Expression Project (GTEx) and The Cancer Genome Atlas (TCGA), we identified increased expression of IL-2R subunits in CC tumor samples compared to normal cervical tissues. Additionally, a significant correlation of the IL-2R β subunit in HPV+ tumors. To answer our research question, the viral genes E6 and E7 of HPV were transfected into the C33A HPV- cell line, in order to evaluate whether they induced the expression of IL-2R. Our results corroborate that HPV-positive CC cell lines express high levels of IL-2R compared to HPV-negative cell lines and that their proliferation modifies at different concentrations of exogenous IL-2, just like HPV-negative cells that were transfected with the E6 and E7 genes. Our results suggest that HPV proteins E6 and E7 contribute to inducing IL-2R expression. CC cells could use IL-2R to drive aberrant proliferation using IL-2 as a proliferation factor. Additionally, it is shown that cells transfected with the E6 and E7 genes also proliferate in co-culture with heterologous lymphocytes. To corroborate that E6 and E7 were related to the regulatory effects of the proliferation of CC cells mediated by IL-2, cells derived from the HeLa cell line in which the expression of E6/E7 is decreased by shRNA. We found that it loses the ability to respond to IL-2 stimuli, similar to what happens with HPV-cell lines. Finally, this work discusses the importance of IL-2R as a possible immune escape mechanism used by tumor cells.

1. Introducción

El carcinoma de cérvix (CC) es el cuarto cáncer más común en mujeres en todo el mundo [1]. En el 2018 se estimaron 570,000 casos de CC y 311,000 muertes por esta neoplasia, siendo más frecuentes en países en vías de desarrollo como los de América Latina, África y Asia [2]. Los estudios epidemiológicos sugieren que hay varios factores de riesgo que desencadenan el CC, sin embargo, el principal factor de riesgo son las infecciones recurrentes por el virus del papiloma humano (VPH), ya que se le encuentra en más del 95% de los tumores de CC [3]. En base a su asociación con las lesiones cervicales y el CC, los VPH se clasifican como de alto y bajo riesgo oncogénico [4]. El VPH tipo 16 se encuentra en aproximadamente el 50% de los casos de CC, seguido de los tipos virales VPH 18, VPH 45 y VPH 31 [5].

El CC es precedido por lesiones neoplásicas pre-invasoras que se producen en el epitelio cervical conocidas como lesiones intraepiteliales (LIE) de bajo y alto grado [6]. La carcinogénesis por los VPHs de alto riesgo está dada por las oncoproteínas virales E6 y E7 las cuales participan en el desarrollo y progresión del CC, a través de suprimir o activar a oncogenes y genes supresores de tumores que son esenciales en la proliferación celular y supervivencia [7, 8]. La oncoproteína E6 promueve la proliferación celular al inducir la degradación de la molécula reguladora de la apoptosis p53. La degradación de p53 favorece por un lado la entrada de la célula al ciclo celular, ya que no se induce a la proteína inhibidora de cinasas p21, y por otra parte se pierde la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis y con ello se favorece el crecimiento tumoral [9]. La oncoproteína E7 se une a la proteína del gen supresor de tumores retinoblastoma (*RBI*) con una alta afinidad a la región conocida como “pocket domains” [10]. La función de la proteína de retinoblastoma (pRb) es regular al factor de transcripción E2F mediante la formación de un complejo inhibitor sobre éste, de esta manera se reprime y regula la expresión de genes implicados en la proliferación celular [11]. E7 evita la interacción de pRb con E2F de tal forma que E2F se encuentra transcripcionalmente activo y promueve la expresión o represión de genes involucrados en el avance del ciclo celular de G1 a la fase S [12].

Sin embargo, la presencia de las proteínas virales no es suficiente para producir un cáncer invasor, la acumulación de alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores tumorales son cruciales para el desarrollo del CC [13]. Se sabe que solo un pequeño porcentaje de las infecciones por VPH progresan a una LIE, que la mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente y las que progresan a cáncer se desarrollan durante un periodo de 15 a 20 años posteriores a la infección [14]. Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que el VPH por sí solo no puede hacer tumorogénicas a células primarias, necesita la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales [15]. Por tanto, se ha sugerido que factores adicionales son muy importantes para la progresión de las lesiones cervicales hacia un cáncer *in situ*. Las infecciones virales y eventos oncogénicos pueden generar estados de inflamación crónica donde las citocinas que secretan las células del sistema inmune tienen un papel muy importante y pueden inducir una transformación maligna [16]. El balance adecuado de citocinas pro- y anti-inflamatorias genera una respuesta anti-tumoral eficaz, sin embargo, los tumores pueden tener un beneficio de las citocinas del microambiente al expresar receptores afines a éstas.

Una de las citocinas más importantes en el sistema inmunológico debido a los efectos que desencadena en las células del sistema inmune, es la Interleucina-2 (IL-2). La IL-2 es una citocina que regula la proliferación, activación y diferenciación de los linfocitos T y B, promueve el crecimiento de células NK, estimula la síntesis de anticuerpos en linfocitos B y aumenta la actividad citolítica de células NK, también se conocen algunas funciones en células no linfoides [17]. Los efectos biológicos de IL-2 son mediados por la unión a su receptor, el receptor de Interleucina-2 (IL-2R), el cual se expresa en la mayoría de las células linfoides. La unión de IL-2 al IL-2R activa diferentes vías de señalización como JAK/STAT, que controla diferentes procesos homeostáticos y funcionales de las células linfoides antes mencionadas [18].

A pesar de que el IL-2R es característico de células linfoides se ha reportado que células tumorales expresan las subunidades del IL-2R [19-22]. Se ha reportado que las células tumorales inhiben su proliferación con altas concentraciones de IL-2 exógena, mientras que la IL-2 endógena promueve el crecimiento e inhibición de la apoptosis *in vitro* [23, 24].

En este mismo sentido, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las líneas celulares de CC, CALO e INBL ambas positivas al VPH, expresan las subunidades β y γ_c del IL-2R. Asimismo, se ha confirmado que este heterodímero es funcional y señala a través de la vía JAK3/STAT5 promoviendo la proliferación de las células tumorales (Fig. 1) [25]. De igual manera, se ha demostrado que las células de CC sintetizan y secretan IL-2, el bloqueo de la subunidad IL-2R α e IL-2R β con anticuerpo específicos inhibe la proliferación celular, sugiriendo que las líneas celulares de CC (CALO e INBL) tiene una dependencia por esta citocina para mantener su proliferación [26]. Se ha propuesto que la IL-2 tiene un efecto autocrino sobre las células de CC de manera análoga a lo que sucede con los linfocitos.

También, se ha reportado que líneas celulares de CC (CALO e INBL) responden a IL-2 exógena de una manera diferencial a la concentración. A 10 UI/mL de IL-2 se induce la proliferación celular, mientras que a 100 UI/mL se induce la muerte de las células de CC por apoptosis [27-29]. En las células de CC se presenta una fosforilación constitutiva de JAK3 [28], la fosforilación de JAK3 podría explicar el efecto dual de la IL-2 a diferentes concentraciones (Fig. 1). A partir de estos resultados se propone un efecto dual de la IL-2 sobre las células tumorales de CC.

Estos antecedentes demuestran que la asociación de IL-2 a su receptor es importante para mantener la proliferación de las células de CC VPH+. El efecto autocrino de IL-2 sobre las células tumorales pudiera generar un mecanismo de escape inmunológico, ya que de manera normal los linfocitos T secretan IL-2 al microambiente en respuesta a la activación del sistema inmune para ejercer sus efectos sobre células inmunológicas que expresan el IL-2R. Sin embargo, al expresar las células tumorales el IL-2R pueden secuestrar la IL-2 como un factor de crecimiento y consecuentemente disminuir los niveles de la citocina necesarios para activar a los linfocitos [26].

Sin embargo, a pesar de que IL-2 tiene un efecto sobre las células de CC a través del IL-2R, trabajos previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que líneas celulares de CC negativas al VPH (VPH-) no responden a estímulos con IL-2 exógena [30]. Estas líneas celulares de CC no fueron infectadas por el VPH y por tanto no presenta las alteraciones genéticas que el virus induce sobre

las células que infecta para promover su proliferación y evadir la respuesta inmune. Las oncoproteínas virales tiene la capacidad de alterar la expresión génica de la célula huésped [31].

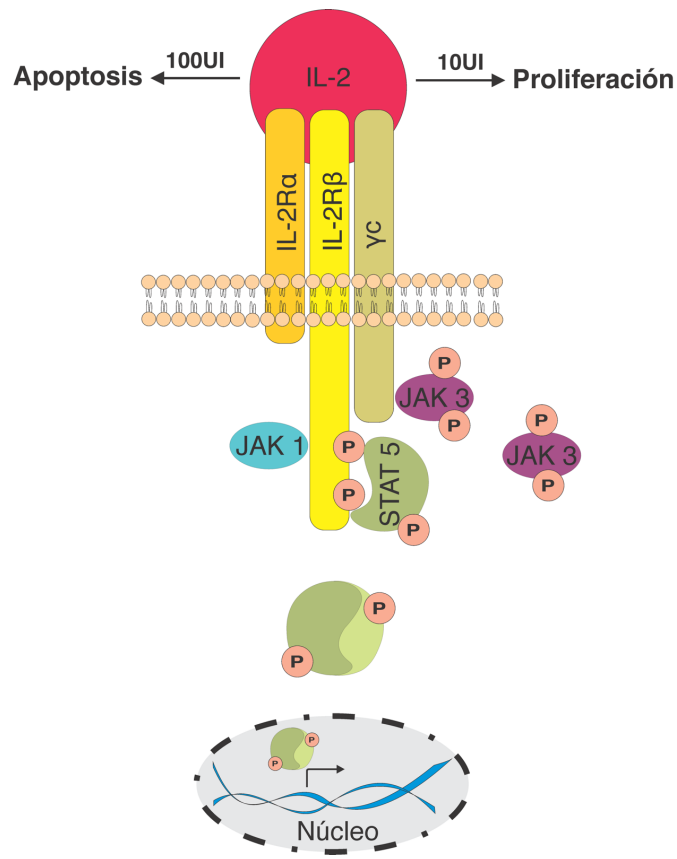


Figura 1. Receptor de Interleucina-2 en células de CC. Las líneas celulares de CC; CALO e INBL expresan la subunidad α , β y γ c del IL-2R. La activación del IL-2R promueve la fosforilación de los dominios citoplasmáticos de la subunidad IL-2R β y activación de la vía de señalización JAK/STAT. A 10 UI de IL-2 exógena se activa el receptor y promueve la proliferación de las células tumorales, mientras que 100 UI induce su muerte por apoptosis. En las células CALO e INBL se presenta una fosforilación constitutiva de JAK3 y ausencia de fosforilación de JAK1, lo cual podría explicar el efecto dual de IL-2 en este tipo de células tumorales [28]. Tomando y modificado de Boyman y Sprent. Nature 2012 [17].

Debido a estos antecedentes, se especuló que el VPH podría ser el responsable de inducir la expresión del IL-2R sobre las células tumorales y de esta forma responder a la IL-2 secretada por

células del sistema inmune en respuesta a la infección viral o por las propias células tumorales. La expresión de IL-2R en células de CC VPH+ y la disponibilidad de IL-2 en el microambiente tumoral puede ser uno de los mecanismos que contribuye a la proliferación aberrante de estas células. Caso contrario de las células de CC VPH- las cuales no podrían mantener su proliferación por IL-2, deben de utilizar mecanismos diferentes para proliferar. La estrecha relación del VPH y el complejo IL-2/IL-2R en las células tumorales nos planteó la posibilidad de demostrar que el VPH induce la expresión del IL-2R sobre las células tumorales. Para responder a nuestra pregunta de investigación nos basamos en un modelo *in vitro* de transfección de los genes virales *E6* y *E7* del VPH, donde sus proteínas son las principales responsables de la transformación oncogénica de las células infectadas por el VPH.

2. Marco Teórico

2.1. Interleucina-2 y su receptor IL-2R

La Interleucina-2 (IL-2) es una glucoproteína monomérica de ~15 kDa secretada principalmente por los linfocitos T CD4+ [32], una vez secretada la IL-2 es consumida localmente (a distancias cortas) de forma autocrina o paracrina por células CD25+ [33]. Se han predicho concentraciones de IL-2 de 0.1-1 nM en el microambiente cercano (<10 μ m) de las células secretoras [34], mientras que la concentración en el sobrenadante de células en cultivo es mucho más baja (pM) [35]. Debido a su tamaño la IL-2 tiene una vida media muy corta de 10-85 minutos en suero [36-37]. IL-2 es una citocina pleiotrópica que ejerce múltiples funciones a través de la interacción con su receptor análogo [38].

El receptor de Interleucina-2 (IL-2R) está compuesto de tres distintas subunidades; una subunidad IL-2R α (CD25 o *tac*), una subunidad IL-2R β (p75 o CD122) y una subunidad γ c (gama común o p64) [39, 40]. Estas subunidades trabajan en conjunto para coordinar y dar especificidad a las señales dadas por IL-2. La subunidad IL-2R α de manera independiente conforma un receptor para IL-2 de baja afinidad ($K_d=10^{-8}$ M), que es incapaz de emitir señales. Por su parte, la subunidad IL-2 β en conjunto con la subunidad γ c son necesarias y suficientes para emitir señal, conformando un

heterodímero de afinidad intermedia ($K_d=10^{-9}$ M). Mientras que, la asociación no covalente de las tres subunidades IL-2R α , IL-2R β y γ c resulta en un receptor de alta afinidad ($K_d=10^{-11}$ M) para su ligando IL-2 [41-43] (Fig. 2).

La subunidad IL-2R β también forma parte del receptor para IL-15, mientras que la subunidad γ c es un componente de los receptores para; IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 [44]. Los genes de las subunidades que conforman el IL-2R se localizan en diferentes cromosomas; el gen *IL-2R α* se localiza en el cromosoma 10p14-15, compuesto de ocho exones, *IL-2R β* está localizado en el cromosoma 22q13.1, compuesto de 10 exones, mientras que el gen para γ c se localiza en el cromosoma Xq13.1, organizado por ocho exones [39]. Cada subunidad del IL-2R está regulada independientemente. IL-2R α se expresa transitoriamente en linfocitos T y se induce transcripcionalmente por la estimulación del receptor de células T (TCR) [45], por citocinas como; IL-1, IL-2, IL-17, IL-12, IL-15, TNF- α y TGF- β [46, 39]. Por su parte, IL-2R β se expresa constitutivamente en linfocitos NK, NKT, CD8+, monocitos y macrófagos, regulando su expresión por la estimulación del TCR y citocinas como; IL-2 y IL-4 [47, 39]. La subunidad γ c se expresa constitutivamente en todas las células hematopoyéticas y se aumenta su expresión por IL-2 e IFN- γ [39, 46].

El complejo IL-2/IL-2R señala a través de la heterodimerización de los dominios citoplasmáticos de IL-2R β y γ c [48]. La fosforilación de residuos de tirosina en ambas subunidades activa las vías JAK/STAT, MAPK y PI3K [42]. Cada una de estas vías regula la expresión de diferentes genes que están implicados en mantener una adecuada respuesta inmune, mediante la proliferación, activación, diferenciación, supervivencia y apoptosis de las células que expresan IL-2R [42, 49, 50]. La internalización del complejo IL-2/IL-2R regula los niveles de señalización, degradando a IL-2, IL-2R β y γ c en vesículas, mientras que la cadena IL-2R α es reciclada vía endosomas a la membrana celular [51]. La expresión de IL-2 y su receptor IL-2R se ha reportado en diferentes tipos de cáncer, en el CC se ha demostrado que promueve la proliferación de las células tumorales [52], sin embargo, se desconoce si las infecciones del VPH pueden regular la expresión del complejo IL-2/IL-2R para promover la carcinogénesis tumoral.

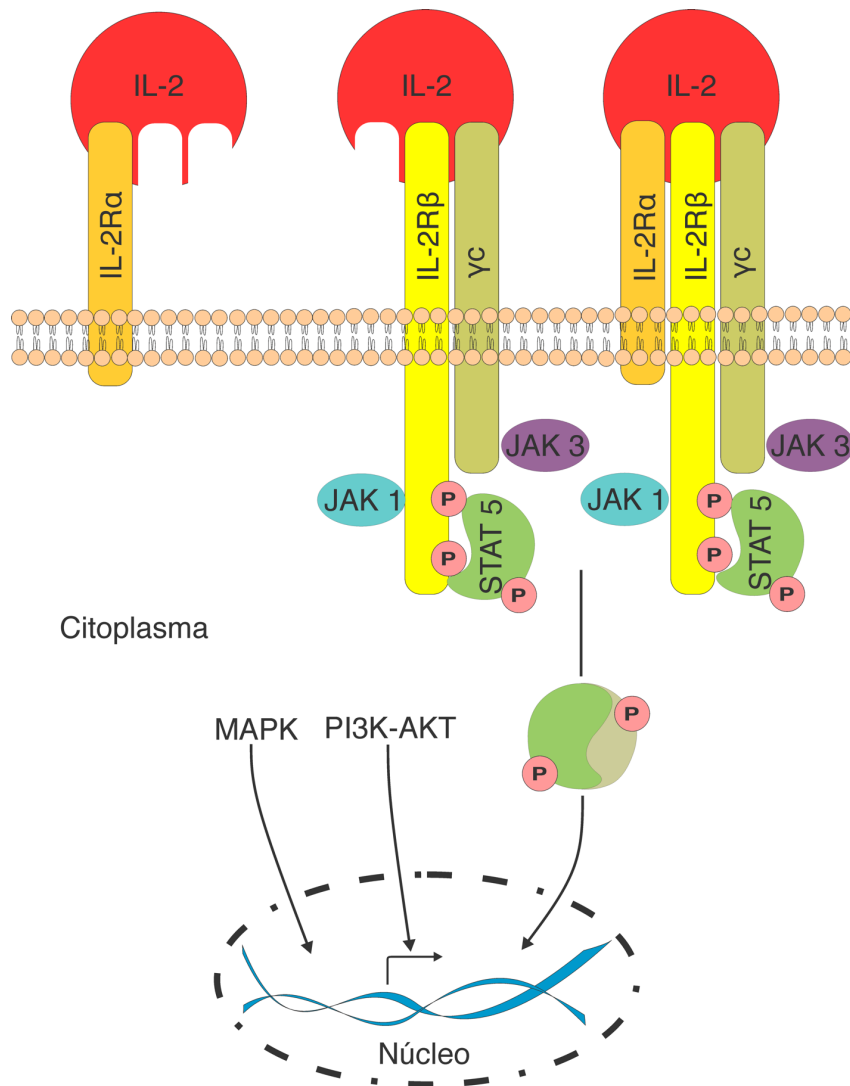


Figura 2. Receptor de Interleucina-2 (IL-2R). La IL-2 se une a la subunidad IL-2R α de forma independiente para conformar un receptor de baja afinidad que es incapaz de señalizar, la unión de IL-2 a la subunidad IL-2 β y γ c forma un IL-2R de mediana afinidad capaz de señalizar a través de la vía JAK/STAT. La unión de IL-2 a las tres subunidades del IL-2R genera un receptor de alta afinidad. La unión de IL-2 al receptor permite la fosforilación de los dominios citoplasmáticos de la subunidad IL-2R β y γ c, y la posterior activación de las cinasas JAK y la translocación de STAT al núcleo. IL-2 regula la expresión de diversos genes implicados en la proliferación de las células linfoides mediante la activación de las vías de señalización JAK/STAT, MAPK y PI3K-AKT. Tomando y modificado de Boyman y Sprent. Nature 2012 [17].

2.2. Virus del papiloma humano y carcinogénesis cervical

Existen más de 200 tipos de VPHs, clasificados filogenéticamente en 5 géneros (α , β , γ , μ y δ) basados en el análisis de su secuencia de DNA [53]. Cada tipo viral ha evolucionado para infectar diferentes epitelios del cuerpo humano, por ejemplo, el tejido cutáneo y mucosas [54]. La mayoría de los tumores de CC son causados por infecciones persistentes de alguno de los genotipos de VPH de alto riesgo (VPH-HR), especialmente los tipos; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 [55, 5]. La mayoría de las infecciones por VPHs-HR son eliminadas espontáneamente por el sistema inmune en un periodo de 12 a 24 meses [56-58]. Los VPHs infectan células en división, manteniendo un número de 50-100 copias de su DNA en forma episomal por célula y para generar una infección persistente o desarrollo de una lesión, es probable que las células que se infectan inicialmente sean células troncales epiteliales o células tipo troncal [59-61].

Todos los VPHs contienen un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8 kb, con ocho o nueve marcos de lectura abierto (ORF) dependiendo el tipo viral. El genoma del virus ha sido dividido en tres regiones debido a sus características funcionales y de expresión; una región temprana (E: Early) que codifica genes implicados en la replicación y mantenimiento del genoma viral (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* y *E7*); una región tardía (L: Late), la cual codifica proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2) del virus y por último una región larga de control (LCR: Long Control Region), que contiene los sitios de regulación de la transcripción y replicación viral [62]. Los genes de expresión temprana del VPH *E1* y *E2* codifican para una helicasa y un factor de transcripción respectivamente que mantiene la replicación y expresión viral [63]. *E4* codifica para una proteína que induce la degradación de filamentos de citoqueratina, mientras que los genes *E5*, *E6* y *E7* son considerados oncogenes virales [64, 65]. *E5* estimula el crecimiento celular mediante la formación de complejos con diferentes receptores, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y el receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSFR) [66, 67]. Por su parte, las oncoproteínas *E6* y *E7* son las principales responsables de la transformación neoplásica al estimular la síntesis de DNA, proliferación celular e inhibición de la apoptosis [68, 65].

La oncoproteína E6 forma un complejo con la proteína del gen supresor de tumores *P53*, induciendo su degradación vía proteosoma. De manera normal p53 detiene el ciclo celular cuando hay algún daño en el DNA para ser reparado, pero si el daño es severo se induce a la apoptosis. Adicionalmente E6 interfiere con otras proteínas pro-apoptóticas como, Bak, FADD y procaspasa 8, de esta manera se inhibe la muerte celular [69]. Por otra parte, E6 induce la expresión de hTert (telomerasa transcriptasa inversa) a través de su unión y activación de una serie de factores como, c-Myc, E6AP, Max, Sp1 y NFX1-91, favoreciendo la inmortalización celular [70]. E6 también tiene la capacidad de unión a la gran familia de proteínas con dominios Z (PDZ), que participan en el mantenimiento de las uniones epiteliales y adhesión de células basales. Al inducir la degradación de estas proteínas se favorece un estado de disrupción de la adhesión, polaridad y diferenciación de los epitelios [71, 70].

La oncoproteína E7 se une a la proteína pRb del gen supresor de tumores *RB*, que actúa como un inhibidor de la actividad transcripcional del factor E2F que promueve expresión de genes implicados en la síntesis de DNA y progresión de la fase G1 a S [72]. Adicionalmente, E7 interacciona con p107 y p103, ambos reguladores negativos de la actividad de E2F y, por otra parte, interacciona con los inhibidores dependientes de ciclinas (CKIs) p21 y p27, induciendo su degradación [73, 65]. La modulación de cada blanco de E7 favorece la proliferación celular y la inestabilidad genómica [63]. Es evidente que las proteínas del VPH son las responsables de la transformación neoplásica al modular la maquinaria de la célula huésped, la inestabilidad genómica y la expresión aberrante de genes son eventos cruciales para consolidar el CC.

2.3. Regulación génica del VPH en CC

Se ha demostrado que las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH-HR son necesarias y suficientes para inmortalizar a queratinocitos humanos [74, 75]. Sin embargo, se necesita la acumulación de alteraciones genéticas para favorecer un fenotipo neoplásico. Los modelos de evolución tumoral describen un proceso de expansión clonal guiado por la acumulación de alteraciones genéticas que son seleccionadas de forma Darwiniana [76, 77]. Estas alteraciones genéticas incrementan la proliferación, angiogénesis y un fenotipo invasivo [76]. Las mutaciones somáticas son las

principales alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo tumoral [78]. Mutaciones en *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *STK11* y *KRAS* se han encontrado frecuentemente en CC [79, 80]. La expresión de genes que de manera normal se restringen a un linaje en particular, y que, sin embargo, éstos se expresan en células tumorales, es un factor que favorece la carcinogénesis tumoral.

Se ha demostrado que las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH regulan la expresión de genes que favorecen el desarrollo del CC [81]. El VPH es capaz de alterar la expresión de genes en procesos como la adhesión, proliferación, apoptosis y migración [82, 83]. Las oncoproteínas virales regulan negativamente la expresión de genes implicados en la diferenciación celular de queratinocitos, este retraso en la diferenciación normal contribuye a la carcinogénesis cervical [31]. De igual manera E6 y E7 aumentan la expresión de genes que son inducidos por NF κ B y AP-1, mientras que disminuyen la expresión de STAT-1, IFN- α y β , todos ellos implicados en la respuesta inmune [84]. La expresión de ambas oncoproteínas en queratinocitos es suficiente para alterar la expresión de factores angiogénicos como, maspina, trombospondina-1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e Interleucina-8, favoreciendo la progresión del CC [85]. De igual manera la oncoproteína E6 es capaz de formar un complejo con el factor de transcripción Sp1 (E6-Sp1) y migrar al núcleo para inducir la expresión de TGF- β e IL-10 [86]. De manera general, E6 y E7 alteran la expresión génica de la célula huésped, por un lado, favorecen la expresión de proteínas que contribuyen al desarrollo tumoral y adicionalmente la expresión de proteínas que normalmente no se expresan en las células que infecta el VPH [87]. Para alterar la expresión génica las proteínas del VPH deben ser capaces de modular la maquinaria de transcripción y recientemente se ha descrito su capacidad para regular la maquinaria epigenética.

2.4. Epigenética del cáncer y VPH

El CC es resultado de diversas alteraciones genéticas y epigenéticas. Se ha demostrado que el VPH modifica las marcas epigenéticas presentes en el genoma de la célula huésped, esto permite mantener una infección persistente, la transformación celular y el desarrollo hacia un cáncer invasivo mediante la desregulación de la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores [88].

Las marcas epigenéticas controlan los niveles de compactación de la cromatina, que están relacionados con la accesibilidad de la maquinaria transcripcional y si un gen se encuentra activo o inactivo [89]. Las principales marcas epigenéticas son la metilación del DNA y la modificación de histonas (acetilación, metilación, fosforilación, etc) [90]. La metilación del DNA es una de las marcas epigenéticas más estudiadas debido a que regula la expresión genética directa. Las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) son las encargadas de agregar covalentemente un grupo metilo a las citosinas de la secuencia de DNA [90]. Por lo general, las citosinas que son metiladas se encuentran asociadas a una guanina (CpG). Las CpG se encuentran preferente agrupadas en islas de CpG, las cuales están presentes en aproximadamente el 70% de las secuencias promotoras de los genes [91]. La modificación de histonas es otra de las marcas epigenéticas que regula la expresión de los genes. La acetilación de histonas se asocia por lo general con la activación de la transcripción y, por el contrario, la metilación de histonas con la inactivación de la expresión génica [92]. Las histonas acetiltransferasa (HAT) e histonas desacetilasas (HDAT) son las enzimas encargadas de agregar o quitar grupos acetilo de los extremos de las histonas [93]. Por su parte las enzimas histona metiltransferasa (HMT) e histonas desmetilasas (HDMT) son las encargadas de agregar o quitar respectivamente grupos metilo [90]. Las marcas epigenéticas se modifican de manera constante por diversos factores ambientales y durante el desarrollo [94].

Se ha observado en diferentes tipos de cáncer que alteraciones de la maquinaria epigenética son eventos clave para favorecer el desarrollo tumoral. Las mutaciones de ganancia o pérdida de función de las enzimas epigenéticas generan patrones de metilación y remodelación de la cromatina aberrantes [95]. Alteraciones de la maquinaria epigenética en el cáncer, ocasiona el silenciamiento de genes supresores tumorales, activación de oncogenes y la expresión inapropiada o la expresión de genes que no corresponden al linaje celular correcto [96] (Fig. 3). Se ha reportado que diferentes genes que codifican para citocinas están alterados epigenéticamente, la expresión aberrante de citocinas anti y pro-inflamatorias promueve la carcinogénesis debido a que las células del sistema inmune responden inadecuadamente [97]. La expresión aberrante de la proteína de muerte celular programada (PDL-1), la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), la inmunoglobulina de células T y el dominio de mucina-3 (TIM-3), el gen 3 de activación de

linfocitos (LAG-3) y el inmunorreceptor de células T con dominios de Ig e ITIM (TIGIT) genera un microambiente tolerante que permite que las células tumorales evadan la respuesta inmune [98, 99]. Se ha demostrado que diferentes virus que infectan al ser humano modifican la maquinaria epigenética, por ejemplo, la proteína E6 del VPH 16 interacciona con DNMT-1 estimulando su actividad enzimática [100] y al mismo tiempo promueve la transcripción aberrante del gen *DNMT-1* [101]. La expresión aberrante de DNMT-1 y DNMT3 se asocia a lesiones cervicales NIC3 y carcinomas cervicales [102]. Los genes que frecuentemente son metilados en el CC, son las moléculas de adhesión 1 (CADM1), cadherina1 (CDH1), la proteína cinasa asociada a la muerte 1 (DAPK1), mielinas (MAL), dominio PR 14 (PRDM14) y la transcriptasa inversa de telomerasa (TERT) [103]. Adicionalmente, E6 y E7 regulan la maquinaria de modificación de histonas, E6 interacciona con la enzima HAT p300/CBP para inhibir la actividad de las HDAT. Por su parte, E7 interacciona con HDAC para promover la transcripción de E2F2 y de esta forma promover la progresión del ciclo celular [104], E7 reprograma las marcas epigenéticas al inducir la expresión de HMT; EZH2, KMD6A y KDM6B [105]. La regulación de la maquinaria epigenéticas es un evento clave durante la transformación oncogénica del VPH [103] que contribuye a generar un microambiente adecuado para el desarrollo tumoral [106].

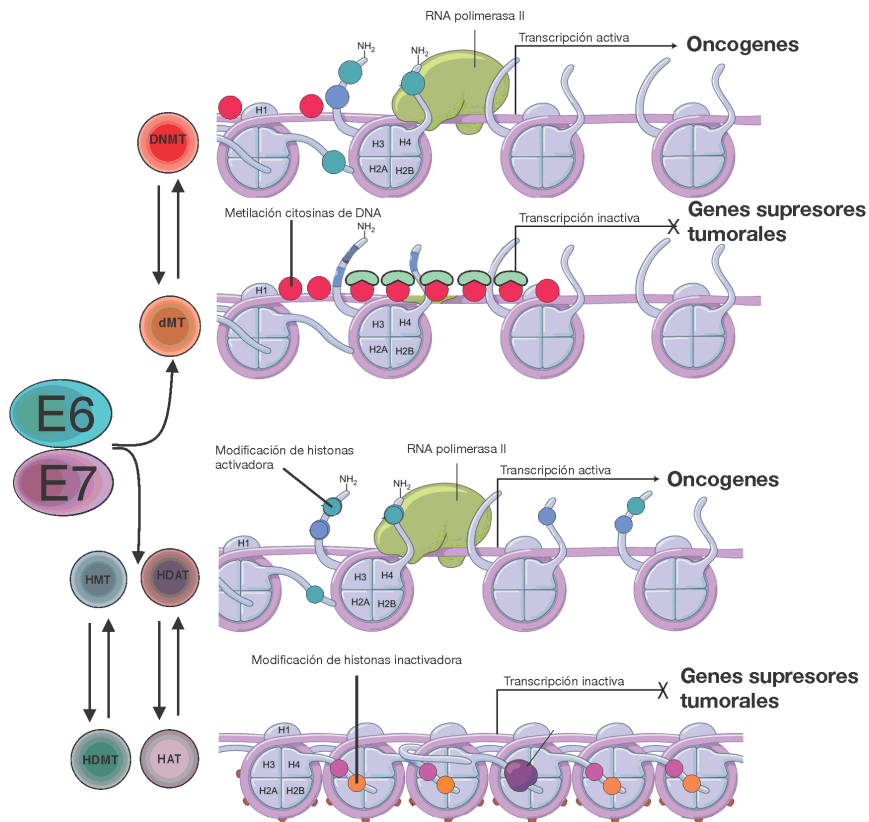


Figura 3. Regulación epigenética del VPH. Las proteínas virales E6 y E7 del VPH interaccionan con la maquinaria de remodelación de la cromatina. E6 interacciona con las enzimas DNMT1 y HAT, activa su actividad enzimática para inhibir o activar la expresión de genes que promueven el desarrollo tumoral. E7 interacciona con HDAT y HMT para modifica las marcas epigenéticas de las histonas, de esta forma también se regula la expresión génica al remodelar la cromatina de las células infectadas por el VPH [103]. Las proteínas virales pueden silenciar la expresión de los genes supresores tumorales y al mismo tiempo aumentar la expresión de los oncogenes [96]. Tomando y modificado de Matouk y Marsden. *Circ Res* 2008 [107].

2.5. Microambiente tumoral

Uno de los factores adicionales que contribuye al desarrollo tumoral es el microambiente tumoral (MT), está constituido por células tumorales, células no tumorales y moléculas solubles [108, 109]. Las células no tumorales que pertenecen al sistema inmune juegan un rol clave para la eliminación o desarrollo de las células cancerosas. Los perfiles de secreción de citocinas y quimiocinas del MT determinan si se elimina el tumor o se promueve su desarrollo [109]. Las células tumorales pueden

alterar este balance de citocinas al tener la capacidad de secretar citocinas y quimiocinas con el fin de reclutar a más células del sistema inmune y de esta manera exacerban estados de inflamación en el microambiente del tumor [110]. Algunas de las citocinas que favorecen la actividad anti-tumoral son IL-12, TRAIL e IFN- γ , mientras que IL-1, IL-6, IL-17 e IL-23 aumentan la progresión tumoral [109]. TGF β es una citocina anti-inflamatoria que es secretada por células cancerígenas, células mieloides y linfocitos T, altas concentraciones de esta molécula favorece procesos angiogénicos a través del factor de transcripción SMAD [111]. Mientras que, IL-1, TNF- α e IL-6 promueven la metástasis mediante la degradación de la matriz extracelular por metaloproteinasas (MMP) vía NF κ B y STAT 3 [112].

La mayoría de los tumores de CC es el resultado de las infecciones por el VPH, por tanto, la secreción de citocinas anti-virales al microambiente es normal, sin embargo, la capacidad que tienen las células de CC para secretar citocinas puede alterar el balance de los factores solubles que liberan las células del sistema inmune y promover el desarrollo tumoral. La expresión del IL-2R en las células de CC demuestra que debe tener un papel muy importante en el MT [25]. Los linfocitos secretan IL-2 al medio para promover su activación y diferenciación como resultado de una activación inmune, sin embargo, la IL-2 también puede ser un factor de proliferación de las células tumorales que expresan el IL-2R.

2.6. Linfocitos en el microambiente tumoral

Una de las células características en el MT son los linfocitos T, son necesarios para la eliminación de células tumorales [113]. Los linfocitos T no solo se encuentran en el área circundante del MT, también se encuentran en el núcleo de los tumores donde mantiene una comunicación más cercana con las células tumorales [114-116]. La infiltración de linfocitos T se asocia con un buen pronóstico en cáncer de piel [114], mama [117], pulmón [118], ovario [119], colon [120] y CC [116]. Los linfocitos T se diferencian de manera normal en células T CD4+ y T CD8+, cada uno con funciones específicas durante la respuesta inmune [121]. Una vez activados los linfocitos T CD8+ se diferencian a linfocitos T citotóxicos (TCL), estos linfocitos serán los responsables de eliminar a las células tumorales del MT [122, 123]. La actividad citotóxica de los CTL está dada a través de

la vía FAS (apoptosis) o mediante la liberación de moléculas citotóxicas como granzimas y perforinas [121]. Los linfocitos CTL eliminan a las células tumorales más inmunogénicas del MT [124]. Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ serán los encargados de generar un estado antitumoral en el MT mediante la secreción de diferentes factores inflamatorios [125]. En el CC hay una respuesta de linfocitos T CD4⁺ reprimida contra los antígenos del VPH [126]. La activación de los linfocitos T CD4⁺ permite su polarización hacia un perfil Th-1 y Th-2, cada uno de estos perfiles secreta diferentes citocinas que repercuten en diferentes funciones de la respuesta inmune [127]. Los linfocitos Th-1 van a secretar IL-2 para promover la activación y proliferación de los linfocitos T CD8⁺ y CTL [128] y en menor cantidad secretan IFN- γ y TNF- α , citocinas que promueven la respuesta inmune de macrófagos y células NK contra células tumorales [129]. Una mayor proporción de linfocitos CD8⁺ en el CC permite la eliminación de células tumorales y evita procesos metastásicos [130].

Sin embargo, el VPH modula la respuesta inmune celular en el MT, disminuye la presencia de linfocitos T CD8⁺ y favorecer la presencia de linfocitos Th-2 [131]. IL-2 e IL-4 marcan la polarización hacia linfocitos Th-2, estos linfocitos secretan IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e IL-10 necesarias para activar la respuesta inmune humoral [132]. Las citocinas Th-2 por lo general se consideran factores inmunosupresores de la respuesta inmune contra el CC, pueden suprimir la producción de IFN- γ y directamente repercutir en la activación de CTL, macrófagos y NK, inhibir la expresión del MHC en las células tumorales y disminuir la presentación antigénica [133]. Las células de CC producen IL-4 para favorecer el fenotipo Th-2 y regular negativamente la producción de IFN [134]. IL-10 es una de las citocinas Th-2 que tiene un papel relevante en la carcinogénesis del CC, hay una correlación positiva entre el VPH, estadio FIGO y la presencia de IL-10 [135, 136]. La presencia de IL-10 no solo genera un ambiente inmunosupresor en el MT, también promueve la activación de STAT3 el cual se une al promotor viral URR y con ello se propicia transcripción de E6 y E7 [137]. Por su parte, E6 y E7 inducen la expresión de IL-10 en un sistema de retroalimentación que promueve la transformación neoplásica del CC [138].

Dentro del grupo de linfocitos T CD4⁺ hay un subgrupo de linfocitos denominados Th-17 con características inflamatorias que secretan IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22, estas citocinas median la

inmunidad contra patógenos extracelulares al reclutar neutrófilos y estimular la generación de moléculas antimicrobianas [139]. Los linfocitos Th-17 y sus moléculas de secreción se asocian con un estado inflamatorio crónico y la generación de enfermedades autoinmunes [140]. En el CC se presenta un aumento de linfocitos Th-17 y un ambiente enriquecido de IL-17 que se correlaciona con el estadio FIGO [141, 142]. Los fibroblastos son instruidos por las células de CC para secretar la quimiocina CCL-20 y favorecer el reclutamiento de linfocitos Th-17 al MT [143]. Por su parte, las células de CC expresan altos niveles de CCL-20, esto permite la infiltración de linfocitos Th-17 vía CCR6 al centro del tumor [144]. Se ha postulado que las citocinas secretadas por linfocitos Th-17 generan un estado inflamatorio crónico en el MT, permitiendo las infecciones persistentes del VPH, el establecimiento de la infección viral y como consecuencia la progresión del CC [145].

Otro linaje de linfocitos T CD4⁺ que tiene un papel importante en la respuesta inmune son los linfocitos T reguladores (Tregs) [146]. La principal función de las Tregs es modular o suprimir la función de diferentes células (Th) inflamatorias para prevenir la generación de enfermedades autoinmunes [147]. Los Tregs son reclutadas al sitio de infección para evitar una inflamación crónica, esto puede limitar la inmunidad tumoral y generar tolerancia hacia las células tumorales [148]. La IL-2 es una de las citocinas necesarias e insustituibles para el desarrollo, supervivencia y función de los Tregs (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) [147]. Los linfocitos Tregs median sus efectos supresores por diferentes mecanismos, 1) la secreción de citocinas inhibitorias como IL-10, IL-35 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), 2) acción citolítica por granzimas y perforinas, 3) disrupción metabólica por el consumo de IL-2 y AMPc, 4) inhibición de la maduración o función de células dendríticas vía CTL4-CD80/CD86 [148]. En el microambiente del CC se ha reportado una mayor proporción de linfocitos Tregs y de sus productos de secreción (IL-10, IL-35 y TGF- β) [141]. En el MT los linfocitos Tregs se encuentran preferentemente infiltrados en los tumores de CC como mecanismo para impedir la infiltración de linfocitos CTL y Th-1 [149]. Los linfocitos Tregs y sus moléculas de secreción generan un ambiente tolerante que permite la persistencia del VPH y la progresión del CC hasta un estado metastásico [150, 151]. Las células Tregs permiten que los linfocitos CTL sean tolerantes hacia antígenos del VPH en el MT [152]. El perfil de linfocitos en el MT y sus productos de secreción van a determinar si se elimina la infección del VPH y las células tumorales o si se promueve el desarrollo del CC. Al estar disponible la IL-2 en

el microambiente tumoral, y dado que las células de CC expresen un IL-2R funcional, genera un circuito de retroalimentación que puede promover la proliferación de las células de CC en el MT.

3. Planteamiento del problema

Este trabajo se realizó en base a las siguientes consideraciones. A pesar de que se ha demostrado que la IL-2 promueve la proliferación de líneas celulares de CC a través de su receptor IL-2R, se desconoce la relación que guardan el VPH y la presencia del IL-2R sobre las células tumorales, ya que se sabe que es un receptor que se expresa casi exclusivamente en las células linfoides.

Al encontrar que las líneas celulares de CC negativas al VPH no responden a estímulos con IL-2 exógena, caso contrario de lo que sucede con las líneas celulares de CC positivas al VPH en las cuales se induce su proliferación o inducción de la apoptosis, nos sugiere una estrecha relación entre el VPH y la presencia de IL-2R. Posiblemente las proteínas oncogénicas del VPH inducen la expresión del IL-2R en las células tumorales, el cual puede responder a IL-2 y contribuir al desarrollo del tumor. Cabe destacar que el microambiente tumoral se encuentra asociado a un estado inflamatorio, resultado de la secreción de citocinas como la IL-2 por parte de las células del sistema inmunológico en respuesta al VPH y células tumorales. Por tanto, nos preguntamos si las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH pueden regular la expresión del IL-2R en las células de CC.

4. Justificación

A pesar, de los programas implementados de detección oportuna del CC y la vacunación contra los VPHs más oncogénicos, el CC sigue siendo un problema de salud pública en el mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo donde la disparidad económica y las deficiencias del sector salud contribuyen al aumento de los casos de CC. En México el CC es la segunda causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres, tiene una tasa de mortalidad de 10 muertes por cada 100,000 mujeres entre 40 y 49 años, y está aumentando con la edad llegando a 55 muertes en mujeres mayores de 80 años [www.inegi-2012.org]. Los programas de vacunación del sector salud contra

el VPH 16 y 18 solo están destinados a niñas menores de 12 años que no han tenido relaciones sexuales, esto limita su uso a un sector de la población de riesgo. Adicionalmente, la vacunación contra el VPH no se aplica de manera universal en los programas de vacunación, por tanto, la población sin recursos está en riesgo de desarrollar CC. Es importante mencionar que la inmunidad contra el VPH es evidente después de un periodo de 20 años, el tiempo promedio en el que tarda en desarrollarse el tumor.

Recientemente se ha reportado que la IL-2 y su receptor IL-2R se expresa en diferentes neoplasias malignas, en el CC la expresión de IL-2R activa diferentes vías de señalización que regulan la proliferación de las células tumorales en presencia de IL-2 exógena. Sin embargo, aun no queda claro el papel que desempeña IL-2/IL-2R en el desarrollo del CC. Se ha descrito que el VPH regula la expresión genética de la célula infectada durante la transformación oncogénica, se desconoce si el receptor de IL-2R puede contribuir activamente a la transformación y si este es un blanco de las proteínas virales. La IL-2 se ha utilizado como tratamiento contra diferentes tumores con mucho éxito, sin embargo, se desconoce si en los pacientes que no responden al tratamiento se pueda deber a la presencia del IL-2R en las células tumorales. El demostrar que el VPH regula la expresión de IL-2R encaminaría los estudios enfocados en entender como repercute la expresión del IL-2R y la administración de IL-2 en los tratamientos anti-tumorales. Este trabajo demostrara si hay una relación entre el VPH y la expresión de IL-2R en las células de CC como un primer acercamiento para aclarar los mecanismos moleculares que utiliza el VPH para consolidar un tumor. El entendimiento de estos mecanismos permitirá generar estrategias más eficaces contra el CC, encontrando posibles biomarcadores o blancos terapéuticos.

5. Hipótesis

El receptor de Interleucina-2 (IL-2R) es característico de células linfoides, promueve la proliferación, activación y diferenciación de las células del sistema inmune. Se ha demostrado que líneas celulares de CC asociadas al VPH expresan el IL-2R y que su expresión es mayor en función del estadio tumoral. Por su parte, las líneas celulares de CC negativas al VPH no responde a IL-2 exógena debido a que no expresan el IL-2R. Las células de CC que expresan el IL-2R utilizan a la

IL-2 como un factor de proliferación dependiendo de su concentración. Se ha demostrado que las proteínas virales E6 y E7 del VPH aumentan su expresión conforme aumenta el estadio tumoral. Además, E6 y E7 regulan la expresión de diferentes proteínas de la respuesta inmune como las citocinas para generar un desbalance de las citocinas pro- y anti-inflamatorias, y de esta forma generar un microambiente pro-tumoral. Esto demuestra una relación entre el VPH y el IL-2R, por tanto, *la transfección de los oncogenes virales E6 y E7 en células de CC negativas al VPH regulará la expresión del IL-2R y modulará la proliferación en respuesta a IL-2 exógena.*

6. Objetivos

6.1. General

- Analizar si las proteínas virales E6 y E7 del VPH 16 y 18 regulan la expresión del IL-2R en células de CC y su efecto sobre la proliferación celular en respuesta a IL-2 exógena.

6.2. Particulares

- Para confirmar la relación entre el VPH y el IL2R, se analizará la expresión del IL-2R en líneas celulares y en tumores de CC.
- Replicar los genes virales *E6/E7* del VPH 16 y 18 en las bacterias XL-1blue.
- Expresar los oncogenes *E6/E7* del VPH16 y 18 la línea celular C33A.
- Determinar si las proteínas E6 y E7 regulan la expresión del IL-2R en las células C33A.
- Analizar si la IL-2 exógena regula la proliferación de las células transfectadas con los genes virales *E6/E7* del VPH 16 y 18.

7. Estrategia experimental

Para cumplir el objetivo general de este trabajo nos basamos en un modelo *in vitro*, utilizando la línea celular C33A negativa al VPH. Las células C33A fueron transfectadas con los plásmidos pLXSN16E6E7 y pLXSN18E6E7 los cuales contienen el bicistron E6/E7 del VPH 16 y 18

respectivamente. Posteriormente, se realizaron ensayos de RT-PCR y citometría de flujo para determinar la expresión de las subunidades α , β y γ c del IL-2R en las células C33A transfectadas, así como la presencia de las proteínas virales E6 y E7. Se realizaron ensayos de proliferación en presencia de 10 y 100 UI de IL-2 y co-cultivos con linfocitos para analizar la respuesta de las células tumorales a IL-2 exógena. Se utilizó la línea celular HeLa-shE6/E7 en la cual se presenta una baja expresión de E6/E7 para confirmar que las proteínas virales E6 y E7 median los efectos de IL-2.

8. Material y métodos

8.1. Condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares de CC, CALO (VPH18+) e INBL (VPH18+) fueron establecidas en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES ZARAGOZA [153] y fueron cultivadas con medio RPMI-1640 (Microlab., México). Las líneas celulares, C33A (VPH-), SiHa (VPH 16+), HeLa (VPH 18+) y CaSki (VPH 18+) fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC., Manassas, VA, USA) y cultivadas con medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco., Grand Island, NY, USA). Los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco., Grand Island, NY, USA), 100 U/mL penicilina, y 100 μ g/mL de estreptomina (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA). Todas las células fueron cultivadas a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda. La línea celular HeLa-shE6/E7 fue proporcionada por el Dr Alberto Monroy García [154]. Los linfocitos de sangre periférica (LSP) fueron colectados de donantes sanos con un tubo de vacutainer (BD Bioscience., CA, USA)) con EDTA. Para separar a los LSP, la sangre fue centrifugada a 400g x 30 minutos con Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y cultivados durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda

8.2. Transformación y transfección

Las bacterias XL-1blue se transformaron mediante shock térmico descrito por Sambrook [155] con los vectores pLXSN16E6E7 (Addgene., plasmid ID 52394 [156]) y pLXSN18E6E7 (Addgene., plasmid ID 53459 [156]) los cuales presentan el bicistron E6/E7 del VPH 16 y VPH 18. La selección se realizó mediante resistencia a ampicilina (100 µg/mL). Las células C33A se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 8×10^4 células por pozo y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de 80-90%. Las células se transfectaron de manera estable con 10 µg de cada vector de DNA (pLXSN16E6E7 y pLXSN18E6E7) usando lipofectamina-200 (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se seleccionaron con medio DMEM con 500 µg/mL de G418 (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) durante 4 semanas.

8.3. PCR de colonias

Se cultivaron las bacterias XL-1blue, XL-1blue-pLXSN16E6E7 y XL-1blue- pLXSN18E6E7 en medio LB sólido con 100 µg/mL de ampicilina durante 12 horas. Se tomó una colonia por raspado con una punta estéril y se incubó a 95°C por 10 minutos. Se tomó un volumen de 2 µL para realizar una PCR del bicistron E6/E7 con primers; E6-VPH 16 5'-TTGCTTTTCGGGATTTATGC-3' y E7-VPH 16 5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCA-3', E6-VPH 18 5'-GCGACCCTACAAGCTACCTG-3' y E7-VPH 18 5'-TGTTGCTTACTGCTGGGATG-3'.

8.4. Extracción de RNA y RT-PCR

Se cultivaron 1×10^6 células de CC durante 24 horas y se realizó la extracción de RNA total mediante la técnica de Chomczynski y Sacchi [157], usando TRIzol (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA). Las muestras fueron tratadas con DNAsa I (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cDNAs se sintetizaron a partir de 5 µg de RNA usando un sistema de transcripción inversa (M-MLV, Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) en un volumen de reacción total de 25 µL con 1 µM de Oligo DT (500 µg/mL), 0.48 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X de buffer 5X y 200 U/µL de M-MLV. La reacción fue incubada a 37 °C durante 50 minutos y

posteriormente a 70°C para su inactivación. La amplificación por PCR de cada primer específico se realizó con 10 ng/ mL de cDNA en un volumen de reacción de 25 µL con el kit Gotaq Hot Start (Promega., Madison, WI, USA) con 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1.4X de buffer 5X, 1 µM de cada primer, 0.5 U de Hot Star polymerase (5 U/µL) y un cambio de temperaturas de 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 50 segundos a 95°C, 50 segundos a 50-55°C y 2 minutos a 72°C. Para la PCR se utilizaron los siguientes primers: IL-2R α 5'-GGGAAAATGAAGCCACAGAG-3' y 5'-GGTCTCCATTTACCTGTGC-3', IL-2R β 5'-GCTGATCAACTGCAGGAACA-3' y 5'-TGTCCTCTCAAGCACTTCT-3', IL-2R γ c 5'-GTGCTCAGCATTGGAGTGAA-3' y 5'-TCCGTTCCAGCCAGAAATAC-3'. Para el VPH 16 se utilizaron los primers: E6 5'-TTGCTTTTCGGGATTTATGC-3' y 5'-TCAGGACACAGTGGCTTTTG-3', E7 5'-TTTGCAACCAGAGACAACACTGA-3' y 5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCA-3'. Para el VPH 18: E6 5'-GCGACCCTACAAGCTACCTG-3' y 5'-GTTGGAGTCGTTCTGTCGT-3', E7 5'-GCATGGACCTAAGGCAACAT-3' y 5'-TGTTGCTTACTGCTGGGATG-3'. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5-2% y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio.

8.5. Ensayo de proliferación

Se sembraron 1×10^3 células de CC en placas de 96 pozos y fueron sincronizadas durante 24 horas en ausencia de SFB. Se cultivaron durante 144 horas en presencia de 10 UI/mL de IL-2 (R&D Systems., Minneapolis, MN, USA), adicionalmente 5×10^5 células fueron sembradas en placas de 48 pozos y fueron cultivadas durante 48 horas a 37°C en presencia de 100 UI/mL de IL-2, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 0.25 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se evaluó la proliferación celular por la técnica de cristal violeta al 4.5 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en un lector de placas (Bio-Tek Co., VT, USA) a 570 nm. Para el ensayo de proliferación en co-cultivo, se cultivaron durante 24 horas 5×10^4 células de CC para permitir su adherencia y posteriormente se adicionaron 150×10^3 LSP, se co-cultivaron durante 24 horas y pasado el tiempo de cultivo las células de CC se fijaron con glutaraldehído al 0.25 % y se evaluó la proliferación celular por la técnica de cristal violeta al 4.5 % en un lector de placas a 570 nm.

8.6. Ensayo de Western blot (WB)

Las células C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 se recolectaron mediante tripsinización y se lisaron en un buffer que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1% e inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche, Basel, Suiza). Las proteínas se separaron en gel de electroforesis de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (BIO-RAD, California, EE. UU.). Las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% en solución salina tamponada con Tris 1x suplementada con Tween-20 al 0,1% durante 24 horas a 4°C y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos; E6 (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), E7 (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y β -actina (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), seguido de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1: 13000, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Las bandas se visualizaron utilizando quimioluminiscencia mejorada (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific) con un sistema de captura de imágenes Chemi Doc MP (BIO-RAD, California, EE. UU.).

8.7. Citometría de flujo

La expresión en la superficie celular de las subunidades IL-2R α , IL-2R β y γ c se realizó incubando las células durante 60 minutos a 4°C en oscuridad a concentraciones óptimas de anticuerpos. Las células se marcaron con un IL-2R α anti-humano de ratón monoclonal, (1: 100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), IL-2R β anti-humano de ratón (1: 100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), o γ c anti-humano de ratón (1: 100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguido de un anti-ratón de oveja acoplado a FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) en una dilución final de 1:40 por 1 hora a temperatura ambiente. Los controles negativos se marcaron con un anticuerpo monoclonal de isotipo conocido irrelevante. Las células muertas se excluyeron del análisis sobre la base de la tinción con yoduro de propidio, así como las propiedades de dispersión frontal y lateral. Las células se analizaron con un citómetro FACS Aria II (Becton Dickinson, EE.UU.) y Flowing Software versión 2.5.1.

8.8. Adquisición de datos y comparación de la expresión de RNA

Los datos de secuenciación de RNA (RNA-Seq) de muestras de cérvix normales se obtuvieron de la base de datos del Genotype Tissue Expression Project (GTEx; <https://gtexportal.org/home>) y datos de muestras de tumores de CC del The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>). El conjunto de datos RNA-Seq de los dos proyectos no se puede comparar directamente, para poder analizarlos se procesaron y obtuvieron utilizando la plataforma Xena (<http://xena.ucsc.edu>), alojada por el Laboratorio de Genómica Computacional de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC; <https://cglgenomics.ucsc.edu>). Los datos de GTEx y TCGA fueron realineados por Xena Toil aplicando la normalización RESEM y fueron extraídos en Microsoft Excel para su organización. Los datos de expresión se agruparon como tumores de CC VPH positivos (VPH+), VPH negativos (VPH-) y tejidos normales, los datos del estado del VPH se descargaron del servidor Firehose del Broad Genome Data Analysis Center (<https://gdc.broadinstitute.org>) y se omitieron las muestras con VPH desconocido. El conjunto de datos de RNA-Seq generó; 10 muestras de tejido normal; 22 muestras de VPH- y 280 VPH+. La comparación de los diagramas de caja de la expresión génica se realizó utilizando GraphPad Prism v7.0 (software GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.).

8.9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (software GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se expresan como media +/- desviación estándar. Se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias de dos muestras independientes, y se utilizó la prueba ANOVA de una vía para comparar las medias de múltiples muestras independientes; una $P < 0,05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

9. Resultados

9.1. Líneas celulares de CC asociadas al VPH expresan la subunidad IL-2R β y γ c, mientras que la expresión de la subunidad IL-2R α se induce con IL-2 exógena

Se ha demostrado que las líneas celulares de CC, CALO e INBL expresan el IL-2R [25]. Para confirmar que la expresión del IL-2R se asocia con el VPH, analizamos la expresión de las subunidades IL-2R α , IL-2R β y γ c en las líneas celulares de CC VPH+; CaSki (VPH 18+), SiHa (VPH 16+), HeLa (VPH 18+), INBL (VPH 18+) y CALO (VPH 18+), y en líneas celulares de CC VPH-; C33A(VPH-) y VIBO (VPH-). La expresión de cada una de las subunidades del IL-2R se determinó por RT-PCR. Los resultados de expresión demuestran que todas las líneas celulares asociadas al VPH expresan la subunidad IL-2R β y γ c, mientras la expresión de la subunidad IL-2R α fue inducida en presencia de IL-2 exógena (Fig. 4B). Las líneas celulares C33A y VIBO solo expresan la subunidad γ c, y los estímulos con IL-2 no induce la expresión de las subunidades IL-2R α e IL-2R β (Fig. 4G). Cabe mencionar que la subunidad γ c no es exclusiva del IL-2R pues forma parte de diferentes receptores celulares en particular los receptores de citocinas [158]. Cuando se compara el nivel de expresión del IL-2R en líneas celulares de CC y linfocitos de sangre periférica (LSP), podemos notar que las líneas celulares C33A y VIBO no expresan de manera significativa la subunidad IL-2R α y IL-2R β , solo la subunidad γ c se expresa a niveles similares a lo encontrado en líneas celulares de CC VPH+ y LSP (Fig. 4C-D y H-J). Estos resultados demuestran que las líneas celulares de CC VPH- no expresan la subunidad IL-2R α e IL-2R β a diferencia de las líneas celulares de CC VPH+. Es interesante mencionar que la expresión del IL-2R también se ha reportado en diferentes líneas celulares de tumores [20, 23, 24], lo cual sugiere que debe tener un papel importante para mantener el fenotipo oncogénico de las células tumorales.

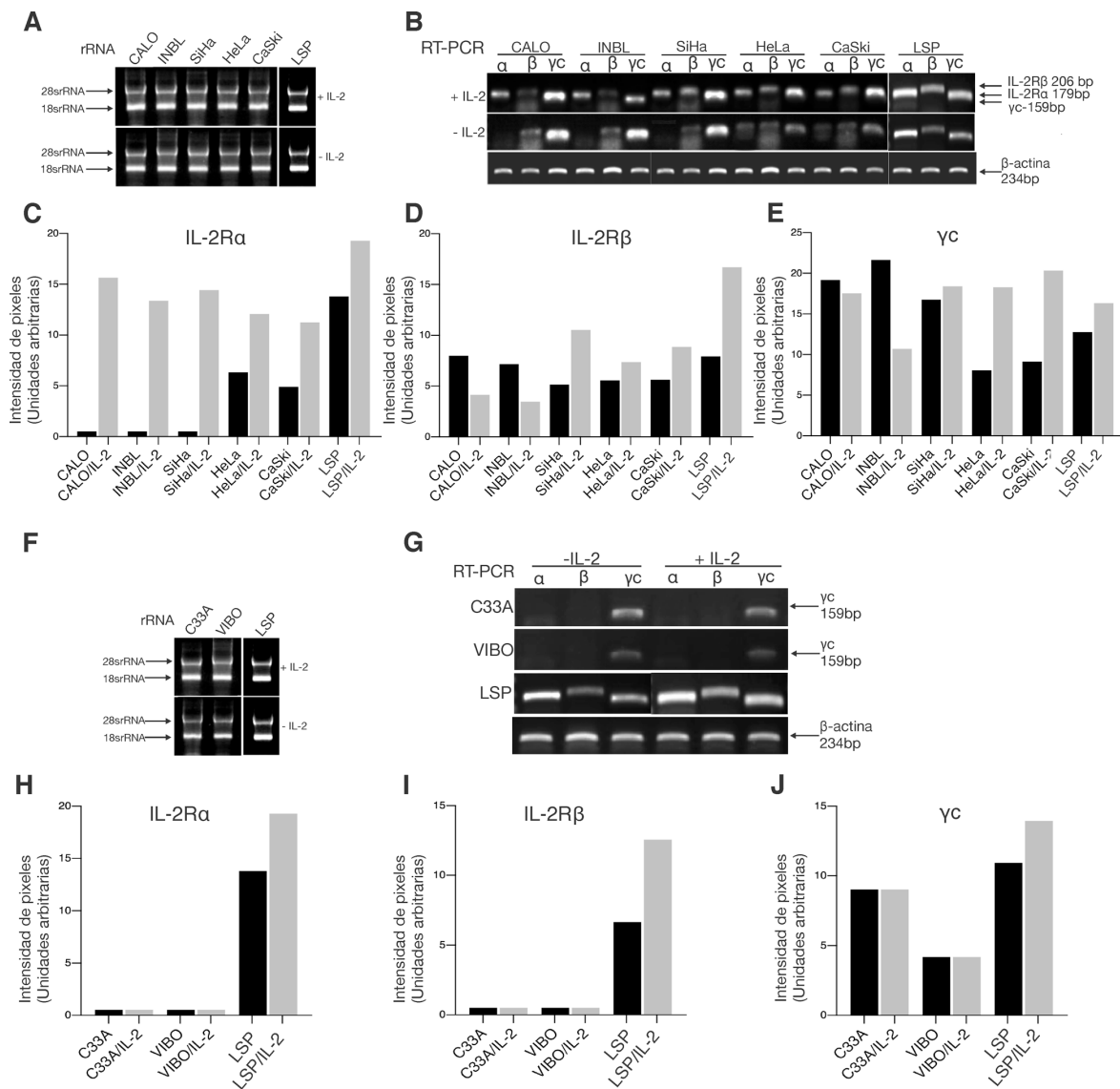


Figura 4. Expresión de las subunidades IL-2Rα, IL-2Rβ y γc en líneas celulares de CC. (A) rRNA de líneas celulares de CC positivas al VPH cultivadas durante 24 horas con 10 UI/mL de IL-2 y células control. (B) Utilizando RT-PCR y cebadores para IL-2Rα: 179 pb, IL-2Rβ: 206 pb y γc: 159 pb, se analizó la expresión del IL-2R en las líneas celulares; CALO, INBL, SiHa, HeLa y CaSki. (C, D, E) Los niveles de expresión de las subunidades de IL-2Rα, IL-2Rβ y γc se analizaron mediante el software DigiDoc-It Imaging y se normalizaron con β-actina. (F) rRNA de líneas celulares negativas al VPH cultivadas durante 24 horas con 10 UI/mL de IL-2 y células control. (G) Utilizando RT-PCR y cebadores para IL-2Rα: 179 pb, IL-2Rβ: 206 pb y γc: 159 pb, se analizó la expresión de IL-2R en las líneas celulares C33A y VIBO. Se utilizó β-actina (234 pb) como un control interno y las flechas negras corresponden a pares de bases (pb). Todos los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio.

9.2. Análisis de la expresión del IL-2R en tumores de CC y su asociación con el VPH

Para confirmar la expresión del IL-2R en el CC y su asociación con el VPH, se comparó la expresión de las subunidades; IL-2R α , IL-2R β y γ_c en muestras de tejidos de CC y tejidos de cérvix normales. Se analizaron los datos de expresión de RNA (Illumina HiSeq) de más de 300 muestras de CC de The Cancer Genome Atlas (TCGA) y los datos de expresión de 10 tejidos normales de cérvix del Genotype Tissue Expression Project (GTEx), adquiriendo los datos mediante la plataforma Xena (USCS). Aunque el TCGA incluye muestras normales, estas muestras de "tejido sólido normal" se derivan de tejidos normales localizados proximales a tumores. En consecuencia, se puede poseer perfiles transcriptómicos tumorales en estas muestras "normales". Por el contrario, las muestras del proyecto GTEx proporcionan datos de expresión del tejido normal de individuos sanos sin cáncer. Los conjuntos de datos de los dos proyectos no se pueden comparar directamente por tanto los datos se sometieron a un realineamiento mediante la plataforma Xena Toil. El análisis de los datos de ambos proyectos TCGA/GTEx demuestran un nivel de expresión significativamente mayor de las tres subunidades del IL-2R (IL-2R α , IL-2R β y γ_c) en tumores de CC a diferencia de los tejidos normales (Fig. 5A). Las muestras se agruparon como tumores de CC VPH+ y VPH-, encontrando una mayor expresión de las subunidades IL-2R α , IL-2R β y γ_c en muestras VPH+ en comparación de los tejidos normales o VPH-, siendo solo significativo para la subunidad IL-2R β (Fig. 5B). En conjunto estos resultados demuestran una mayor expresión de las subunidades del IL-2R en tumores de CC y una correlación positiva de la subunidad IL-2R β en los tumores VPH+. Además, sugieren que el IL-2R puede tener un papel importante durante el desarrollo del CC. La regulación positiva del IL-2R en los tumores de CC puede ser un evento clave para modificar el microambiente tumoral.

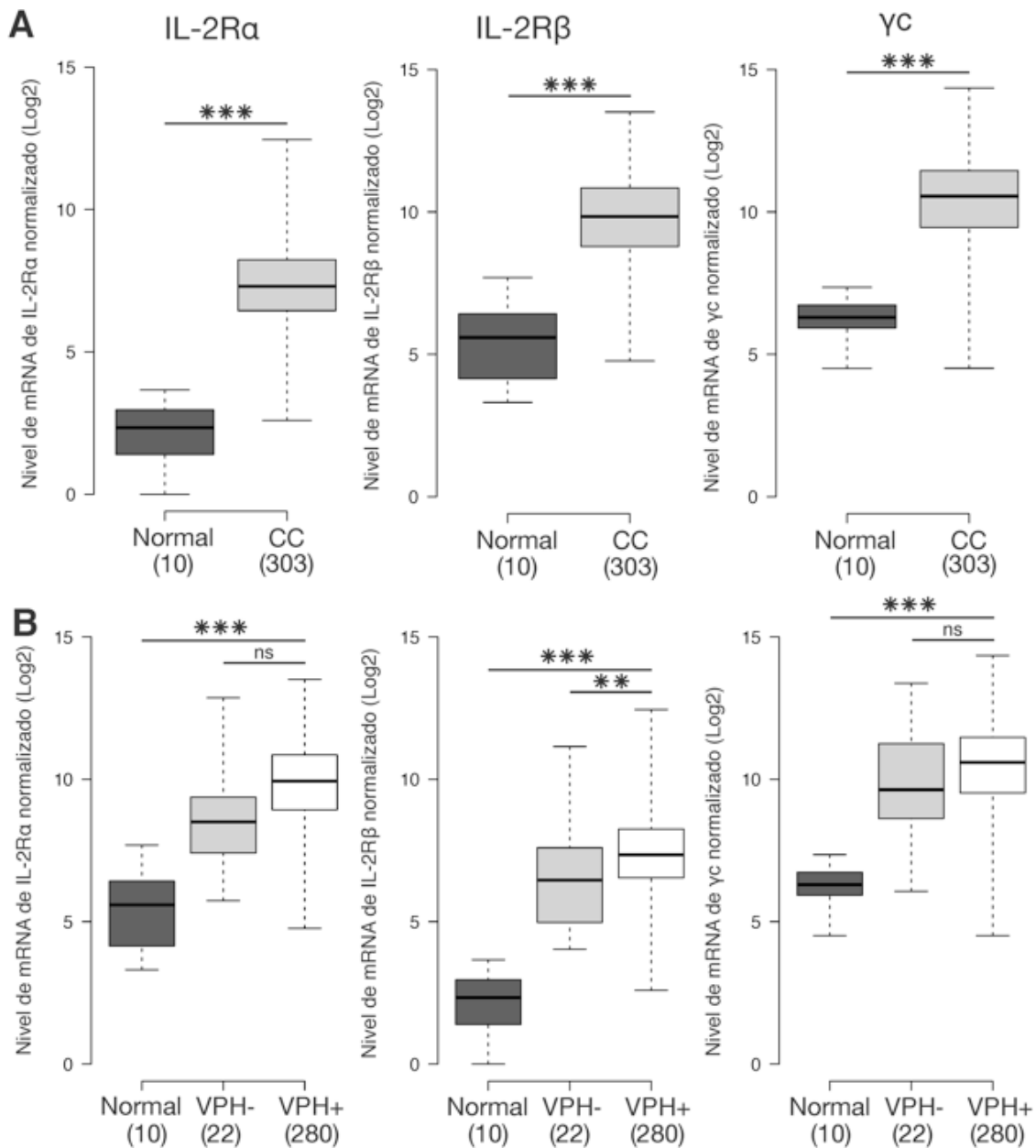


Figura 5. Expresión de IL-2R en tumores de cáncer cervical y tejidos normales de cérvix. Los datos de expresión de las tres subunidades del IL-2R en muestras de tejidos de cérvix normales (GTEx) y tumores de CC (TCGA) se descargaron con la herramienta de navegación UCSC Xena. (A) Comparación de la expresión de las subunidades de IL-2R entre tumores de CC y tejidos normales de cérvix. (B) Comparación de la expresión de las subunidades de IL-2R en tumores VPH+ en comparación con tumores VPH- y tejidos normales de cérvix. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns; no significativo.

9.3. Transfección de los genes *E6* y *E7* del VPH en la línea celular C33A

Después de haber confirmado la expresión del IL-2R en líneas celulares de CC VPH+ y no así en líneas celulares VPH-, y demostrado una mayor expresión del IL-2R en tumores de CC, se analizó si las proteínas virales E6 y E7 del VPH regulan la expresión del IL-2R en células de CC. Para abordar esta pregunta se utilizó el modelo de transfección de los genes *E6* y *E7* en la línea celular de CC C33A (VPH-).

Antes de transfectar los genes *E6* y *E7* del VPH en la línea celular C33A se transformaron las bacterias XL-1blue con los plásmidos; pLXSN16E6E7 (Addgene., ID 52394) y pLXSN18E6E7 (Addgene., ID 53459), ambos plásmidos contienen el bicistron E6/E7 del VPH 16 y 18 respectivamente. Las bacterias XL-1blue transformadas con ambos plásmidos mostraron una resistencia a ampicilina después de varios periodos de criopreservación (Fig. 6A) y una replicación estable de ambos plásmidos (Fig. 6B). Mediante una PCR de colonias bacterianas se confirmó la presencia e integridad del inserto E6/E7 del VPH 16 y VPH 18 (Fig. 6C). Las células C33A se transfectaron con 10 µg de cada uno de los vectores (pLXSN16E6E7 y pLXSN18E6E7) y fueron seleccionadas por resistencia a G418 durante un mes. Las líneas celulares obtenidas fueron denominadas C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18, mostrando una transfección estable de los insertos. Mediante una PCR se confirmó que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 mantienen integrado el bicistron E6/E7 en su genoma a diferencia de las células C33A (Fig. 6D). Se realizó la extracción del RNA de ambas células transfectadas (Fig. 6E) y mediante una RT-PCR se confirmó que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 presentan transcritos para E6 y E7 (Fig. 6F y G). Se utilizaron las líneas celulares de CC, SiHa y HeLa como controles positivos de la expresión de E6 y E7 del VPH 16 y 18 respectivamente. De igual forma, se observa que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 expresan las proteínas virales E6 y E7 (Fig. 6H). En general podemos decir que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 expresan de manera estable las proteínas virales E6 y E7 del VPH.

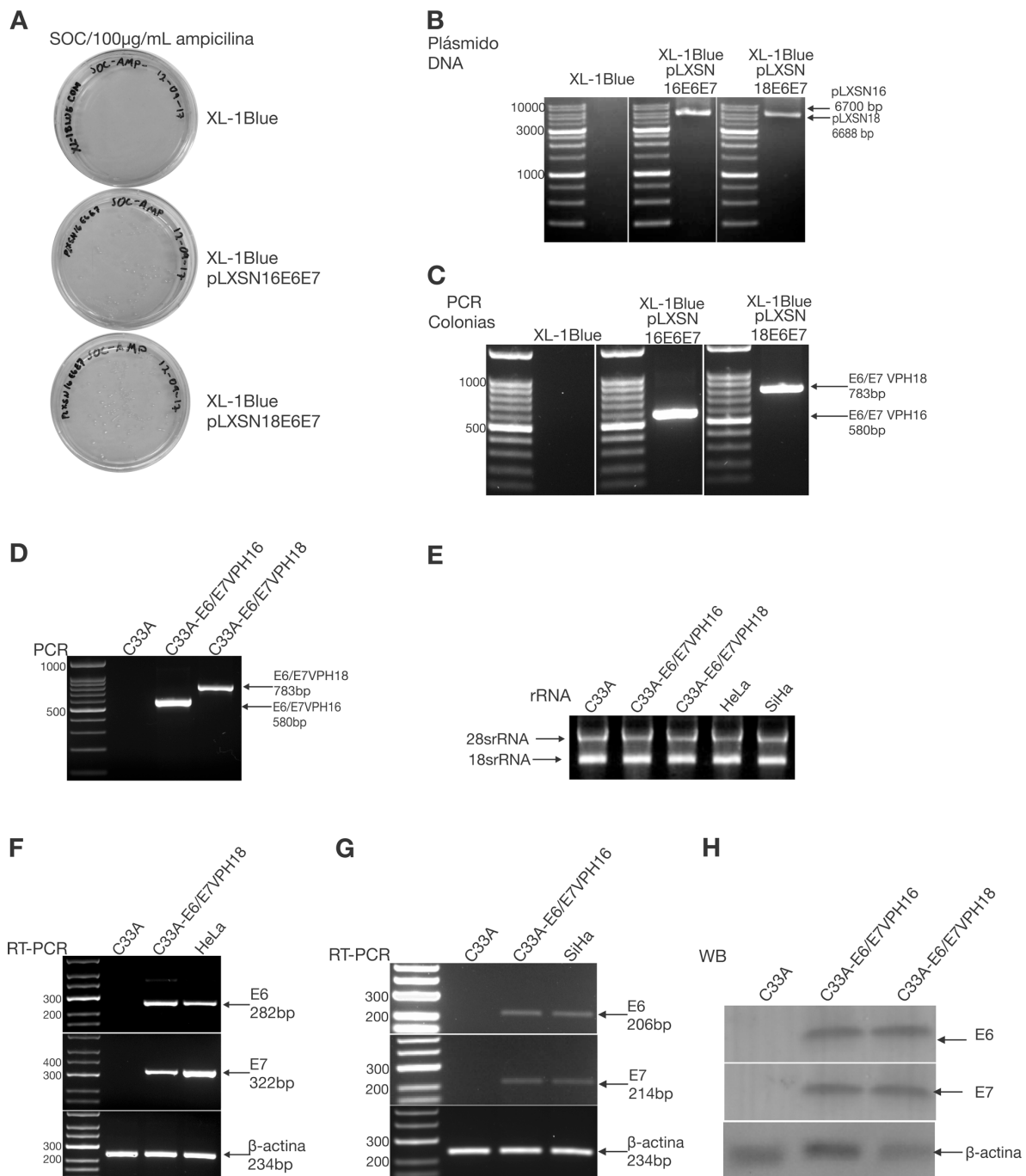


Figura 6. La línea celular C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 expresan las proteínas virales E6 y E7. (A) Las bacterias XL-1blue se transformaron con los vectores pLXSN16E6E7 (6700bp) y pLXSN18E6E7 (6688bp) mediante shock térmico seguido de una selección por resistencia a ampicilina (10 mg/mL) y (B) posteriormente se realizó una extracción de los vectores por lisis alcalina para determinar su replicación e integridad. (C) PCR de colonias bacterianas transformadas con los vectores que contienen el bicistron E6/E7. (D) Se llevó a cabo la extracción de DNA

de las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 y se analizó la integración del bicistron E6/E7 usando cebadores para E6-F y E7-R de VPH 16 (783 pb) o VPH 18 (580 pb). (E) Extracción de RNA de las líneas celulares transfectadas para determinar la integridad. (F, G) La expresión de E6 (206 pb) y E7 (214 pb) del VPH 16, y E6 (282 pb) y E7 (322 pb) de VPH 18 se analizó mediante RT-PCR. (H) Western blot (WB) para las proteínas E6 y E7 en células transfectadas C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 con la construcción correspondiente. Se utilizó β -actina (234 pb) como control interno y las flechas negras corresponden a pb. Las líneas de células SiHa y HeLa se utilizaron como controles positivos para la expresión de E6 y E7 del VPH 16 o VPH 18 respectivamente. Todos los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio.

9.4. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 transfectadas con los genes virales *E6* y *E7* del VPH expresan el IL-2R

Una vez, confirmado que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 expresan las oncoproteínas virales E6 y E7 de forma estable se procedió a analizar la expresión del IL-2R. Se cultivaron 1×10^6 células C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 durante 24 horas y se determinó la expresión de las subunidades; IL-2R α , IL-2R β y γ c por citometría de flujo. Los resultados de la figura 7 demuestran que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 expresan de manera significativa en su membrana las subunidades IL-2R α y IL-2R β en comparación de la línea celular C33A. Además, se observa una considerable desproporcionalidad de las intensidades relativas de las tres subunidades del IL-2R entre las células transfectadas con respecto a la línea celular C33A. Es evidente que después de la transfección de los genes virales *E6* y *E7* se regula la expresión de las subunidades del IL-2R en la línea celular C33A. Los resultados nos sugieren que las proteínas virales E6 y E7 regulan la expresión del IL-2R, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo esta regulación. Se requieren realizar ensayos de regulación transcripcional para entender el mecanismo de acción de E6 y E7.

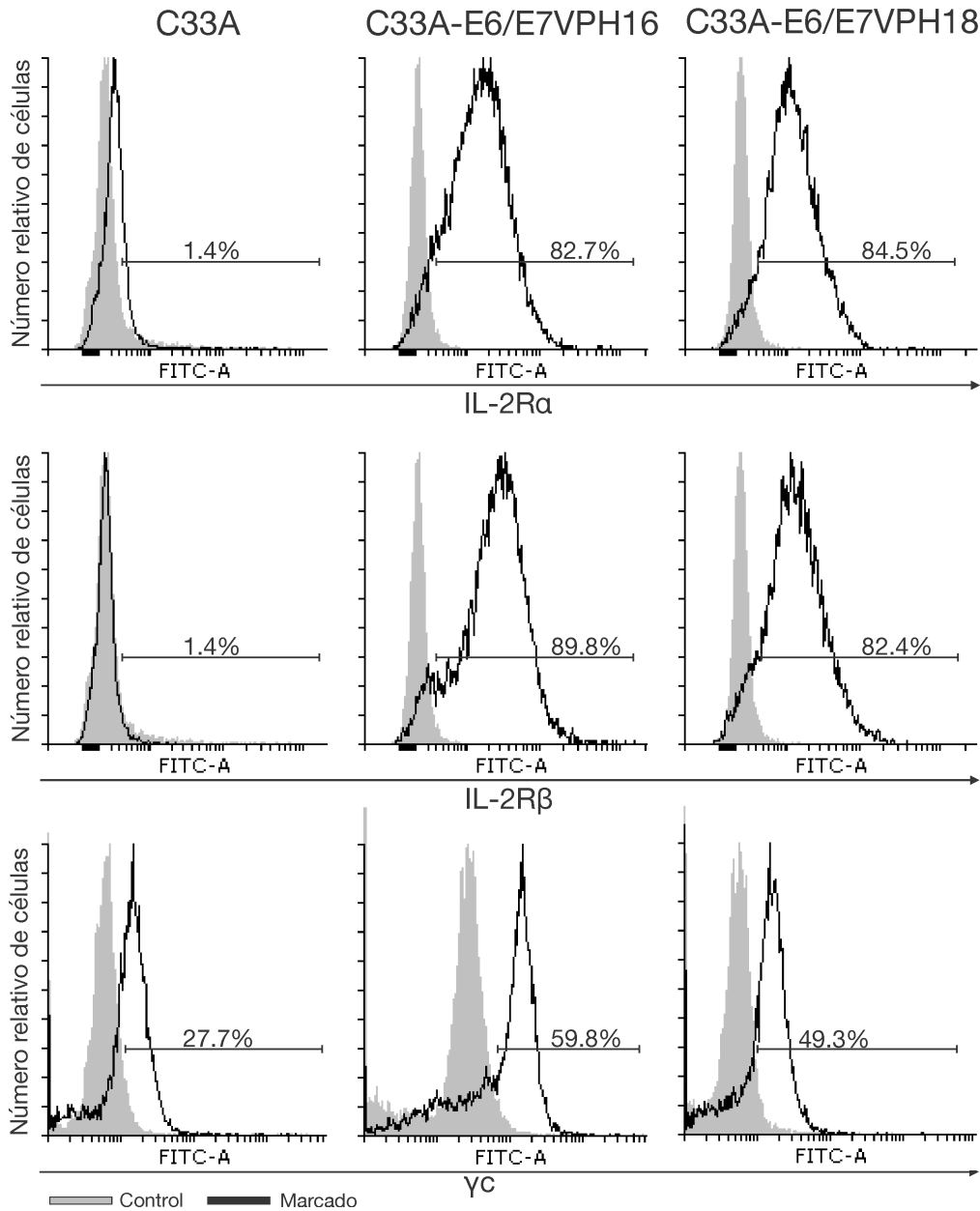


Figura 7. Expresión de las subunidades del IL-2R en la membrana de las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18. Se cultivaron 1×10^6 células C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 durante 24 horas y posteriormente se marcaron con anticuerpo específicos para IL-2R α , IL-2R β y γ c. Histogramas representativos para IL-2R α , IL-2R β y γ c en la superficie de las líneas celulares C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 por citometría de flujo. En los histogramas, las líneas grises representan los controles y las líneas negras representan las células marcadas. La citometría de flujo se realizó como se describe en Materiales y métodos, y los datos se presentan como intensidad de fluorescencia logarítmica.

9.5. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentan su proliferación con 10 UI de IL-2 exógena, mientras que 100 UI de IL-2 la inhibe

Trabajos previos de nuestro grupo de trabajo han reportado que líneas celulares de CC VPH+ tienen la capacidad de responder a IL-2 exógena [25], los resultados demuestran que 10 UI de IL-2 promueven la proliferación de las células tumorales, mientras que 100 UI de IL-2 inhiben su proliferación [28]. Es evidente que IL-2 actúa como un factor de proliferación de las células tumorales a bajas concentraciones. Para determinar si las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 responde a estímulos con IL-2 exógena como lo hacen las células asociadas al VPH, se cultivaron 1×10^6 células; C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 durante 48 o 144 horas en presencia de 100 UI/mL o 10 UI/mL de IL-2 respectivamente. Los resultados de proliferación muestran que las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentaron su proliferación en presencia de 10 UI/mL de IL-2 a diferencia de las células C33A (Fig. 8A). Por su parte, 100 UI/mL de IL-2 inhibió la proliferación de las células C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 después de 48 horas de cultivo (Fig. 8B). De manera general las células C33A no respondieron a los estímulos con 10 o 100 UI de IL-2 a diferencia de las células transfectadas con los genes virales *E6* y *E7*. Estos resultados nos demuestran que las células transfectadas con *E6* y *E7* que expresan el IL-2R responden a bajas concentraciones de IL-2 exógena para promover su proliferación. Cabe mencionar que no solo las células de CC responde a IL-2, se ha informado que diferentes líneas celulares de tumores modifican su proliferación en presencia de IL-2 [23, 24, 159]. De manera general podemos sugerir que las células tumorales utilizan IL-2 para mantener su proliferación.

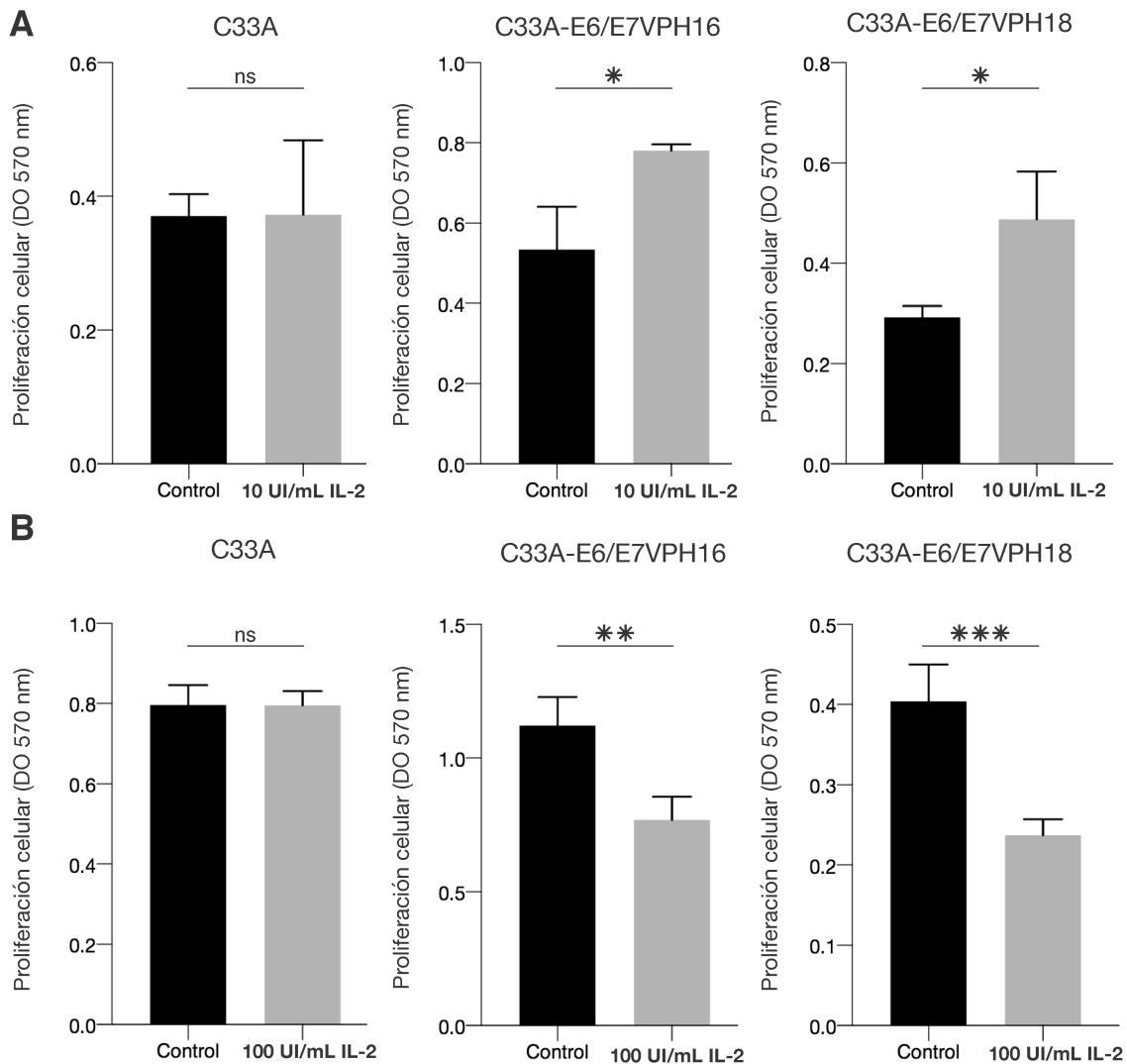


Figura 8. IL-2 exógena regula la proliferación de las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18.

(A) Se cultivaron las células C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 durante 144 horas en presencia de 10 UI/mL de IL-2 exógena. (B) Se cultivaron las células C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 durante 48 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 exógena. Después del tiempo de cultivo, las células se fijaron con glutaraldehído al 0,25% y se cuantificó la proliferación mediante el método de cristal violeta utilizando un lector de placas a una absorbancia de 570 nm. Las gráficas son representativas de al menos $n = 3$ experimentos independientes. Los valores de significancia se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns; no significativo.

9.6. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentan su proliferación en co-cultivo con linfocitos heterólogos

Se ha descrito que IL-2 es una citocina importante del microambiente de las células tumorales y un mediador clave de la homeostasis de las células del sistema inmune [160], por tanto, analizamos si las células transfectadas que expresan el IL-2R utilizan la IL-2 secretada por los linfocitos para promover su proliferación. Para ello, se realizó un co-cultivo de células tumorales y LSP. 1×10^4 células C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 se cultivaron durante 24 horas para permitir su adherencia y posteriormente se co-cultivaron con LSP heterólogos durante 24 horas. El ensayo de co-cultivo demuestra que las células C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 aumentan su proliferación en co-cultivo con LSP a diferencia de las células C33A (Fig. 9). Este resultado nos sugiere que las células de CC que expresan el IL-2R secuestran la IL-2 secretada por los linfocitos después del reconocimiento de antígenos tumorales para promover una proliferación aberrante. Adicionalmente este resultado nos hace pensar que la depleción de IL-2 del microambiente puede inhibir la polarización de los linfocitos T CD8⁺ y células NK como un mecanismo que utiliza el VPH para evadir el reconocimiento inmune.

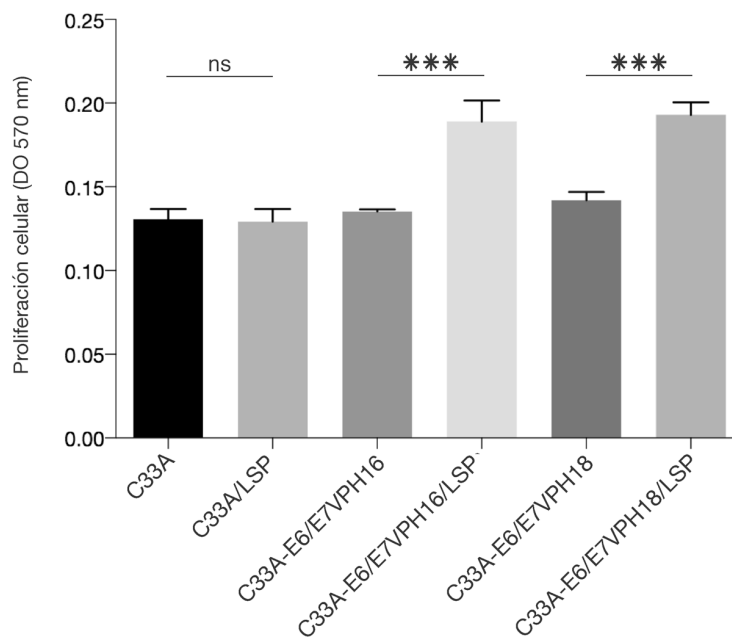


Figura 9. Las líneas celulares C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 proliferan en co-cultivo con LSP. Las líneas celulares C33A, C33A-E6/E7VPH16 y C33A-E6/E7VPH18 se cultivaron en co-cultivo con LSP heterólogos durante 24 horas. Después del tiempo de cultivo las células se fijaron con glutaraldehído al 0,25% y se cuantificó la proliferación mediante el método de cristal violeta utilizando un lector de placas a una absorbancia de 570 nm. Las gráficas son representativas de al menos $n = 3$ experimentos independientes. Los valores de significancia se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns; no significativo.

9.7. La línea celular HeLa-shE6/E7 no responde a los estímulos con IL-2 exógena y no prolifera en co-cultivo con linfocitos heterólogos

Para confirmar la participación de las proteínas virales E6 y E7 del VPH en los efectos mediados por IL-2 en líneas celulares de CC VPH+, se utilizó la línea celular HeLa-shE6/E7 la cual mantiene de forma estable una baja expresión de E6 y E7 mediante un shRNA [154]. La figura 10B muestra que la línea celular HeLa-shE6/E7 mantiene una baja expresión de aproximadamente el 80% de E6/E7 como ya se ha reportado [154]. Cuando las células HeLa-shE6/E7 (1×10^3) se cultivan durante 48 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 no se observa una inhibición de su proliferación a diferencia de la línea celular HeLa (Fig. 10C). De igual forma, las células HeLa-shE6/E7 no aumentaron su proliferación en presencia de 10 UI de IL-2 exógena (Fig. 10D) de manera similar a lo que sucede con la línea celular C33A VPH-. Cuando las células HeLa-shE6/E7 se co-cultivan con LSP heterólogos no se observa un aumento en su proliferación a diferencia de las células HeLa VPH+ (Fig. 10E). Estos resultados sugieren que la expresión disminuida de E6/E7 permite que la línea celular HeLa-shE6/E7 no responda a los estímulos de IL-2 exógena, de manera similar a lo que sucede con las líneas celulares de CC negativas al VPH.

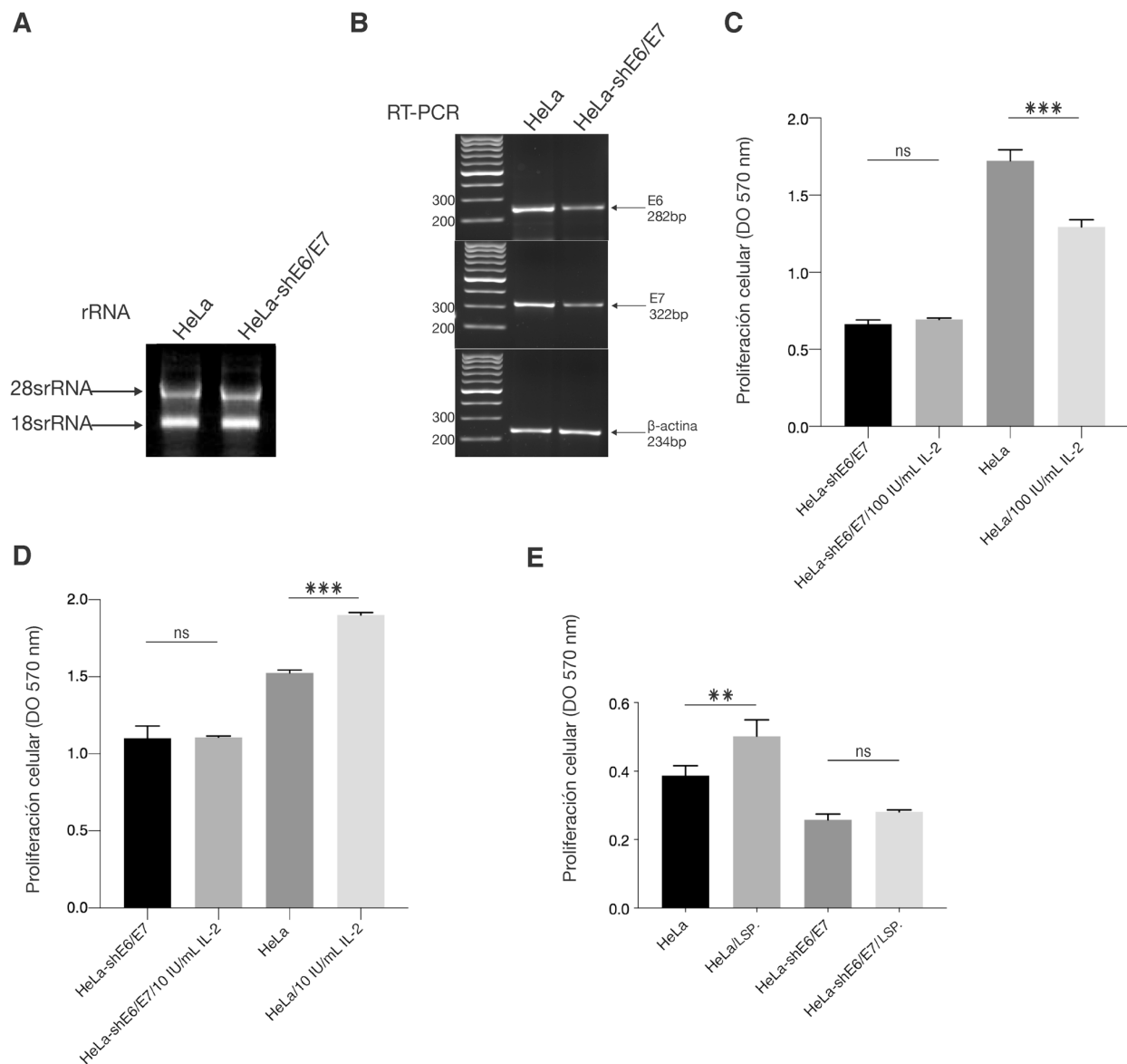


Figura 10. Las oncoproteínas E6 y E7 del VPH regulan la proliferación dependiente de IL-2. (A) Extracción de RNA de las líneas celulares HeLa y HeLa-shE6/E7 para determinar la integridad. (B) Expresión de E6/E7 en las líneas celulares HeLa y HeLa-shE6/E7. (C) Las líneas celulares HeLa y HeLa-shE6/E7 se cultivaron durante 144 horas en presencia de 10 UI/mL de IL-2 exógena. (D) Las líneas celulares HeLa y HeLa-shE6/E7 se cultivaron durante 48 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 exógena. Después del tiempo de cultivo las células se fijaron con glutaraldehído al 0,25% y se cuantifico la proliferación mediante el método de cristal violeta utilizando un lector de placas a una absorbancia de 570 nm. (E) Co-cultivo de células HeLa y HeLa-shE6/E7 con LSP durante 24 horas. Todas las gráficas son representativas de al menos n = 3 experimentos independientes. Los valores de significancia se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

10. Discusión

Diversos estudios han demostrado que las citocinas del microambiente son determinantes para la carcinogénesis tumoral [110]. Durante una respuesta anti-tumoral las células del sistema inmune se activan después del reconocimiento de antígenos tumorales, la secreción de citocinas permite el reclutamiento, activación y amplificación de las señales anti-tumorales, de esta forma se eliminarán las células neoplásicas. Sin embargo, las células tumorales pueden alterar el perfil de citocinas del microambiente tumoral al tener la capacidad de secretar y consumir diferentes moléculas de la respuesta inmune que no corresponde a su linaje celular. La modificación del microambiente permite reprogramar a las células inmunológicas hacia un estado tolerante [109]. Adicionalmente algunas citocinas del microambiente son utilizadas por las células tumorales como factores de proliferación autocrinos y paracrinos.

La Interleucina-2 (IL-2) es una de las citocinas más importantes del sistema inmune que participa en la polarización de los linfocitos T CD8⁺ y células NK. Sin embargo, se ha demostrado que la IL-2 tiene un papel importante en la proliferación de las células tumorales [23-25]. Cuando se descubrió que las células de cáncer cervical (CC) expresaban el receptor de IL-2 (IL-2R), normalmente asociado con leucocitos, se propuso que podría ser un nuevo mecanismo que utilizan las células tumorales para evadir el reconocimiento inmunológico [26, 52]. Además, esta observación fue apoyada por el hecho de que la expresión de IL-2R aumenta en función del estadio del tumor [161]. Cabe mencionar que la expresión de las proteínas virales E6 y E7 también aumenta conforme progresa el CC [162, 163]. Curiosamente, la expresión de IL-2R está asociada con líneas de células CC positivas al VPH [25]. En base a estas observaciones, se especuló que la expresión del IL-2R estaba relacionada con el VPH. Se sabe que las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH son las principales responsables de la transformación neoplásica en el CC [3, 69], teniendo la capacidad de modular la expresión génica de las células tumorales [88]. Se ha reportado, que durante la transformación de queratinocitos por E6 y E7 se regula la expresión de citocinas, por un lado, suprime la expresión de genes de IFN y genes de la vía STAT y, por otro lado, aumentan la expresión de genes de la vía NFκB y AP-1 [84]. Las células transformadas por el VPH exhiben muchos cambios en la expresión génica que contribuyen al inicio y mantenimiento del fenotipo

oncogénico, razón por la cual se pensó que estas oncoproteínas virales eran las responsables de inducir la expresión de IL-2R en las células de CC. Usando datos de RNA-Seq de tumores de CC, confirmamos una mayor expresión del IL-2R en tumores de CC en comparación con tejidos de cérvix normales. Además, nuestro análisis demostró una correlación significativa de la subunidad IL-2R β con los tumores VPH+. Nuestro análisis de expresión sugiere que el IL-2R puede desempeñar un papel importante durante el desarrollo tumoral. A pesar de estos hallazgos, se requieren más estudios para proponer IL-2R como un posible biomarcador tumoral en CC. La presencia de este receptor también se ha informado en diferentes líneas celulares no hematopoyéticas [164, 165] y células tumorales [25, 159, 166, 167] lo cual nos demuestra que su expresión no es exclusiva de los linfocitos.

En este trabajo demostramos que la transfección de los genes E6 y E7 del VPH16 y VPH18 en la línea celular C33A (VPH-) induce la expresión de las subunidades del IL-2R. Las células transformadas por el VPH reprograman su expresión génica para mantener un fenotipo canceroso. En este contexto, nuestros resultados sugieren que las oncoproteínas virales E6 y E7 regulan positivamente la expresión de las tres subunidades de IL-2R en las células CC para contribuir a este fenotipo maligno. Se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo por el cual las proteínas virales regulan la expresión del IL-2R en células tumorales.

La presencia del IL-2R en las células de CC transfectadas con los genes *E6/E7* las hizo susceptibles a los estímulos con IL-2 exógena. A una baja concentración de IL-2 (10 UI) aumentaron su proliferación, mientras que a altas concentraciones (100 UI) la inhibieron significativamente. Las concentraciones bajas de IL-2 (10 UI/mL) se definieron como la dosis de IL-2 que previene o no es suficiente para promover la proliferación de linfocitos *in vitro* y las concentraciones altas (100 UI/mL) como la dosis necesaria para promover su proliferación [28, 168]. La pérdida de fosforilación de JAK1 y la activación constitutiva de JAK3 en las células de CC asociadas con el VPH podría ser una característica de las células tumorales que expresan IL-2R [28], dándoles la capacidad de responder a bajas concentraciones de IL-2 a diferencia de lo que ocurre en los linfocitos convencionales donde se requieren altas concentraciones de IL-2 (100 UI/mL) para activar la vía JAK/STAT [169, 28].

Nuestros resultados indican que las células tumorales que expresan IL-2R aumentan significativamente su proliferación cuando se cultivan en presencia de leucocitos heterólogos, a diferencia de las células de CC (VPH-) sin IL-2R. Especulamos que la IL-2 secretadas por los leucocitos después del reconocimiento de las células tumorales fue secuestrada por las células de CC que expresan IL-2R para mantener una proliferación sostenida. Para respaldar nuestras observaciones de que E6 y E7 podrían estar involucrados en la expresión de IL-2R, usamos la línea celular HeLa-shE6/E7 en la que la expresión de E6 y E7 esta disminuida significativamente y encontramos que en esta línea celular se pierde la capacidad de responder a IL-2 exógena. En general, los resultados sugieren que las células tumorales promueven la proliferación sostenida secuestrando IL-2 del microambiente.

Se ha demostrado que las concentraciones de IL-2 son determinantes para la correcta activación de las células del sistema inmune. Estudios *in vitro* demuestran que después de la activación antigénica, la estimulación con 100 UI/mL de IL-2 favorecen la expresión de genes de actividad citotóxica de los linfocitos [168]. La producción de IL-2 por parte de los linfocitos T activados depende de un bucle de retroalimentación positivo de IL-2, este mecanismo puede ser bloqueado por los linfocitos T reguladores (Treg), los cuales compiten por la IL-2 del microambiente [170]. Las células Treg consumen la IL-2 del microambiente ya que no tienen la capacidad de producirla, esta competencia por IL-2 disminuye la proliferación de las células T CD4 y CD8 [171, 172] e inducen la apoptosis por privación de IL-2 [173]. Altas concentraciones de IL-2 (30 ng/mL) anulan el bloqueo de las células Treg y restablece la proliferación de los linfocitos T específicos de antígeno [174]. La administración de altas concentraciones de IL-2 *in vitro* (6000 UI/mL) e *in vivo* (720000 UI/kg) permite la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ e IL-6 por los linfocitos circulantes o intra-tumorales [175]. Mientras que la administración de bajas concentraciones de IL-2 favorecen la expansión de las células Treg pero no las células T convencionales en pacientes con vasculitis inducida por VHC [176]. Las células tumorales podrían exacerbar el estado de deficiencia de IL-2 en el microambiente tumoral al tener la capacidad de consumir la citocina para favorecer su proliferación. Adicionalmente se ha informado que los pacientes con cáncer presentan niveles elevados de IL-2R soluble (IL-2Rs) en comparación de

voluntarios sanos (1315 UI/mL), lo cual predice una disminución de la respuesta citotóxica de los linfocitos T [177]. En general los niveles de IL-2 son determinantes para montar una respuesta inmune anti-tumoral o tolerancia tumoral. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las células CC utilizan el IL-2R para impulsar una proliferación sostenida, siendo un sello distintivo del cáncer [178]. También podríamos especular que la expresión de IL-2R en células de CC positivas al VPH podría ser un mecanismo que utilizan las células tumorales para escapar del reconocimiento inmunológico al agotar la IL-2 necesaria para la correcta activación de los linfocitos efectores y al mismo tiempo promover su propia proliferación. La diferencia en la respuesta a las concentraciones de IL-2 entre las células tumorales y los linfocitos podría ser un evento clave para prevenir la activación de las células del sistema inmunológico. Se ha informado que los tumores CC tienen un gran número de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) que no se polarizan en linfocitos citotóxicos [179, 116]. Sin embargo, si estos TIL se aíslan y cultivan *in vitro* con altas concentraciones de IL-2 (100-1000 UI/mL), se vuelven citotóxicos de forma activa contra las células tumorales [180, 181]. Cuando los linfocitos reconocen los antígenos de las células tumorales se activan y secretan IL-2 al microambiente, sin embargo, las células de CC con IL-2R pueden consumir la IL-2 del microambiente para promover su proliferación. Las células de CC podrían comportarse de manera análoga a las células Treg compitiendo por la IL-2 del microambiente. La disminución de IL-2 en el microambiente inhibe la correcta activación de los linfocitos hacia un fenotipo citotóxico, ya que requieren concentraciones elevadas de IL-2 para proliferar y diferenciarse [17, 168]. Se ha reportado que las altas concentraciones de IL-2 (100-1000 UI/mL) activa la vía JAK/STAT en células Treg y linfocitos convencionales *in vitro*, sin embargo, a bajas concentraciones (1-10 UI/mL) se activan la vía JAK/STAT solo en células Treg [169]. Esto demuestra que las concentraciones de IL-2 son determinantes para la activación de la vía de señalización de IL-2. Los resultados de este trabajo no solo confirman que el VPH regula la expresión del IL-2R en las células de CC para promover la proliferación en presencia de IL-2, también se propone que podría ser un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune que utilizan las células de CC al evitar la correcta activación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y células NK dependientes de IL-2 [17, 52].

11. Conclusión

Nuestros resultados muestran claramente una expresión significativamente elevada de las tres subunidades de IL-2R en los tumores de CC en comparación con los tejidos de cérvix normales. Además, muestran que las líneas celulares de CC positivas al VPH y células transfectadas con los genes *E6* y *E7* expresan altos niveles de IL-2R en comparación con las líneas celulares negativas al VPH. Las células de CC podrían utilizar el IL-2R para impulsar un crecimiento inadecuado, contribuyendo a una señalización proliferativa sostenida. Nuestros resultados también sugieren que los genes *E6* y *E7* del VPH contribuyen a inducir la expresión de IL-2R. Por último, nos gustaría proponer que las células de CC VPH+ expresan el IL-2R con el fin de secuestrar la IL-2 del microambiente para promover su proliferación.

12. Perspectivas

En este trabajo demostramos que las proteínas virales E6 y E7 del VPH regulan la expresión del IL-2R en células de CC, sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual las proteínas virales regulan dicha expresión. Se sabe que las proteínas virales del VPH regulan la expresión génica de la célula huésped actuando como factores de transcripción, asociados a factores de transcripción, reguladores de la maquinaria transcripcional y epigenética. Por tanto, se requieren realizar estudios funcionales de expresión génica para entender la vía molecular por la cual las proteínas virales regulan la expresión de los genes para IL-2R.

Es evidente que la expresión del IL-2R en las células de CC contribuye a mantener una proliferación aberrante de las células tumorales *in vitro*. Sin embargo, se requieren más estudios para reforzar nuestra propuesta, donde el secuestro de IL-2 del microambiente promueve el desarrollo tumoral y evasión de la respuesta inmune. Por tanto, se propone realizar estudios *in vivo* con ratones inmunodeprimidos y deficientes de linfocitos en los cuales se implantarán células tumorales que expresen el IL-2R. La administración de IL-2 exógena en el microambiente tumoral nos permitirá determinar si se favorece el crecimiento tumoral de las células con IL-2R.

13. Literatura citada

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, & Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): p. 87–108. DOI: 10.3322/caac.21262.
2. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health.* 2020; 8(2): p. e191-e203. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30482-6.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189(1): p. 12–19. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:13.O.CO;2-F.
4. Burd E. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1): p. 1-17.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348(6): p. 518–527. DOI: 10.1056/NEJMoa021641.
6. Spriggs AI, & Boddington MM. Progression and regression of cervical lesions. Review of smears from women followed without initial biopsy or treatment. *J Clin Pathol.* 1980; 33(6): p. 517–522. DOI: 10.1136/jcp.33.6.517.
7. Kaur P, McDougall JK, & Cone R. Immortalization of primary human epithelial cells by cloned cervical carcinoma DNA containing human papillomavirus type 16 E6/E7 open reading frames. *J Gen Virol.* 1989; 70 (Pt 5): p. 1261–1266. DOI: 10.1099/0022-1317-70-5-1261.
8. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, & Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal.* 1989; 8(12): p. 3905–3910.
9. Crook T, Tidy JA, & Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell.* 1991; 67(3): p. 547–556. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90529-8.
10. Jones DL, Münger K. Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators. *Semin Cancer Biol.* 1996; 7(6): p. 327–337. DOI: 10.1006/scbi.1996.0042.
11. Lipinski MM, & Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* 1999; 18(55): p. 7873–7882. DOI: 10.1038/sj.onc.1203244.
12. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, & Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995; 9(19): p. 2335–2349. DOI: 10.1101/gad.9.19.2335.
13. Magnusson PK, & Gyllensten UB. Cervical cancer risk: is there a genetic component? *Molecular medicine today.* 2000; 6(4): p. 145–148. DOI: 10.1016/s1357-4310(00)01685-3.

14. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: International Agency for Research on Cancer; 2007.
15. Campo MS. Cell transformation by animal papillomaviruses. *J Gen Virol.* 1992; 73((Pt 2)): p. 217–222. DOI: 10.1099/0022-1317-73-2-217.
16. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, & Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2004; 2014: p. 149185. DOI: 10.1155/2014/149185.
17. Boyman O, & Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews. Immunology.* 2012; 12(3): p. 180–190. DOI: 10.1038/nri3156.
18. Gaffen SL, & Liu KD. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine.* 2004; 28(3): p. 109–123. DOI: 10.1016/j.cyto.2004.06.010.
19. Rimoldi D,SS,HF,SM,BS,ZL,PS,AB,&CS. Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 1993; 13(3): p. 555-564.
20. Yasumura S, Lin WC, Weidmann E, Hebda P, & Whiteside TL. Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *Int J Cancer.* 1994; 59(2): p. 225-234. DOI: 10.1002/ijc.2910590215.
21. Weidmann E, Sacchi M, Plaisance S, Heo DS, Yasumura S, Lin WC, et al. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor in situ. *Cancer research.* 1992; 52(21): p. 5963–5970.
22. Kuhn DJ, & Dou QP. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front Biosci.* 2005; 10: p. 1462-1474. DOI: 10.2741/1631.
23. Reichert TE, Nagashima S, Kashii Y, Stanson J, Gao G, Dou QP, et al. Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene.* 2000; 19(4): p. 514–525. DOI: 10.1038/sj.onc.1203391.
24. Reichert TE, Kashii Y, Stanson J, Zeevi A, & Whiteside TL. The role of endogenous interleukin-2 in proliferation of human carcinoma cell lines. *Br J Cancer.* 1999; 81(15): p. 822–831. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690770.
25. Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Cacéres-Cortés JR, Alvarado-Moreno JA, Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I, et al. Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular signalling.* 2004; 16(11): p. 1239–1247. DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.03.011.
26. Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, et al. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine.* 2010; 50(3): p. 273–277. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.02.013.
27. Alvarado MJA. Frecuencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvicouterino y el efecto proliferador producido por interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico UNAM , editor. Mexico: Tesis-UNAM; 1997.

28. Valle-Mendiola A, Weiss-Steider B, Rocha-Zavaleta L, & Soto-Cruz I. IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer investigation*. 2014; 32(4): p. 115–125. DOI: 10.3109/07357907.2014.883526.
29. Torres-Corioriles EI, Río-Ortiz Id, Weiss-Steider B, Barrios-Maya MA, Trujullo-Cirilo L, Corona-Ortega T, et al. IL-2 induces apoptosis, increases the production and expression of cytochrome-C and inhibits COX IV in cervical cancer cells. *Journal of Solid Tumors*. 2019; 9: p. 21-32. DOI:10.5430/jst.v9n1p21.
30. Herrera MC. Determination del receptor Para IL-2, así como el efecto de IL-2 sobre la proliferación y regulación de genes mitocondriales (citocromo c) en la línea de cancer cérvico uterino C33 UNAM , editor. Mexico: Tesis-UNAM; 2012.
31. Gyöngyösi E, Szalmás A, Ferenczi A, Póliska S, Kónya J, & Veress G. Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins. *Archives of virology*. 2015; 160(2): p. 389–398. DOI: 10.1007/s00705-014-2305-y.
32. Smith KA. The interleukin 2 receptor. *Annual review of cell biology*. 1989; 5: p. 397–425. DOI: 10.1146/annurev.cb.05.110189.002145.
33. Pol JG, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med*. 2020; 217(1): p. e20191247. DOI:10.1084/jem.20191247.
34. Busse D, de la Rosa M, Hobiger K, Thurley K, Flossdorf M, Scheffold A, et al. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(7): p. 3058-3063. DOI: 10.1073/pnas.0812851107.
35. Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, et al. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *Int Immunol*. 2005; 17(3): p. 279-288. DOI: 10.1093/intimm/dxh207.
36. Konrad MW, Hemstreet G, Hersh EM, Mansell PW, Mertelsmann R, Kolitz JE, et al. Pharmacokinetics of recombinant interleukin 2 in humans. *Cancer Res*. 1990; 50(7): p. 2009-2017..
37. Ruggiero A, Villa CH, Bander E, Rey DA, Bergkvist M, Batt CA, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(27): p. 12369-12374. DOI: 10.1073/pnas.0913667107.
38. Bodnár A, Nizsalóczki E, Mocsár G, Szalóki N, Waldmann TA, Damjanovich S, et al. A biophysical approach to IL-2 and IL-15 receptor function: localization, conformation and interactions. *Immunology letters*. 2008; 116(2): p. 117–125. DOI: 10.1016/j.imlet.2007.12.014.
39. Kim HP, Imbert J, & Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17(5): p. 349–366. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.07.003.

40. Wang X, Rickert M, & Garcia KC. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science (New York, N.Y.)*. 2005; 310(5751): p. 1159–1163. DOI: 10.1126/science.1117893.
41. Minami Y, Kono T, Yamada K, Taniguchi T. The interleukin-2 receptors: insights into a complex signalling mechanism. *Biophys Acta*. 1992; 1114(2-3): p. 163-177. DOI: 10.1016/0304-419x(92)90013-o.
42. Gaffen SL. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*. 2001; 14(2): p. 63–77. DOI: 10.1006/cyto.2001.0862.
43. Lin JX, & Leonard WJ. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997; 8(4): p. 313–332. DOI: 10.1016/s1359-6101(97)00021-x.
44. Sim GC, & Radvanyi L. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014; 25(4): p. 377–390. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.018.
45. Leonard WJ, Krönke M, Pepper NJ, Depper JM, & Greene WC. Interleukin 2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(8): p. 6281–6285. DOI: 10.1073/pnas.82.18.6281.
46. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14(1): p. 179–205. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.179.
47. Malek TR, & Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010; 33(2): p. 153–165. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
48. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, et al. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*. 1994; 369(6478): p. 330–333. DOI: 10.1038/369330a0.
49. Liao W, Lin JX, & Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*. 2013; 38(1): p. 13–25. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.004.
50. Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*. 1991; 353(6347): p. 858–861. DOI: 10.1038/353858a0.
51. Hémar A, Subtil A, Lieb M, Morelon E, Hellio R, & Dautry-Varsat A. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *J Cell Biol*. 1995; 129(1): p. 55–64. DOI: 10.1083/jcb.129.1.55.
52. Valle-Mendiola A, Gutiérrez-Hoya A, Lagunas-Cruz M, Weiss-Steider B, & Soto-Cruz I. Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: p. 2849523. DOI: 10.1155/2016/2849523.
53. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, & zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324(1): p. 17–27. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.
54. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature reviews*. 2016; 2: p. 16086. DOI: 10.1038/nrdp.2016.86.

55. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, & Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002; 55(4): p. 244–265. DOI: 10.1136/jcp.55.4.244.
56. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, et al. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(7): p. 513–517. DOI: 10.1093/jnci/djn044.
57. Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM, Group & A. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis.* 2007; 195(11): p. 1582–1589. DOI: 10.1086/516784.
58. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(16): p. 485–490.
59. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol.* 2013; 3(4): p. 416–421. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.06.003.
60. Egawa N, Egawa K, Griffin H, & Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses.* 2015; 7(7): p. 3863–3890. DOI: 10.3390/v7072802.
61. Pyeon D, PSM, LSM, AP, & LPF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS pathogens.* 2009; 5(2): p. e1000318. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000318.
62. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology.* 2014; 26: p. 13–21. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002.
63. Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, Sahebali S, & Bogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(11): p. 2006–2011. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.07.004.
64. Zheng ZM, & Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006; 11(1): p. 2286–2302. DOI: 10.2741/1971.
65. Van Doorslaer K, & Burk RD. Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Advances in virus research.* 2010; 77: p. 41–62. DOI: 10.1016/B978-0-12-385034-8.00002-8.
66. Hwang ES, Nottoli T, & Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* 1995; 211(1): p. 227–233. DOI: 10.1006/viro.1995.1395.
67. Zhang B, SDF, & RA. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *Journal of virology.* 2002; 76(1): p. 220–231. DOI: 10.1128/jvi.76.1.220-231.2002.
68. Lizano M, Berumen J, & García-Carrancá A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Archives of medical research.* 2009; 40(6): p. 428–434. DOI: 10.1016/j.arcmed.2009.06.001.

69. Narisawa-Saito M, & Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science*. 2007; 98(10): p. 1505–1511. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x.
70. Howie HL, Katzenellenbogen RA, & Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*. 2009; 384(2): p. 324–334. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.017.
71. Wallace NA, & Galloway DA. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annual review of virology*. 2015; 2(1): p. 403–423. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055021.
72. McLaughlin-Drubin ME, & Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009; 384(2): p. 335–344.
73. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 2001; 20(54): p. 7888–7898. DOI: 10.1038/sj.onc.1204860.
74. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, & Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology*. 1989; 63(10): p. 4417–4421. DOI: 10.1128/JVI.63.10.4417-4421.1989.
75. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, & Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal*. 1989; 8(12): p. 3905–3910.
76. Podlaha O, Riester M, De S, & Michor F. Evolution of the cancer genome. *Trends in genetics*. 2012; 28(4): p. 155–163. DOI: 10.1016/j.tig.2012.01.003.
77. Gatenby R, Gillies R, & Brown J. The evolutionary dynamics of cancer prevention. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10: p. 526–527. DOI: 10.1038/nrc2892.
78. Stratton MR, Campbell PJ, & Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009; 458(7239): p. 719–724. DOI: 10.1038/nature07943.
79. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Peadarallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2014; 506(7488): p. 371–375. DOI: 10.1038/nature12881.
80. Rusan M, Li YY, & Hammerman PS. Genomic landscape of human papillomavirus-associated cancers. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(9): p. 2009–2019. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1101.
81. Wan F, Miao X, Quraishi I, Kennedy V, Creek KE, & Pirisi L. Gene expression changes during HPV-mediated carcinogenesis: a comparison between an in vitro cell model and cervical cancer. *Int J Cancer*. 2008; 123(1): p. 32–40. DOI: 10.1002/ijc.23463.
82. Zacapala-Gómez AE, Del Moral-Hernández O, Villegas-Sepúlveda N, Hidalgo-Miranda A, Romero-Córdoba SL, Beltrán-Anaya FO, et al. Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*. 2016; 488: p. 187–195. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.017.

83. Hu D, Zhou J, Wang F, Shi H, Li Y, & Li B. HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. 2015; 292(6): p. 1345–1354. DOI: 10.1007/s00404-015-3787-x.
84. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, & Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *Journal of virology*. 2001; 75(9): p. 4283–4296. DOI: 10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001.
85. Toussaint-Smith E, Donner DB, & Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene*. 2004; 23(17): p. 2988–2995. DOI: 10.1038/sj.onc.1207442.
86. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World journal of clinical oncology*. 2014; 5(4): p. 753–763. DOI: 10.5306/wjco.v5.i4.753.
87. Kang SD, Chatterjee S, Alam S, Salzberg AC, Milici J, van der Burg SH, et al. Effect of Productive Human Papillomavirus 16 Infection on Global Gene Expression in Cervical Epithelium. *Journal of virology*. 2018; 92(20): p. e01261-18.
88. Durzynska J, Lesniewicz K, & Poreba E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. 2017; *Mutation research. Reviews in mutation research*: p. 772, 36–50. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.09.006.
89. Bannister AJ, & Kouyama K. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011; 21(3): p. 381–395. DOI: 10.1038/cr.2011.22.
90. Rothbart SB, & Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta*. 2004; 1839(8): p. 627–643. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.03.001.
91. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(5): p. 1412–1417. DOI: 10.1073/pnas.0510310103.
92. Morillon A, Kouyama K, Nakatani T, & Morillon A. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Molecular cell*. 2005; 18(6): p. 723–734. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.05.009.
93. Eberharter A, & Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO reports*. 2002; 3(3): p. 224–229. DOI:10.1093/embo-reports/kvf053.
94. Pal S, & Tyler JK. Epigenetics and aging. *Science advances*. 2016; 2(7): p. e1600584. DOI: 10.1126/sciadv.1600584.
95. Pfister SX, & Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*. 2017; 16(4): p. 241–263. DOI: 10.1038/nrd.2016.256.
96. Baxter E, Windloch K, Gannon F, & Lee JS. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell & bioscience*. 2014; 4(1): p. 45. DOI: 10.1186 / 2045-3701-4-45.

97. Yasmin R, Siraj S, Hassan A, Khan AR, Abbasi R, & Ahmad N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators of inflammation*. 2015; 2015: p. 201703. DOI: 10.1155/2015/201703.
98. Saleh R, Toor SM, Sasidharan Nair V, & Elkord E. Role of Epigenetic Modifications in Inhibitory Immune Checkpoints in Cancer Development and Progression. *Frontiers in immunology*. 2020; 11: p. 1469. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01469.
99. Sasidharan Nair V, Toor SM, Taha RZ, Shaath H, & Elkord E. DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer. *Clinical epigenetics*. 2018; 10(1): p. 104. DOI: 10.1186/s13148-018-0539-3.
100. Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, & Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene*. 2007; 26(11): p. 1650–1655. DOI: 10.1038/sj.onc.1209950.
101. McCabe MT, Davis JN, & Day ML. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer research*. 2005; 65(9): p. 3624–3632. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2158.
102. Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, & Hirohashi S. Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer letters*. 2007; 251(2): p. 211–219. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.023.
103. Sen P, Ganguly P, & Ganguly N. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. *Oncology letters*. 2018; 15(1): p. 11–22. DOI: 10.3892/ol.2017.7292.
104. Poreba E, Broniarczyk JK, & Gozdzicka-Jozefiak A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. *Clinical epigenetics*. 2011; 2(2): p. 233–247. DOI: 10.1007 / s13148-011-0026-6.
105. McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, & Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(5): p. 2130–2135. DOI: 10.1073 / pnas.1009933108.
106. Florea ID, & Karaoulani C. Epigenetic Changes of the Immune System with Role in Tumor Development. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2018; 1856: p. 203–218. DOI: 10.1007/978-1-4939-8751-1_11.
107. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res*. 2008; 102(8): p. 873–887. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.171025.
108. Zellmer VR, Zhang S. Evolving concepts of tumor heterogeneity. *Cell & bioscience*. 2014; 4: p. 69. DOI: 10.1186/2045-3701-4-69.
109. Grivennikov SI, Greten FR, & Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): p. 883–899. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
110. Coussens LM, & Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917): p. 860–867. DOI: 10.1038/nature01322.

111. Yang J, & Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008; 14(6): p. 818–829. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.05.009.
112. Yu H, Kortylewski M, & Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology*. 2007; 7(1): p. 41–51. DOI: 10.1038/nri1995.
113. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: p. 298–306.
114. Clemente CG, Mihm MCJ, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. ; 77: p. 1303–1310.
115. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjanen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 1994; 30A: p. 1797–1803.
116. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol*. 2011; 8: p. 59–66.
117. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*. 2006; 18: p. 1591–1602.
118. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008; 26: p. 4410–4417.
119. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, Fujii T, Nagai N, Ohama K. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2005; 13: p. 1153–1158.
120. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011; 71: p. 1263–1271.
121. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006; 126: p. 32-41.
122. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity*. 2000; 13: p. 265–276.
123. Iwahori K. Cytotoxic CD8+ Lymphocytes in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1224: p. 53-62.
124. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*. 2015; 126: p. 3338–3346.

125. Assudani DP, Horton RB, Mathieu MG, McArdle SE, Rees RC. The role of CD4+ T cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56: p. 70-80.
126. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. 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: p. 5449-5455.
127. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, B X. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: p. 925135.
128. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immuno.* 2016; 16: p. 102-111.
129. Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, et al. Tumor Cell Responses to IFN γ Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis. *Immunity.* 1998; 9: p. 25-34.
130. Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: p. 354-361.
131. Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, et al. HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2013; 2013: p. 540850.
132. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; 112: p. 1557-1569.
133. Clerici M, Shearer GM, Clerici E. Cytokine Dysregulation in Invasive Cervical Carcinoma and Other Human Neoplasias: Time to Consider the TH1/TH2 Paradigm. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: p. 261-263.
134. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol.* 2001; 167: p. 2972-2978.
135. Min Z, Pu X, Gu Z. Correlative analysis of the expression of IL-10 and Ki-67 in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasias and human papillomavirus infection. *Oncol Lett.* 2018; 16: p. 7189-7194.
136. Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos AC, Teodoro Ld, Murta EF, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol.* 2012; 73: p. 920-926.
137. Arany I, Grattendick KG, Tyring SK. Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res.* 2002; 55: p. 331-339.
138. Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Madrid-González C, Burguete-García AI, Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, et al. Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World J Clin Oncol.* 2014; 5(4): p. 753-763.

139. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: p. 337–348.
140. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2008; 226: p. 87-102.
141. Lin W, Niu Z, Zhang H, Kong Y, Wang Z, Yang X, et al. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg during the development of uterine cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019; 12: p. 3604-3612.
142. Xue J, Wang Y, Chen C, Zhu X, Zhu H, Hu Y. Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection. *Cancer Med*. 2018; 7(2): p. 297-306.
143. Walch-Rückheim B, Mavrova R, Henning M, Vicinus B, Kim YJ, Bohle RM, et al. Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBP β to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. *Cancer Res*. 2015; 75: p. 5248-5259.
144. Yu Q, Lou XM, He Y. Preferential recruitment of Th17 cells to cervical cancer via CCR6-CCL20 pathway. *PLoS One*. 2015; 10(3): p. e0120855.
145. Alves J, De Medeiros Fernandes T, De Araújo J, Cobucci R, Lanza D, Bezerra FL, et al. Th17 response in patients with cervical cancer. *Oncology letters*. 2018; 16(5): p. 6215–6227.
146. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006; 212: p. 8-27.
147. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008; 133: p. 775-787.
148. Vignali D, Collison L, Workman C. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: p. 523–532.
149. Wu MY, Kuo TY, Ho HN. Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3⁺ T lymphocytes in cervical cancer. *J Formos Med Assoc*. 2011; 110: p. 580-586.
150. Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. 2007; 98: p. 874-881.
151. Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. Regulatory T cells in a spectrum of HPV-induced cervical lesions: cervicitis, cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 60: p. 55-65.
152. van der Burg SH, Piersma SJ, de Jong A, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, van den Hende M, et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4⁺ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(29): p. 12087–12092.
153. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zavaleta L, et al. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer research*. 2001; 61(16): p. 6281–6289.

154. Mora-García ML, Ávila-Ibarra LR, García-Rocha R, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Don-López CA, et al. Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway. *Cellular immunology*. 2017; 320: p. 46–55.
155. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Harbor CS, editor. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
156. Halbert CL, Demers GW, & Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal of virology*. 1991; 65(1): p. 473–478.
157. Chomczynski P, & Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987; 162(1): p. 156–159.
158. Rochman Y, Spolski R, & Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(7): p. 480–490. DOI: 10.1038/nri2580.
159. Yasumura S, Lin WC, Weidmann E, Hebda P, & Whiteside TL. Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *International journal of cancer*. *Int J Cancer*. 1994; 59(2): p. 225-234.
160. Malek TR, & Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*. 2010; 33(2): p. 153-165. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
161. R RC, L RC, G FF, C GR, I SC, F MR, et al. Expresión diferencial de los dos componentes del receptor de interleucina-2 en cáncer de cuello uterino células. In En: Moraes M BRBRe, editor. *Actas del 17º congreso internacional de cáncer*. Italia: Monduzzi Editore; 1998. p. p. 1239–43.
162. Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, et al. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of virology*. 2003; 77(19): p. 10186–10201. DOI: 10.1128/jvi.77.19.10186-10201.2003.
163. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, & Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*. 2015; 25 Suppl 1(Suppl Suppl 1): p. 2–23. DOI: 10.1002 / rmv.1822.
164. Reinecker HC, & Podolsky DK. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(18): p. 8353-8357. DOI: 10.1073/pnas.92.18.8353.
165. Gruss HJ, Scott C, Rollins BJ, Brach MA, & Herrmann F. Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R alpha- and beta-chain subunits: association of IL-2 binding with secretion of the monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*. 1996; 157(2): p. 851-857..
166. McMillan DN, Kernohan NM, Flett ME, Heys SD, Deehan DJ, Sewell HF, et al. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *Int J Cancer*. 1995; 60(6): p. 766–772. DOI: 10.1002/ijc.2910600606.

167. Rimoldi D, Salvi S, Hartmann F, Schreyer M, Blum S, Zografos L, et al. Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 1993; 13(3): p. 555-564.
168. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity.* 2010; 32(1): p. 79–90. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.11.012.
169. Matsuoka KI, Koreth J, Kim HT, Bascug G, McDonough S, Kawano Y. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci Transl Med.* 2013; 5(179): p. 179ra43. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005265.
170. Scheffold A, Murphy KM, Höfer T. Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat Immunol.* 2007; 8(12): p. 1285–1287. DOI: 10.1038/ni1207-1285.
171. Scheffold A, Hühn J, Höfer T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol.* 2005; 35(5): p. 1336–1341. DOI: 10.1002/eji.200425887.
172. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* 2005; 6(4): p. 331–337. DOI: 10.1038/ni1179.
173. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8(12): p. 1353–1362. DOI: 10.1038/ni1536.
174. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* 2004; 34(9): p. 2480–2488. DOI: 10.1002/eji.200425274.
175. Panelli MC, Wang E, Phan G, Puhlmann M, Miller L, Ohnmacht GA, et al. Gene-expression profiling of the response of peripheral blood mononuclear cells and melanoma metastases to systemic IL-2 administration. *Genome Biol.* 2002; 3(7): p. research0035.1. DOI: 10.1186 / gb-2002-3-7-research0035.
176. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med.* 2011; 365(22): p. 2067–2077. DOI: 10.1056/NEJMoa1105143.
177. Gooding R, Riches P, Dadian G, Moore J, Gore M. Increased soluble interleukin-2 receptor concentration in plasma predicts a decreased cellular response to IL-2. *Br J Cancer.* 1995; 72(2): p. 452–455. DOI: 10.1038/bjc.1995.354.
178. Hanahan D, & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): p. 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
179. Yu P, & Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest.* 2006; 86(3): p. 231-245. DOI: 10.1038/labinvest.3700389.
180. Radvanyi LG, Bernatchez C, Zhang M, Fox PS, Miller P, Chacon J, et al. Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2018; 18(24): p. 6758-6770. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1177.

181. Trentin L, Zambello R, Bulian P, Cerutti A, Milani A, Pirone E, et al. Functional role of IL-2 receptors on tumour-infiltrating lymphocytes. *Br J Cancer*. 1994; 69(6): p. 1046-1051. DOI: 10.1038/bjc.1994.206.

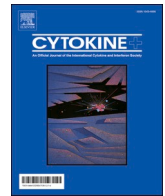
14. Apéndice. Artículo requisito para la obtención del grado

Trujillo-Cirilo L, Torres-Corioriles EI, Rangel-Corona R, Corona-Ortega MT, Weiss-Steider B. Evidence that the viral oncoproteins E6 and E7 of HPV induce the expression of a functional IL-2R on cervical cancer cells. *Cytokine*. 2021;155592. DOI: [10.1016/j.cyto.2021.155592](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155592).



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Evidence that the viral oncoproteins E6 and E7 of HPV induce the expression of a functional IL-2R on cervical cancer cells

Leonardo Trujillo-Cirilo, Edgar Ivan Torres-Corioriles, Rosalva Rangel-Corona^{*}, Maria Teresa Corona-Ortega, Benny Weiss-Steider

Laboratory of Cellular Oncology, Research Unit Cell Differentiation and Cancer, L-4 P.B. FES Zaragoza, National University of Mexico, Av., Guelatao No. 66 Col. Ejercito de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cervical cancer
HPV E6 and E7
IL-2
IL-2R $\alpha\beta\gamma$
Transfection

ABSTRACT

HPV-positive (HPV+) cervical cancer (CC) cells have been reported to express the IL-2 receptor (IL-2R) in contrast to virus-negative CC cells. This work was carried out to evaluate whether HPV infection induces IL-2R expression in CC cells. The analysis of the IL-2R expression data collected from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype Tissue Expression project (GTEx) using the Xena platform demonstrate a higher expression of IL-2R subunits in CC tumors in comparison with normal tissues. Moreover IL-2R β expression is consistently higher in HPV+ tumors versus HPV- tumors. Furthermore, it was demonstrated that transfection of the HPV E6/E7 genes into the C33A (HPV-) cell line promotes IL-2R expression and regulates proliferation in response to exogenous IL-2. Additionally, we found that HPV+ cell lines enhances their proliferation in co-culture with peripheral blood lymphocytes (PBLs). To corroborate that the viral proteins E6 and E7 were related to the effects mediated by IL-2, we used cells derived from the HeLa cell line in which the expression of E6/E7 has decreased, we found that it loses the ability to respond to the exogenous IL-2 stimuli. Finally, the importance of IL-2R in CC, as an immune escape mechanism, is discussed.

1. Introduction

Most cervical cancer (CC) cells arise from by persistent human papillomavirus (HPV) infections and express the viral oncoproteins E6 and E7 [1,2]. It has been reported that HPV-positive (HPV+) CC cells express the IL-2 receptor (IL-2R), while HPV-negative (HPV-) cells do not express it [3–5], and the IL-2R expression increases depending on the tumor stage [6,7]. Interleukin-2 (IL-2) is an immunoregulatory cytokine that promotes the proliferation of different subpopulations of T lymphocytes, additionally promotes CD8+ T cell and natural killer cell

(NK) cytolytic activity and modulates T cell differentiation programs in response to antigen [8]. IL-2 signaling is mediated through binding to different IL-2R subunits, the high-affinity IL-2R is formed by the IL-2R α subunit (CD25), the IL-2R β subunit (CD122) and the γ c subunit (CD132), while the intermediate-affinity IL-2R is comprised of the IL-2R β and γ c subunits [9]. In previous works it has been shown that low concentrations of IL-2 induce the proliferation of HPV+ CC cells, while high concentrations of IL-2 inhibit their proliferation [10,3]. Unlike CC cells, *in vitro* cultured lymphocytes require high concentrations of IL-2 to proliferate [11,10], this difference in response to IL-2 between

Abbreviations: ANOVA, Analysis of Variance; ATCC, American Type Culture Collection; CC, Cervical cancer; CD, Cluster of differentiation; cDNA, Complementary DNA; CD8+ T, CD8-positive T-Lymphocytes; DMEN, Dulbecco's modified eagle medium; dNTPs, Deoxynucleotide triphosphates; DTT, Dithiothreitol; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, Fetal bovine serum; FITC, Fluorescein isothiocyanate; GTEx, Genotype-Tissue Expression; HPV, Human papillomavirus; HPV-, HPV-negative; HPV+, HPV-positive; HRP, Horseradish peroxidase; IFN I, Type 1 interferon; IL, Interleukin; IL-2, Interleukin-2; IL-2R, IL-2 receptor; IL-2R $\alpha\beta\gamma$, IL-2R alpha, beta and gamma subunits; IU, International units; JAK, Janus kinase; MHC, Major histocompatibility complex; NK, Natural killer cells; PBLs, Peripheral blood lymphocytes; PBS, Phosphate-buffered saline; PVDF, Polyvinylidene fluoride; RNA-Seq, RNA sequencing; RSEM, RNA-Seq by Expectation-Maximization; RT-PCR, Reverse transcription-polymerase chain reaction; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; STAT, Signal transducer and activator of transcription; TCGA, The Cancer Genome Atlas; TILs, Tumor-infiltrating lymphocytes; TNF- α , Tumor necrosis factor alfa; TLRs, Toll-Like receptors; UCSC, University of California Santa Cruz; WB, Western blot.

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: trujilloleonardo@hotmail.com (L. Trujillo-Cirilo), edgar.t.corioriles@gmail.com (E.I. Torres-Corioriles), rancor@unam.mx (R. Rangel-Corona), tcvaldes@unam.mx (M.T. Corona-Ortega), bennyweiss@hotmail.com (B. Weiss-Steider).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155592>

Received 13 November 2020; Received in revised form 14 May 2021; Accepted 17 May 2021

1043-4666/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

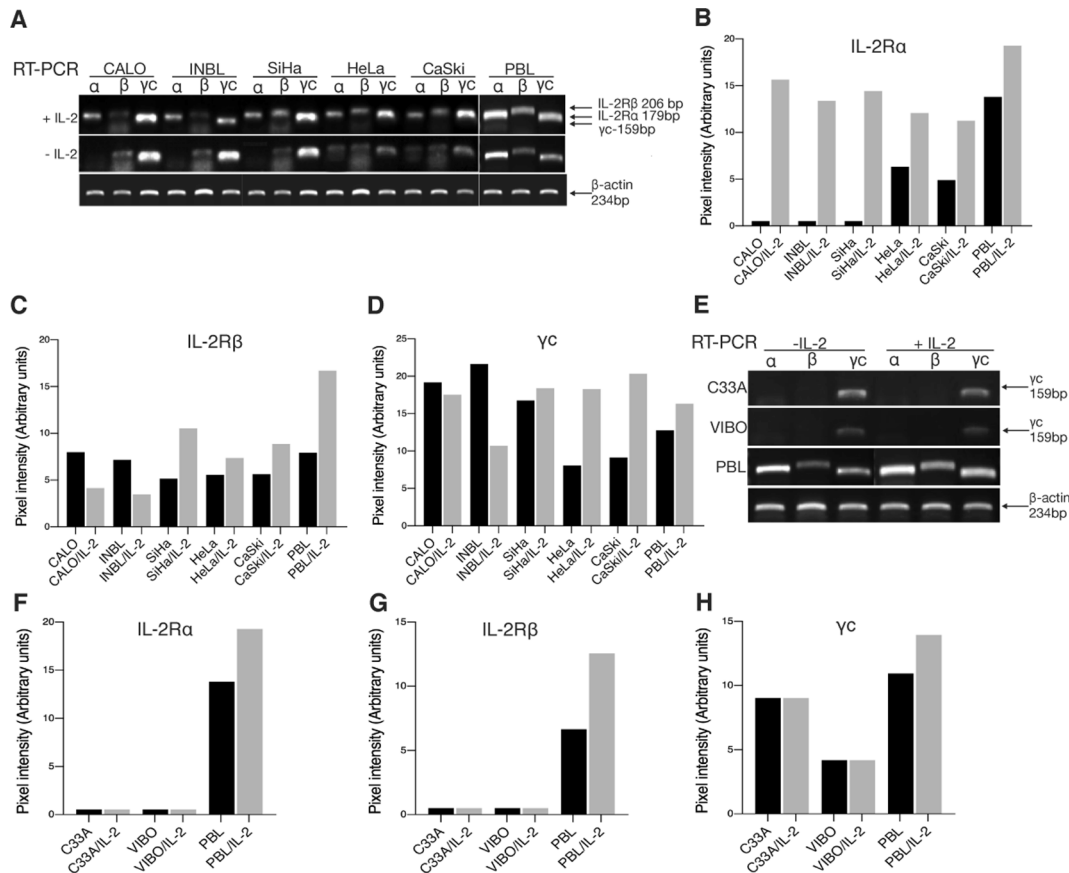


Fig. 1. Expression of IL-2R α , IL-2R β and γ c subunits in CC cell lines. (A) HPV-positive CC cell lines stimulated for 24 h with 10 IU/mL IL-2. Using RT-PCR and primers for IL-2R α : 179 bp, IL-2R β : 206 bp and γ c: 159 bp, the expression of IL-2R in HPV-associated CC cells was analyzed. (E) C33A and VIBO cell lines cultured for 24 h with 10 IU/mL IL-2. β -actin (234 bp) was used as an internal control and the black arrows correspond to base pairs (bp). (B-D, F-H) The levels of IL-2R α , IL-2R β and γ c subunits expression were analyzed via the DigiDoc-It Imaging Software and normalized to β -actin. All amplification products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light by ethidium bromide staining.

lymphocytes and CC cells has been attributed to the fact that CC cells elicit constitutive phosphorylation of JAK3 and the absence of phosphorylation of JAK1 in the IL-2R activation pathway [12,10]. It has been proposed that tumor infiltrating lymphocytes (TILs) do not have the ability to proliferate and be cytotoxic because tumor cells sequester IL-2 from the microenvironment through IL-2R [12]. Despite the infiltration of TILs in CC tumors, these do not elicit a cytotoxic response towards tumor cells [13].

HPV has the ability to modulate the expression of different components of the immune system to escape from immune recognition and simultaneously promote tumor development. It has been shown that HPV viral E6 and E7 proteins can negatively regulate the expression of Toll-like immune defense receptors (TLRs) and the expression of the major histocompatibility complex (MHC) in cell lines [14–16], however, MHC expression is not suppressed in tumors [17]. Viral oncoproteins E6 and E7 have been associated with various mechanisms of tumor induction and immune escape by inhibiting the expression of various cytokines such as Interleukin (IL)-1, IL-18, TNF- α , and IFN I and II [18–20] and on the other hand, increasing the expression of the cytokines IL-6, IL-10 and IL-17 [21–23]. The development of CC depends on the sustained expression of the viral oncogenes E6 and E7, they act together to transform the host cell [24]. The expression of IL-2R in CC cells and the depletion of IL-2 could be another strategy that tumor cells use to evade immunological recognition by depriving T lymphocytes of IL-2 [12].

This work was carried out to evaluate whether HPV oncoproteins E6 and E7 are responsible for IL-2R expression in CC cells. For this, the expression of IL-2R was analyzed in CC cell lines, tumor samples and normal tissues, the C33A (HPV $-$) cell line was transfected with the E6

and E7 genes, and the expression of IL-2R was evaluated. The ability of the transfected cells to respond to low and high concentrations of IL-2 was determined, as well as their proliferation in co-culture with heterologous peripheral blood lymphocytes (PBLs). The HeLa-shE6E7 cell line was also used to assess whether it loses its response to IL-2 due to low expression of E6 and E7.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The CC, CALO (HPV18+), INBL (HPV18+) and VIBO (HPV $-$) cell lines were established in the Cell Oncology Laboratory of the Faculty of Higher Studies Zaragoza [25,26] and cultured with RPMI-1640 medium (Microlab., Mexico). The cell lines, C33A (HPV $-$), SiHa (HPV16+), HeLa (HPV18+) and CaSki (HPV18+) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC., Manassas, VA, USA) and cultured with Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco., Grand Island, NY, USA). The culture media was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco., Grand Island, NY, USA), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA). All cells were cultured at 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ and a saturated humid atmosphere. The HeLa-shE6/E7 cell line was provided by Dr Alberto Monroy Garcia [26]. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were collected from healthy volunteers using a vacutainer (BD Bioscience., CA, USA) tube that contained EDTA. To separate the PBLs, the blood sample was centrifuged at 400g for 30 min with Histopaque-1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and cultured for 24 h at 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ and a saturated humid

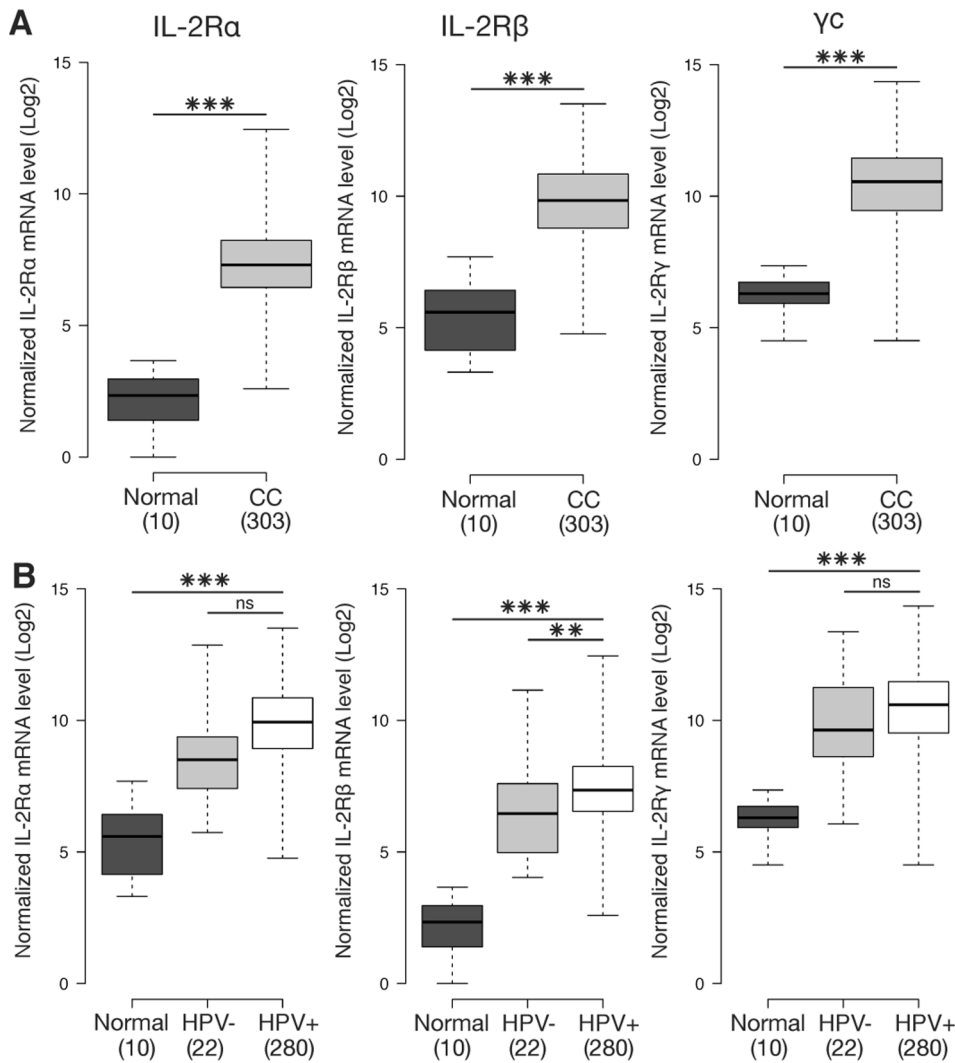


Fig. 2. IL-2R expression in cervix of healthy normal and cervical cancer tumors. The expression of IL-2R in healthy cervix tissues (GTEx) and CC tumors (TCGA) were downloaded from UCSC Xena browser tool. (A) Expression of the IL-2R subunits in CC tumors and normal control tissue. (B) Expression of the IL-2R subunits in HPV+ tumors compared to HPV- tumors. Numbers in brackets refer to the number of samples included in each analysis. Significance values are indicated as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$), ns not significant.

atmosphere.

2.2. Transformation and transfection

The XL-1blue bacteria was transformed by heat shock described by Sambrook [27] with the vectors pLXSN16E6E7 (Addgene., plasmid ID 52394 [28]) and pLXSN18E6E7 (Addgene., plasmid ID 53459 [28]) which present the bicistronic E6/E7 of HPV16 and HPV18, respectively. The selection was made by resistance to ampicillin (100 μ g/mL). C33A cell line was seeded in 6-well plates at a density of 8×10^4 cells per well and they cultivated until reaching a confluence of 80–90%. Cells were stably transfected with 10 μ g of each DNA vector (pLXSN16E6E7 and pLXSN18E6E7) using lipofectamine-2000 (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and selected with DMEN medium with 500 μ g/mL of G418 (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) for 4 weeks.

2.3. RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells cultured for 24 h using the protocol described by Chomczynski and Sacchi [29], with TRIzol (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA). The samples were treated with DNase I (Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The complementary DNAs (cDNAs) were synthesized from 5

μ g of RNA using a reverse transcription system (M-MLV, Invitrogen., Carlsbad, CA, USA) in a total reaction volume of 25 μ L with 1 μ M of Oligo DT (500 μ g/mL), 0.48 mM of deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 0.1 M dithiothreitol (DTT), 1X buffer 5X and 200 U/ μ L M-MLV. The reaction was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 50 min and subsequently at 70 $^{\circ}$ C for its inactivation. The PCR amplification of each specific primer was performed with 10 ng/mL of cDNA in a reaction volume of 25 μ L with the Gotaq Hot Start kit (Promega., Madison, WI, USA) with 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.4X buffer 5X, 1 μ M of each primer, 0.5U of Hot Start polymerase (5 U/ μ L) and a temperature change of 2 min at 95 $^{\circ}$ C, followed by 30 cycles of 50 s at 95 $^{\circ}$ C, 50 s at 50–55 $^{\circ}$ C and 2 min at 72 $^{\circ}$ C. The following primers were used for PCR: IL-2R α 5'-GGGAAAAT-GAAGCCACAGAG-3' and 5'-GGTCTCCATTTCACCTGTGC-3', IL-2R β 5'-GCTGATCAACTGCAGGAACA-3' and 5'-TGTCCTCTCAAGCATTCT-3', IL-2R γ C 5'-GTGCTCAGCATTGGAGTGAA-3' and 5'-TCCGTTCCAGCCA-GAAATAC-3'. For HPV16, the primers mentioned below were used: E6 5'-TTGCTTTTCGGGATTTATGC-3' and 5'-TCAGGACACAGTGGCTTTTG-3', E7 5'-TTTGCAACCAGAGACAACACTGA-3' and 5'-GCCATTAA-CAGGTCTTCCA-3'. For HPV18: E6 5'-GCGACCCTACAAGCTACCTG-3' and 5'-GTTGGAGTCGTTCCCTGTCGT-3', E7 5'-GCATGGACCTAAGG-CAACAT-3' and 5'-TGTTGCTTACTGCTGGGATG-3'. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5–2% agarose gel and visualized under ultraviolet light by ethidium bromide staining.

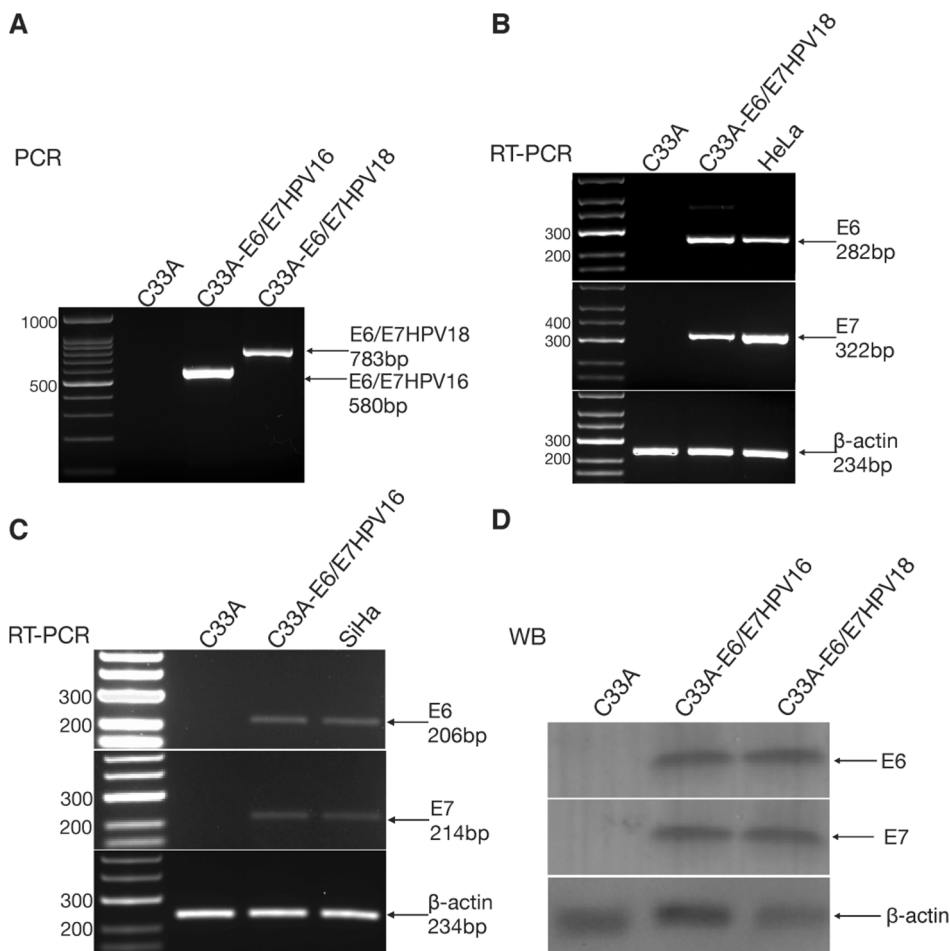


Fig. 3. HPV E6 and E7 transcripts are detected in C33A cell line stably transfected with the HPV E6 and E7 genes. The bacteria XL-1Blue was transformed with the vectors pLXSN16E6E7 (6700 bp) and pLXSN18E6E7 (6688 bp) by means of heat shock followed by a selection for resistance ampicillin (10 mg/mL) and later an extraction of the vectors was performed by alkaline lysis to determine the integrity. (A) DNA extraction from C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells was carried out and the integration of the vector was analyzed using primers for E6-F and E7-R from HPV16 (580 bp) or HPV18 (783 bp). (B, C) The expression of E6 (206 bp) and E7 (214 bp) of HPV16 and E6 (282 bp) and E7 (322 bp) of HPV18 was analyzed by RT-PCR. (D) Western blot (WB) for E6 and E7 protein in C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 transfected cells with the corresponding construct. β -actin (234 bp) was used as an internal control and the black arrows correspond to bp. The SiHa and HeLa cells lines were used as positive controls for the expression of E6 and E7 from HPV16 or HPV18 respectively. All amplification products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light by ethidium bromide staining.

2.4. Proliferation assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^3 and 1×10^4 cells/well for 24 h in serum-free medium to synchronize the cells. They were cultured for 48 (1×10^4 cells) or 144 (1×10^3 cells) hours at 37 °C in the presence of 10 and 100 IU of IL-2 (R&D Systems., Minneapolis, MN, USA) [10], they were fixed with 0.25% glutaraldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and cell proliferation was evaluated by the 4.5% crystal violet method (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) on a plate reader (Bio-Tek Co., VT, USA) at 570 nm absorbance. For the co-culture proliferation assay with PBLs, 5×10^4 CC cells were cultured in 48-well plates for 24 h, after 24 of culture the medium was removed and cells were washed with PBS, 150×10^4 PBLs were added to CC cells and they were cultured in this co-culture system for 24 h, then the cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and cell proliferation was evaluated by the 4.5% crystal violet method on a plate reader at 570 nm absorbance.

2.5. Data acquisition and comparison of RNA expression

RNA sequencing data (RNA-Seq) of normal cervical samples were acquired from the Genotype Tissue Expression project database (GTEx; <https://gtexportal.org/home/>) and data from CC samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>). The RNA-Seq data set from the two projects cannot be directly compared as they were processed and obtained using the Xena platform (<http://xena.ucsc.edu>), hosted by the Computational Genomics Lab of the University of California Santa Cruz (UCSC; <https://cglgenomics.ucsc.edu>). The GTEx and TCGA data were realigned by Xena Toil applying RESEM

normalization and extracted into Microsoft Excel for her organization. Expression data was pooled as CC HPV-positive (HPV+), HPV-negative (HPV-) tumors, and normal tissues, HPV status data was downloaded from the Broad Genome Data Analysis Center's Firehose server (<https://gdac.broadinstitute.org/>) and samples with unknown HPV were omitted. The RNA-Seq data set resulted in 10 normal tissue samples; 22 HPV- and 280 HPV+ samples. Boxplot comparison of gene expression was performed using GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Prism software, San Diego, CA, USA).

2.6. Western blot assays

C33A, C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells were harvested by trypsinization and lysed in a buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, and protease and phosphatase inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). Proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel and transferred to Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (BIO-RAD, California, USA). Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline $1 \times$ supplemented with 0.1% Tween-20 for 24 h at 4 °C and probed with the specific primary antibodies; E6 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), E7 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and β -actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:13000, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). The bands were visualized using enhanced chemiluminescence (Super Signal West Pico, Thermo Fisher Scientific) with a Chemi Doc MP (BIO-RAD, California, USA) imaging capture system.

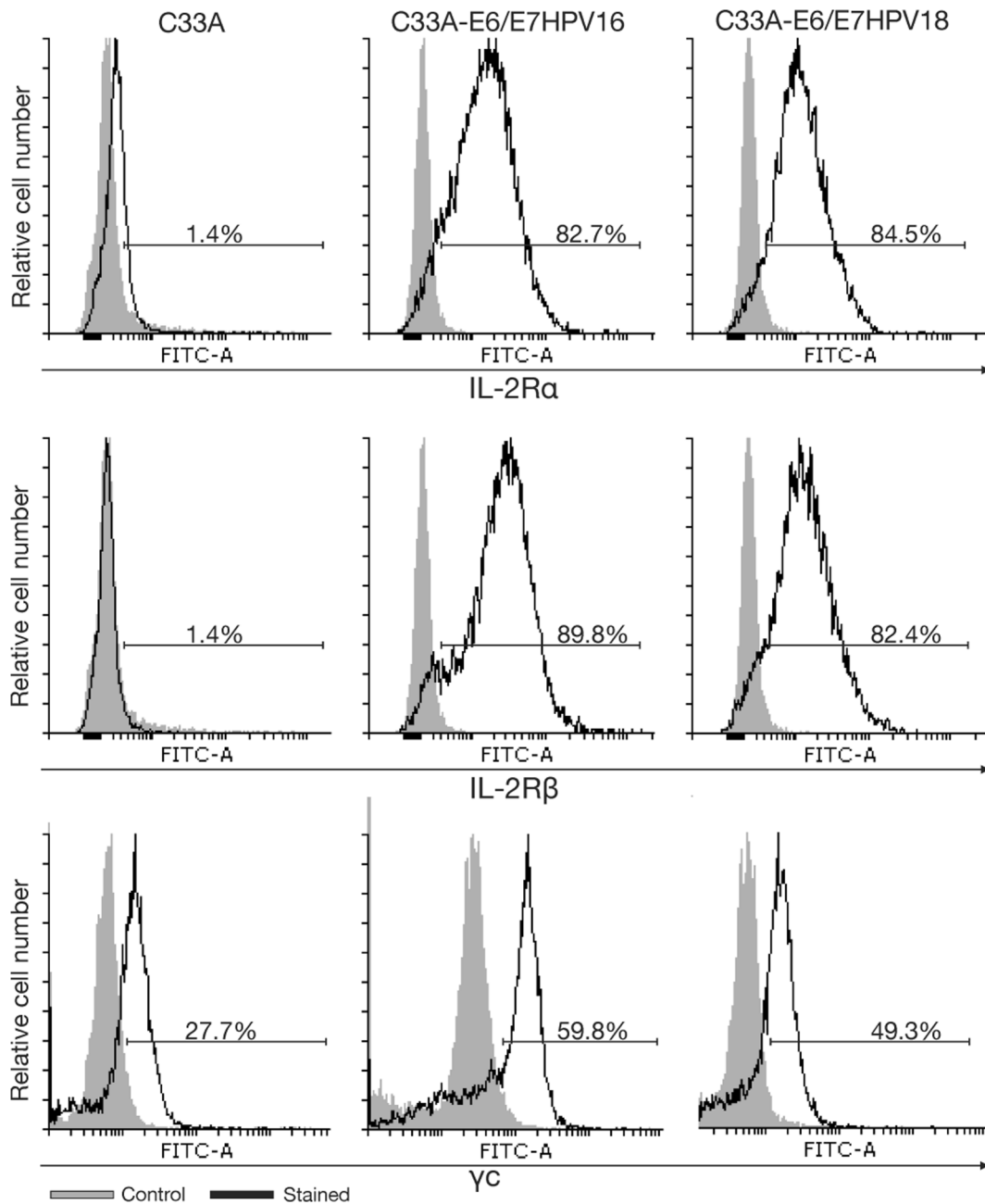


Fig. 4. IL-2R subunit abundance. Representative histograms of IL-2R α , IL-2R β , and γ C staining on the surface of C33A, C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines. Flow cytometric analysis of percentage of IL-2R expression on C33A, C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines. In the histograms, the grey lines represent the staining controls and the black represent the stained cells. Flow cytometry was performed as described in Materials and methods, and the data are presented as log fluorescence intensity.

2.7. Flow cytometry

Cell surface expression of IL-2R α , IL-2R β and γ C subunits were performed by incubating the cells for 60 min at 4 °C in the dark at optimal concentrations of antibodies. Cells were labeled with a monoclonal mouse antihuman IL-2R α , (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse antihuman IL-2R β (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or mouse antihuman γ C (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by a sheep antimouse coupled to FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at a final dilution of 1:40 for 1 h at room temperature. Negative controls were labelled with an irrelevant isotype-matched monoclonal antibody. Dead cells were excluded from the analysis on the basis of staining with propidium iodide as well as forward and side scatter properties. Cells were analyzed with a

FACSAria II cytometer (Becton Dickinson, USA) and Flowing Software version 2.5.1.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Prism software, San Diego, CA, USA). Data is expressed as mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to compare the means of two independent samples, and one-way ANOVA was used to compare the means of multiple independent samples, a *P* < 0.05 was considered a statistically significant difference.

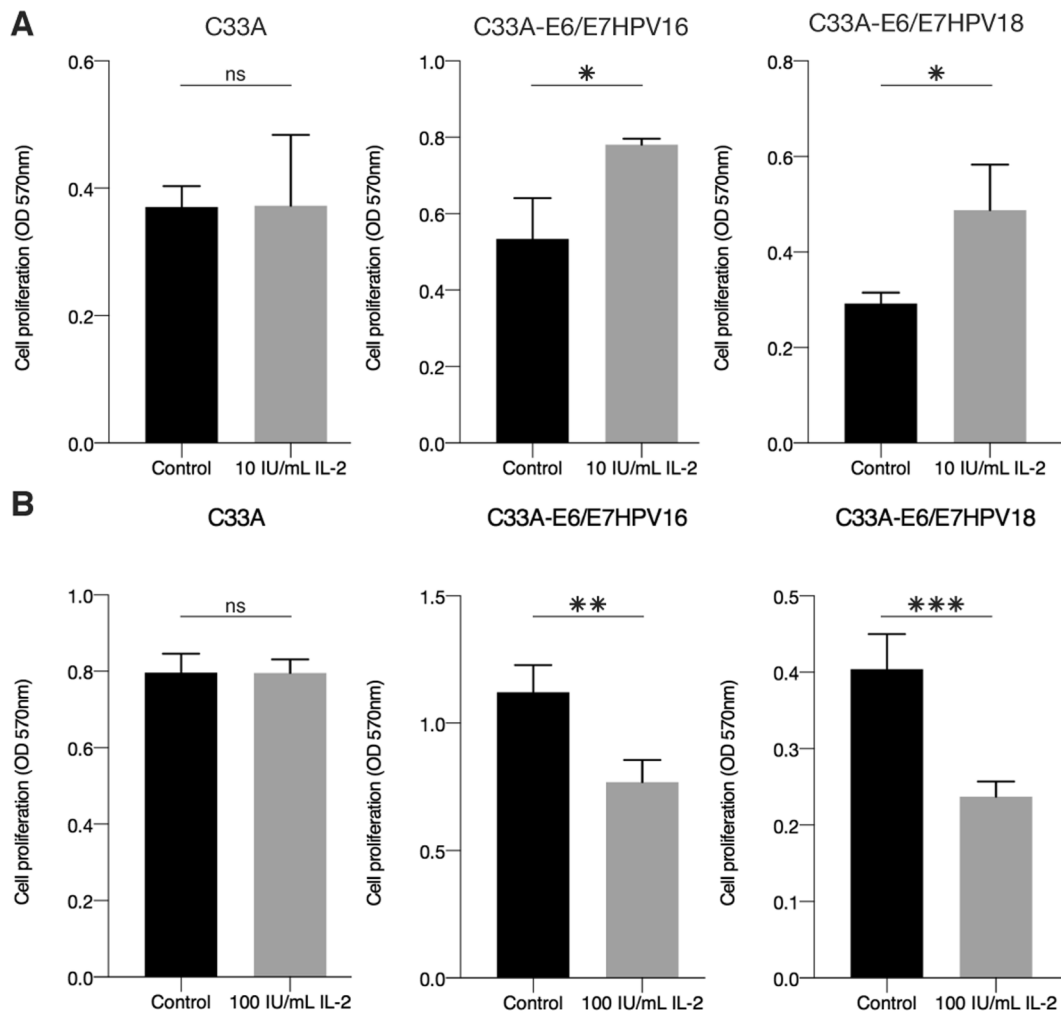


Fig 5. Exogenous IL-2 regulates the proliferation of the C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines. (A) C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells were cultured for 144 h in the presence of 10 IU/mL exogenous IL-2. (B) C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells were cultured for 48 h in the presence of 100 IU/mL exogenous IL-2. After the culture time, cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and quantified by the crystal violet method in a plate reader at an absorbance of 570 nm. All data is representative of at least $n = 3$ independent experiments. Significance values are indicated as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$), ns not significant.

3. Results

3.1. HPV-associated cervical cancer cell lines express the IL-2R β and γ subunit and when stimulated with IL-2 the expression of the IL-2R α subunit is induced

To demonstrate that IL-2R associates with HPV-positive CC cells, we analyzed the expression of the three IL-2R subunits in different CC cell lines. 1×10^6 HPV-positive cells were cultured; HeLa, CaSki, SiHa, INBL and CALO, and HPV-negative cells; C33A and VIBO for 24 h in the presence and absence of 10 IU/mL of exogenous IL-2 and the expression of the IL-2R α , IL-2R β and γ subunits were determined by RT-PCR. The results show that all HPV-positive CC cell lines express the IL-2R β and γ subunits, while the expression of the IL-2R α subunit was induced with exogenous IL-2 (Fig. 1A). In contrast, HPV-negative CC cell lines do not express the IL-2R α and IL-2R β subunits (Fig. 1E). The γ subunit is not exclusive to IL-2R, it is part of several cell receptors, particularly cytokine receptors [30]. The level of expression of the three IL-2R subunits in CC cell lines were compared with that found in PBLs. C33A and VIBO cells did not express significant levels of the IL-2R α and IL-2R β , only lower levels of γ subunit compared with HPV+ cell lines and PBLs (Fig. 1F, 1G and 1H). The results indicate that the IL-2R α and IL-2R β subunits are not expressed in HPV-negative CC cell lines.

3.2. Expression of IL-2R in cervical cancer tumors and its association with HPV

To confirm the expression of IL-2R in CC and its association with HPV, the expression of the IL-2R α , IL-2R β and γ subunits in CC tissue samples and normal tissues were compared. Illumina HiSeq RNA expression data from more than 300 CC samples from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and expression data from 10 normal cervical tissues from the Genotype Tissue Expression Project (GTEx) were analyzed, acquiring the results using the UCSC Xena browser tool. Analysis of TCGA/GTEx data reveals significantly elevated expression of the three IL-2R subunits in CC tissues compared with healthy cervix tissues (Fig. 2A). The samples were grouped as HPV-positive (HPV+) and HPV-negative (HPV-) tumors. Similarly, the HPV+ samples expressed significantly elevated levels of the IL-2R α , IL-2R β and γ subunits compared with HPV- or normal samples, being significant only for the IL-2R β subunit (Fig. 2B). The results demonstrated a significant upregulation of IL-2R in CC tissues compared with healthy cervix tissues. Moreover, the results indicate that IL-2R β subunit expression is consistently higher in HPV+ tumors versus HPV- tumors. Overall, the increased expression of IL-2R suggests that it is likely to play a role in the development of CC.

3.3. Transfection of the HPV viral E6 and E7 genes into the HPV-negative C33A cell line.

To investigate the role of HPV in regulating IL-2R expression in CC, the C33A (HPV⁻) cell line was transfected with the E6 and E7 genes of HPV16 and HPV18. The C33A cell line was stably transfected with the recombinant vector pLXSN16E6E7 and pLXSN18E6E7, they were selected by DMEN and G418 for a month. The transfected cells were named C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18, both cell lines keep the bicistron E6/E7 integrated in their genome (Fig. 3A), with a stable expression of the E6 and E7 transcripts (Fig. 3B and 3C) and the corresponding proteins for HPV16 and HPV18 (Fig. 3D). In addition, both cell lines expressed similar levels of E6 and E7. Taken together, both HPV E6 and E7 oncoproteins are expressed in the C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines.

3.4. C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines transfected with the HPV E6 and E7 genes express the three IL-2R subunits

After confirming the stable expression of the E6/E7 genes, the expression of the IL-2R α , IL-2R β and γ c subunits were evaluated by flow cytometry. The results show that the cells transfected with E6 and E7 express the different IL-2R subunits. The three subunits of the high-affinity IL-2R are expressed in the C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines, while in C33A cells only the γ c subunit is expressed (Fig. 4). A considerable disproportionality was found between the relative cell surface densities of the three IL-2R subunits on C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines compared to C33A cell line. IL-2R α and IL-2R β are twice as abundant in C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines compared with the γ c subunit. These results demonstrate that in cells transfected with the HPV E6/E7 genes the expression of high affinity IL-2R is induced.

3.5. C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells increase their proliferation at low concentrations of IL-2 and are inhibited at high concentrations

In previous studies, it has been shown that low concentrations of exogenous IL-2 (10 IU/mL) induce the proliferation of CC cell lines that express IL-2R, while high concentrations of IL-2 (100 IU/mL) inhibit its proliferation [4,10]. To evaluate the effect of IL-2 on the proliferation of the transfected cells, the C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines were cultured with 10 IU/mL of IL-2 for 144 h and with 100 IU/mL of IL-2 for 48 h. The proliferation results show that C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells significantly increase their proliferation after stimulation with 10 IU/mL of IL-2 unlike C33A cells (Fig. 5A). Stimulation with 100 IU/mL of IL-2 for 48 h significantly inhibited the proliferation of C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells, while C33A cells did not show a change in their proliferation (Fig. 5B). These results suggest that IL-2 binds to IL-2R subunits in E6/E7 transfected cells to regulate their proliferation.

3.6. C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells increase their proliferation when they are in co-culture with heterologous lymphocytes

Due to the fact that IL-2 is an important cytokine of the tumor cell microenvironment and a key mediator of immune cell homeostasis [31], we analyzed whether tumor cells expressing IL-2R sequester IL-2 secreted by lymphocytes after recognition of tumor antigens. C33A, C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells were cultured for 24 h to allow adherence and then co-cultured with heterologous PBLs from a healthy volunteer for 24 h. The results of our assay show that C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cells significantly increase their proliferation when they are cultured in the presence of PBLs, while HPV-negative cells do not (Fig. 6). This result suggests that the tumor cells sequester the IL-2 secreted by the lymphocytes as a paracrine

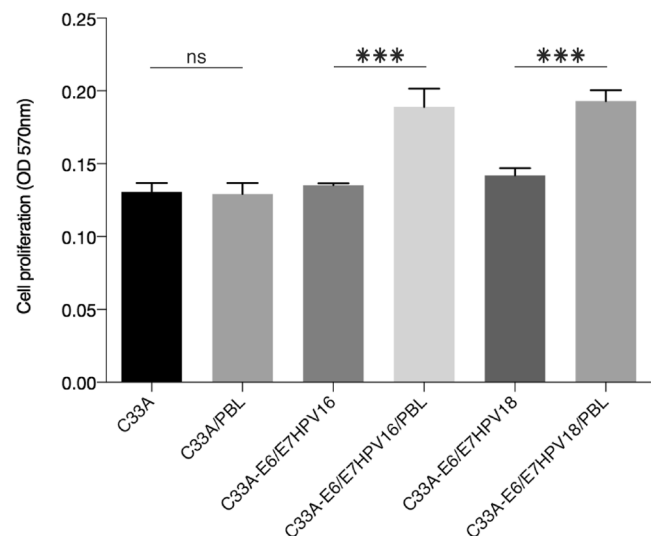


Fig. 6. Cell lines C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 proliferate in co-culture with PBLs. C33A, C33A-E6/E7HPV16 and C33A-E6/E7HPV18 cell lines were co-cultured for 24 h with heterologous PBLs. After the culture time, the cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and quantified by the crystal violet method in a plate reader at an absorbance of 570 nm. All data is representative of at least n = 3 independent experiments. Significance values are indicated as * (p < 0.05), ** (p < 0.01) and *** (p < 0.001), ns not significant.

proliferation factor.

3.7. The reduced expression of E6 and E7 in the HeLa-shE6/E7 cell line causes the loss of the effects mediated by IL-2

To confirm the participation of the E6 and E7 oncoproteins in the regulation of IL-2R subunits and in the effects of IL-2 on CC cells, the HeLa-shE6/E7 cell line was used, in which a decrease in E6/E7 expression of 80% has been reported [26] as shown in Fig. 7A. Despite maintaining a low expression of E6/E7, the HeLa-shE6/E7 cell line presents sustained proliferation. HeLa-shE6/E7 cell line was cultured for 144 h in the presence of 10 IU/ml of IL-2 and for 48 h in the presence of 100 IU/ml of IL-2. The results show that IL-2 does not modify the proliferation of the HeLa-shE6/E7 cell line, as with the HeLa cell line (Fig. 7B and 7C). In co-culture with heterologous PBLs, the HeLa-shE6/E7 cell line did not increase its proliferation unlike the HeLa cell line (Fig. 7D). Our results suggest that the diminished expression of E6/E7 causes the HeLa-shE6/E7 cell line not to respond to IL-2, similarly to what happens with HPV-negative CC cell lines.

4. Discussion

When it was discovered that cervical cancer (CC) cells expressed the IL-2 receptor (IL-2R), normally associated with leukocytes, it was proposed that it could be a new mechanism that tumor cells use to evade immune recognition [32,12]. Furthermore, this observation was supported by the fact that IL-2R expression increases as a function of the tumor stage [6]. Interestingly, IL-2R expression is associated with HPV-positive CC cell lines [3]. Based on these observations it was speculated that the expression of IL-2R was related to HPV. It is known that the viral oncoproteins E6 and E7 of HPV are the main responsible for the neoplastic transformation in CC [33,1], having the ability to modulate the gene expression of tumor cells [34,35]. Consequently, HPV-transformed cells exhibit many changes in gene expression that contribute to the initiation and maintenance of oncogenic phenotypes, which is why it was thought that these oncoproteins are responsible for inducing the expression of IL-2R. Using RNA-Seq data from CC tumors we confirmed a higher expression of IL-2R in CC tumors compared to

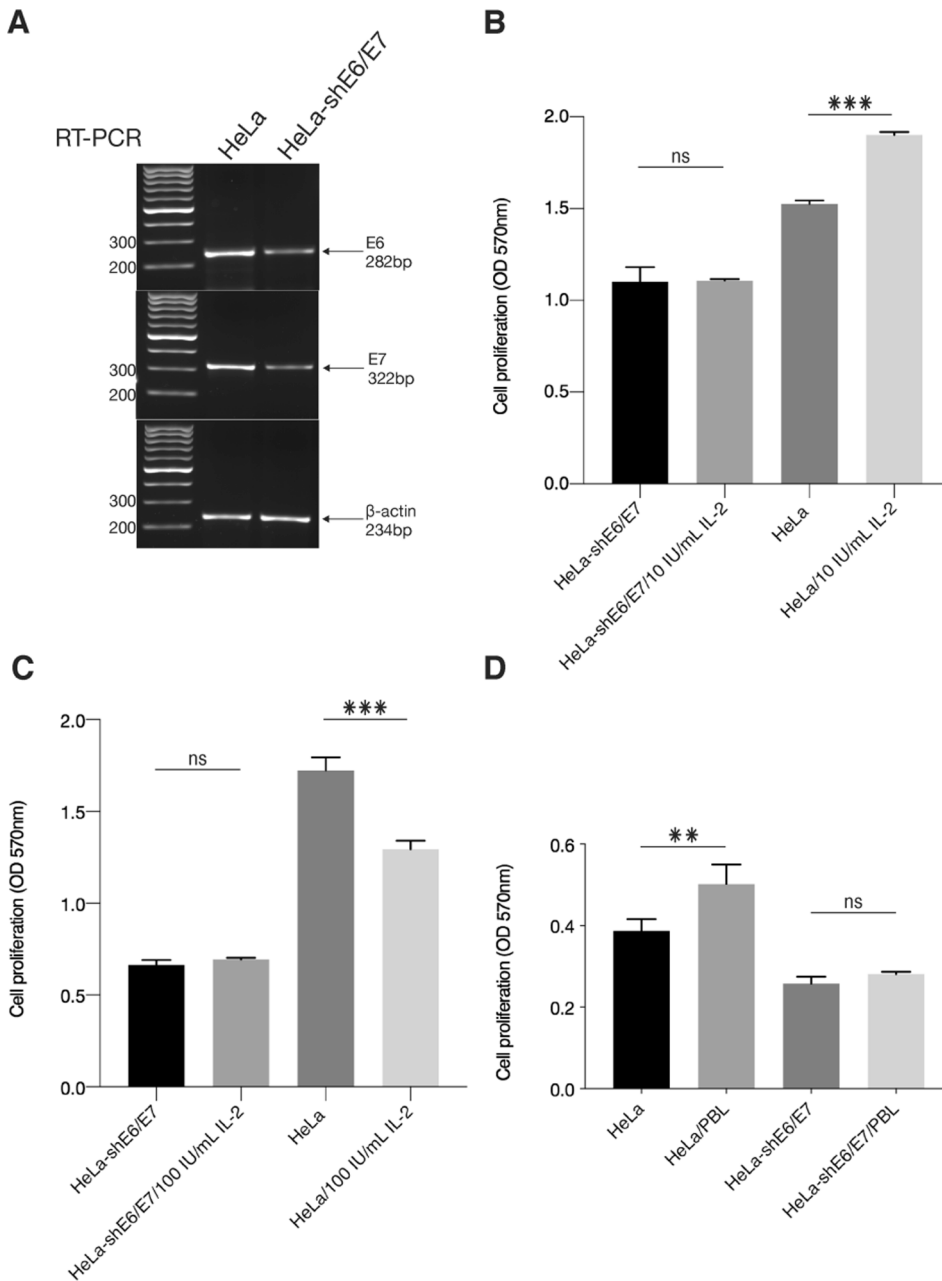


Fig. 7. HPV E6 and E7 oncoproteins regulate IL-2 dependent proliferation. (A) HPV-16 E6 and E7 expression in the HeLa and HeLa-shE6/E7 cell lines. (B) HeLa and HeLa-shE6/E7 cell lines were cultured for 144 h in the presence of 10 IU/mL of exogenous IL-2. (C) HeLa and HeLa-shE6/E7 cell lines were cultured for 48 h in the presence of 100 IU/mL of exogenous IL-2. After the culture time, the cells were fixed with 0.25% glutaraldehyde and quantified by the crystal violet method in a plate reader at an absorbance of 570 nm. (D) Co-culturing HeLa and HeLa-shE6/E7 cells with PBLs for 24 h of culture. All data is representative of at least $n = 3$ independent experiments. Significance values are indicated as * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$), ns not significant.

normal tissues and a significant correlation of the IL-2R β subunit with HPV+ tumors. The presence of this receptor has also been reported in different non-hematopoietic cell lines [36,37] and tumor cells [38–40,7]. Our expression analysis suggests that IL-2R may play an important role during tumor development, consistent with previous results from our working group. Despite these findings, more studies are required to propose IL-2R as a tumor biomarker.

In this work we demonstrate that the transfection of the E6 and E7 genes of HPV16 and HPV18 in the C33A cell line (HPV–) induced the expression of the IL-2R subunits. Cells transformed by HPV reprogram their gene expression to maintain a cancerous phenotype. In this context, our results suggest that the viral oncoproteins E6 and E7 positively regulate the expression of the three IL-2R subunits in CC cells, IL-2R expression may contribute to maintaining the malignant phenotype of tumor cells. Further studies are required to elucidate the mechanism for which viral proteins regulate IL-2R expression in tumor cells.

The presence of IL-2R in CC cells transfected with the E6/E7 genes made them susceptible to stimuli with IL-2. Low concentrations of IL-2

increased their proliferation, while high concentrations significantly inhibited it. Low concentrations of IL-2 were defined as the dose of IL-2 that prevents or is not sufficient to promote proliferation of lymphocytes *in vitro* and high concentrations as the dose necessary to promote proliferation. The loss of phosphorylation of JAK1 and the constitutive activation of JAK3 in CC cells associated with HPV could be a characteristic of tumor cells that express IL-2R [10], giving them the ability to respond to low concentrations of IL-2 unlike what happens to lymphocytes. Our results and previous reports show that CC cell lines promote their proliferation in the presence of exogenous IL-2 [3], the expression of IL-2R allows its interaction with IL-2.

Our results indicate that cells expressing IL-2R significantly increase their proliferation when cultured in the presence of heterologous leukocytes, unlike CC cells without IL-2R. We speculate that the low concentrations of IL-2 secreted by leukocytes after recognition of tumor cells were sequestered by CC cells expressing IL-2R to maintain a sustained proliferation. To support our observations that E6 and E7 could be involved in IL-2R expression we used the HeLa-shE6/E7 cell line in

which the expression of E6 and E7 is significantly decreased and found that this cell line loses its ability to respond to exogenous IL-2. Overall, the results suggest that tumor cells promote sustained proliferation by sequestering IL-2 from the microenvironment.

Our results support the hypothesis that CC cells utilize the IL-2R to drive inappropriate growth, contributing to a sustained proliferative signaling being a hallmark of cancer [41]. We could also speculate that the expression of IL-2R in HPV-positive CC cells could be a mechanism that tumor cells use to escape immune recognition by depleting the IL-2 needed for immune recognition and simultaneously promote their own proliferation. The difference in the response to IL-2 concentrations between tumor cells and lymphocytes could be a key event for preventing the activation of cells of the immune system. CC tumors have been reported to have large numbers of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) that do not polarize into cytotoxic lymphocytes [42,43]. However, if these TILs are isolated and cultured *in vitro* with high concentrations of IL-2, they become actively cytotoxic against tumor cells [44–47].

5. Conclusion

Our data clearly shows a significantly elevated expression of the three IL-2R subunits in CC tissues compared with healthy cervix tissues. Furthermore, our results show that HPV-positive CC and E6 and E7 transfected HPV-negative cell lines show elevated levels of IL-2R compared to HPV-negative cell lines. CC cells could utilize the IL-2R to drive inappropriate growth, contributing to a sustained proliferative signaling, a hallmark of cancer. Our results also suggest that the HPV E6 and E7 genes contribute to induce the expression of IL-2R. Lastly, we would like to speculate that HPV+ CC cells express IL-2R in order to sequester IL-2 from TILs while simultaneously promoting its proliferation.

6. Data availability

All data obtained during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

CRedit authorship contribution statement

Leonardo Trujillo-Cirilo: Conceptualization, Methodology, Software, Visualization, Writing - review & editing. **Edgar Ivan Torres-Corioriles:** Methodology, Data curation, Validation. **Maria Teresa Corona-Ortega:** Data curation, Validation. **Rosalva Rangel-Corona:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Benny Weiss-Steider:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Formal analysis, Visualization, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This paper was financially supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT IN-222118). This research article is a requirement of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM) by MSc. Leonardo Trujillo-Cirilo, thanking the scholarship granted by the National Council of Science and Technology (CONACyT). The authors acknowledge Dr. Alberto Monroy García for providing us with the HeLa-shE6/E7 cell line.

References

- [1] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, et al., Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* 189 (1) (1999) 12–19, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:13.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:13.0.CO;2-F).
- [2] C. Yee, I. Krishnan-Hewlett, C.C. Baker, R. Schlegel, P.M. Howley, Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines, *Am. J. Pathol.* 119 (3) (1985) 361–366.
- [3] L. Rocha-Zavaleta, C. Huitron, J.R. Cacères-Cortés, J.A. Alvarado-Moreno, A. Valle-Mendiola, I. Soto-Cruz, et al., Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer, *Cell. Signal.* 16 (11) (2004) 1239–1247, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.03.011>.
- [4] M.D.C. Lagunas-Cruz, A. Valle-Mendiola, J. Trejo-Huerta, L. Rocha-Zavaleta, M. L. Mora-García, A. Gutiérrez-Hoya, et al., IL-2 induces transient arrest in the G1 phase to protect cervical cancer cells from entering apoptosis, *J. Oncol.* 2019 (2019) 7475295, <https://doi.org/10.1155/2019/7475295>.
- [5] C. Herrera-Miranda, Determinación del receptor para IL-2, así como el efecto de IL-2 sobre la proliferación y regulación de genes mitocondriales (citocromo c) en la línea celular de cáncer cérvico uterino C33, Thesis, National Autonomous University of Mexico, Mexico, 2012.
- [6] R. Mindiola, D. Caulejas, J. Núñez-Troconis, M. Araujo, M. Delgado, J. Mosquera, Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix, *Invest. Clin.* 49 (4) (2008) 533–545.
- [7] R. Rangel-Corona, L. Rodríguez-Cruz, G. Flores-Flores, C. Gómez-Ruiz, I. Soto-Cruz, F. Mendoza-Rincón, et al., Differential expression of the two components of the interleukin-2 receptor in cervical cancer cells, in: Monduzzi, M. Moraes, R. Brentani, R. Bevilacqua (Eds.), Proceedings of the 17th International Cancer Congress; 1998; Rio de Janeiro, Brazil, pp. 1239–1243. ISBN 9788832308242.
- [8] O. Boyman, J. Sprent, The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (3) (2012) 180–190, <https://doi.org/10.1038/nri3156>.
- [9] X. Wang, M. Rickert, K.C. Garcia, Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors, *Science* 310 (5751) (2005) 1159–1163, <https://doi.org/10.1126/science.1117893>.
- [10] A. Valle-Mendiola, B. Weiss-Steider, L. Rocha-Zavaleta, I. Soto-Cruz, IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects, *Cancer Invest.* 32 (4) (2014) 115–125, <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.883526>.
- [11] A. Harel-Bellan, J. Bertoglio, A. Quillet, C.W.H. Marchiol, Z. Mishall, D. Fradelizi, Interleukin 2 (IL 2) up-regulates its own receptor on a subset of human unprimed peripheral blood lymphocytes and triggers their proliferation, *J. Immunol.* 136 (7) (1986) 2463–2469.
- [12] A. Valle-Mendiola, A. Gutiérrez-Hoya, M. Lagunas-Cruz, B. Weiss-Steider, I. Soto-Cruz, Pleiotropic effects of IL-2 on cancer: its role in cervical cancer, *Mediators Inflamm.* 2016 (2016) 2849523, <https://doi.org/10.1155/2016/2849523>.
- [13] A. de Jong, M.I. van Poelgeest, J.M. van der Hulst, J.W. Drijfhout, G.J.M.C. J. Fleuren, G. Kenter, et al., Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6, *Cancer Res.* 64 (15) (2004) 5449–5455, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0831>.
- [14] M.R. Barros, T.H.A. de Oliveira, C. de Melo, A. Venuti, A.C. de Freitas, Viral modulation of TLRs and cytokines and the related immunotherapies for HPV-associated cancers, *J. Immunol. Res.* 2018 (2018) 2912671, <https://doi.org/10.1155/2018/2912671>.
- [15] J.A. Westrich, C.J. Warren, D. Pyeon, Evasion of host immune defenses by human papillomavirus, *Virus Res.* 231 (2017) 21–33, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>.
- [16] L.M. Torres, T. Cabrera, A. Concha, M.R. Oliva, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido, HLA class I expression and HPV-16 sequences in premalignant and malignant lesions of the cervix, *Tissue Antigens* 41 (2) (1993) 65–71, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1993.tb01981.x>.
- [17] S.F. Gameiro, A. Zhang, F. Ghasemi, J.W. Barrett, A.C. Nichols, J.S. Mymryk, Analysis of class I major histocompatibility complex gene transcription in human tumors caused by human papillomavirus infection, *Viruses* 9 (9) (2017) 252, <https://doi.org/10.3390/v9090252>.
- [18] Y.S. Cho, J.W. Kang, M. Cho, C.W. Cho, S. Lee, Y.K. Choe, et al., Down modulation of IL-18 expression by human papillomavirus type 16 E6 oncogene via binding to IL-18, *FEBS Lett.* 501 (2–3) (2001) 139–145, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02652-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02652-7).
- [19] R.W. Tindle, Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2 (1) (2002) 59–65, <https://doi.org/10.1038/nrc700>.
- [20] M. Nees, J.M. Geoghegan, T. Hyman, S. Frank, L. Miller, C.D. Woodworth, Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes, *J. Virol.* 75 (9) (2001) 4283–4296, <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4283-4296.2001>.
- [21] K.H. Richards, R. Doble, C.W. Wasson, M. Haider, G.E. Blair, M. Wittmann, et al., Human papillomavirus E7 oncoprotein increases production of the anti-inflammatory interleukin-18 binding protein in keratinocytes, *J. Virol.* 88 (8) (2014) 4173–4179, <https://doi.org/10.1128/JVI.02546-13>.
- [22] K. Torres-Poveda, M. Bahena-Román, C. Madrid-González, A.I. Burguete-García, V. H. Bermúdez-Morales, O. Peralta-Zaragoza, et al., Role of IL-10 and TGF-β1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia, *World J Clin Oncol.* 5 (4) (2014) 753–763, <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i4.753>.

- [23] J. Xue, Y. Wang, C. Chen, X. Zhu, H. Zhu, Y. Hu, Effects of Th17 cells and IL-17 in the progression of cervical carcinogenesis with high-risk human papillomavirus infection, *Cancer Med.* 7 (2) (2018) 297–306, <https://doi.org/10.1002/cam4.1279>.
- [24] E. Schwarz, U.K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, et al., Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells, *Nature* 314 (6006) (1985) 111–114, <https://doi.org/10.1038/314111a0>.
- [25] J.R. Caceres-Cortes, J.A. Alvarado-Moreno, K. Waga, R. Rangel-Corona, A. Monroy-García, L. Rocha-Zavaleta, et al., Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias, *Cancer Res.* 61 (16) (2001) 6281–6289.
- [26] M.L. Mora-García, L.R. Ávila-Ibarra, R. García-Rocha, B. Weiss-Steider, J. Hernández-Montes, C.A. Don-López, et al., Cervical cancer cells suppress effector functions of cytotoxic T cells through the adenosinergic pathway, *Cell. Immunol.* 320 (2017) 46–55, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.09.002>.
- [27] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed., in: C.S. Harbor (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 2001.
- [28] C.L. Halbert, G.W. Demers, D.A. Galloway, The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells, *J. Virol.* 65 (1) (1991) 473–478, <https://doi.org/10.1128/JVI.65.1.473-478.1991>.
- [29] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1) (1987) 156–159, <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- [30] Y. Rochman, R. Spolski, W.J. Leonard, New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (7) (2009) 480–490, <https://doi.org/10.1038/nri2580>.
- [31] T.R. Malek, I. Castro, Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity, *Immunity* 32 (2) (2010) 153–165, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.004>.
- [32] R. Rangel-Corona, T. Corona-Ortega, I. Soto-Cruz, A. López-Labra, T. Pablo-Arcos, C.F. Torres-Guarneros, et al., Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor, *Cytokine* 50 (3) (2010) 273–277, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.013>.
- [33] M. Narisawa-Saito, T. Kiyono, Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins, *Cancer Sci.* 98 (10) (2007) 1505–1511, <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x>.
- [34] J. Durzynska, K. Lesniewicz, E. Poreba, Human papillomaviruses in epigenetic regulations, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 772 (2017) 36–50, <https://doi.org/10.1016/j.mrrrev.2016.09.006>.
- [35] W.K. Songcock, S.M. Kim, J.M. Bodily, The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription, *Virus Res.* 231 (2017) 56–75, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.017>.
- [36] H.C. Reinecker, D.K. Podolsky, Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (18) (1995) 8353–8357, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8353>.
- [37] H.J. Gruss, C. Scott, B.J. Rollins, M.A. Brach, F. Herrmann, Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R alpha- and beta-chain subunits: association of IL-2 binding with secretion of the monocyte chemoattractant protein-1, *J. Immunol.* 157 (2) (1996) 851–857.
- [38] D. Rimoldi, S. Salvi, F. Hartmann, M. Schreyer, S. Blum, L. Zografos, et al., Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells, *Anticancer Res.* 13 (3) (1993) 555–564.
- [39] S. Yasumura, W.C. Lin, E. Weidmann, P. Hebda, T.L. Whiteside, Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2, *Int. J. Cancer* 59 (2) (1994) 225–234, <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590215>.
- [40] D.J. Kuhn, Q.P. Dou, The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer, *Front Biosci.* 10 (2005) 1462–1474, <https://doi.org/10.2741/1631>.
- [41] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (5) (2011) 646–674.
- [42] W. Shah, X. Yan, L. Jing, Y. Zhou, H. Chen, Y. Wang, A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix, *Cell. Mol. Immunol.* 8 (1) (2011) 59–66, <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.56>.
- [43] P. Yu, Y.X. Fu, Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab. Invest.* 86 (3) (2006) 231–245, <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700389>.
- [44] L.G. Radvanyi, C. Bernatchez, M. Zhang, P.S. Fox, P. Miller, J. Chacon, et al., Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients, *Clin. Cancer Res.* 18 (24) (2012) 6758–6770, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1177>.
- [45] L. Trentin, R. Zambello, P. Bulian, A. Cerutti, A. Milani, E. Pirone, et al., Functional role of IL-2 receptors on tumour-infiltrating lymphocytes, *Br. J. Cancer* 69 (6) (1994) 1046–1051, <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.206>.
- [46] R. Rangel, L. Rocha, J.L. Ramirez, M.J. Ibarra, G. Solorza, A. Monroy, et al., Generation of memory CD4+, CD8+, CD45RO+ and CD16- lymphocytes activated with IL-2, INF-γ, and TNF-α with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cells in a mixed leukocyte-tumour cell culture, *Eur. Cytokine Netw.* 6 (3) (1995) 195–202.
- [47] R. Rangel-Corona, T. Corona-Ortega, I. del Río-Ortiz, M.E. Nieves-Ramírez, H. Morán-Bañuelos, O. González-Tenorio, et al., Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice, *J. Drug Target.* 19 (2) (2011) 79–85, <https://doi.org/10.3109/10611861003733920>.

60