

# Expresión génica de ligandos *mica*, *micb* y *ulbp* (1-6) del receptor NKG2D de células natural killer y metaloproteinasas *adam10*, *adam17* y *mmp14* en líneas celulares de cáncer de cervical

## Gene expression of *mica*, *micb* and *ulbp* (1-6) ligands of the NKG2D receptor of natural killer cells and metalloproteinases *adam10*, *adam17* and *mmp14* in cells lines of cervical cancer

*Dabeiba Adriana García\**, *Pilar Pérez\*\**, *Laura García\*\**, *Angel Cid-Arregui\*\*\**, *Fabio Aristizabal\*\**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.79730

### RESUMEN

El CCU es la segunda causa de muerte en mujeres de nuestro país. Dentro de los primeros mecanismos de defensa del hospedero se encuentra la respuesta inmune de las células NK y su función lítica a expensas de su receptor activador NKG2D, el cual posee como ligandos *mica*, *micb* y *ulbp* (1-6), los cuales se expresan en células transformadas y/o infectadas por virus. Uno de los mecanismos de evasión por parte de la célula tumoral es el clivaje de estas proteínas a través de metaloproteinasas como *adam10*, *adam17* y *mmp14*. Se analizó la expresión de estos ligandos y metaloproteinasas mediante PCR tiempo real, en líneas celulares de referencia para cáncer cervical como HeLa (positiva para VPH-18) y C33A (negativa para VPH). Se obtuvieron valores representativos de expresión relativa génica con diferencias significativas así: *mmp14* en línea HeLa ( $p=0.006$ ); y *mica* y *ulbp-3* en la línea C33A ( $p=0.020$  y  $p=0.003$  respectivamente). Por lo tanto, se podría sugerir que la expresión de *mmp14* se encuentra posiblemente involucrados con la presencia de VPH causante del cáncer cervical y la respuesta inmune innata desarrollada.

**Palabras claves:** CCU: Cáncer de Cuello Uterino - NK: Célula Natural killer - NKG2D: Receptor activador de NK - ULBPs: Ligando de célula NK (NK ligand binding protein UL 16) - Metaloproteinasas y desintegrinas: adam-10, adam -17 y mmp14 - VPH: Virus de Papiloma Humano.

### ABSTRACT

Cervical cancer is the second leading cause of death in women in our country. Within the first host defense mechanisms is the immune response of NK cells and their lytic function at the expense of its NKG2D receptor activator which has as ligands *mica*, *micb* and *ulbp* (1-6), which are expressed in transformed cells and / or virally infected. One of the mechanisms of evasion by the tumor cell is the cleavage of these proteins through metalloproteinases as *adam10*, *adam17* and *mmp14*. We analyzed the expression of these ligands and metalloproteinases by real time PCR, in reference to cell lines HeLa cervical cancer (positive for HPV-18) and C33A (negative for HPV). We obtained representing relative gene expression with significant differences from the other lines of study as follows: *mmp14* in HeLa ( $p=0.006$ ); and *mica* and *ulbp-3* in C33A ( $p=0.020$  and  $p=0.003$  respectively). Thus one might suggest that the expression of *mmp14* is possible involved with HPV presence causing high risk of cervical cancer and innate immune response developed.

**Keywords:** CCU: Cervical Cancer - NK: natural killer cell - NKG2D: NK activator receptor - ULBPs: Ligand NK cells (NK ligand binding protein UL 16) - Metalloproteinase and disintegrin: adam -10, adam-17 and mmp14 - HPV: Human Papilloma Virus.

**Recibido:** marzo 18 de 2018

**Aprobado:** mayo 10 de 2019

\* Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología. Pontificia Universidad Javeriana. garciad@javeriana.edu.co. ORCID 0000-0003-0770-9138.

\*\* Departamento de Farmacia e Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. faaristizabal@unal.edu.co.

\*\*\* Translational Immunologie. German Cancer Research (DKFZ). a.cid@dkfz-heidelberg.de.

## INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Cuello Uterino (CCU) es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en la población femenina a nivel mundial, con cerca de 528.000 nuevos casos y 266.000 muertes reportadas en el 2012. En Colombia ocupa el segundo tipo de cancer más frecuente en mujeres con una incidencia de 12.6%, seguido del cáncer de mama y por lo tanto convirtiéndolo en un problema de salud pública (GLOBOCAN, 2012).

El principal factor de riesgo para el desarrollo del CCU es la infección con Virus de Papiloma Humano (VPH), específicamente en aproximadamente el 10% de las mujeres donde el virus persiste en el tejido, lo que parece favorecerse por diversos factores como la inhibición funcional de células natural killer (NK), considerada como la primera línea de defensa inmunológica asociada con la lisis de células infectadas por virus y/o células tumorales. Así, el VPH utiliza esta estrategia para evadir la respuesta inmune innata, la cual a pesar de ser una de las principales barreras iniciales del sistema inmune, ha sido poco estudiada en la patología cervical (Textor *et al.*, 2008).

Las células NK son pertenecientes a la inmunidad innata porque carecen de receptores específicos de antígenos en la superficie celular y participan en el control temprano de células estresadas. Su actividad citotóxica se realiza a través del reconocimiento y movilización de sus gránulos secretorios hacia el sitio de contacto con las células blanco, principalmente gránulos de granzima B y la perforina que junto con una tercera proteína de alto peso molecular denominada serglicina forman un complejo liberado en la zona de contacto entre las dos células y conduce a la formación de una vacuola de pH ácido que induce la activación de las perforinas ejerciendo los efectos desestabilizantes sobre la membrana de la vacuola endocítica y permitiendo que la granzima B acceda al citosol de la célula blanco activando al sistema de caspasas e induciendo la muerte por apoptosis (Lieberman, 2003; Barry & Bleackley, 2002; Vivier *et al.*, 2011).

Con respecto a los receptores que posee la células NK para ejercer su función citotóxica, éstos se han clasificado en activadores, inhibidores, quimiotácticos y de adhesión. Dentro de los receptores activadores se destaca el NKG2D, el cual es un glicoproteína transmembrana de superficie tipo II que se expresa en forma dimerica junto con una molécula coadaptadora DAP10 en células NK, LT CD8+ **TCR**  $\alpha\beta$  y LT CD4+ **TCR**  $\alpha\beta$  y posee la capacidad única de reconocer diversos ligandos sobreexpresados en las células tumorales (NKG2DLs) (Obeidy & Sharland, 2009; Huergo-Zapico *et al.*, 2014).

Los ligandos del receptor NKG2D son moléculas similares a MHC-I que se dividen en dos familias: *mic* (a y b) y *ulbp* (1-6) que junto con la posible ausencia del MHC-I son indicadores de infección y/o transformación del DNA propia de un microambiente tumoral generando señales de activación e inducción de citotoxicidad (Textor *et al.*, 2008).

En estudios con líneas celulares de cáncer cervical, se ha observado una disminución en la expresión de receptores activadores de NK como NKG2D, NKp30, NKp46 entre otros y de algunos ligandos como *cd155*, *mica*, *micb* - *ulbp-2* (Choy & Phipps, 2010). En el 2002, Pende y colaboradores evaluaron la expresión de *mica* en un panel de líneas celulares que incluía: tres carcinomas de colon, dos carcinomas de ovario, un carcinoma hepático y la línea celular HeLa de cáncer cervical; como resultado encontraron que todos los tumores estudiados expresaban el ligando *mica* (Pende *et al.*, 2002).

Recientemente Del Toro y colaboradores en el 2011 (Del Toro *et al.*, 2011) describieron que *mica* y *micb* exhibían un patrón de expresión diferencial entre las líneas celulares infectadas con VPH, SiHa y HeLa, y las líneas celulares no infectadas con VPH, C33-A y HaCaT (línea celular de queratinocitos inmortalizados). Observaron que la expresión celular de *mica* en líneas infectadas era mayor que la expresión de *micb* y bajos niveles de expresión de *mica* en las líneas celulares no infectadas, por lo tanto se pudo evidenciar que por mayor grado de homología que compartan estos ligandos, al parecer hay una regulación diferencial de su expresión en la superficie celular en el cáncer de cuello uterino y proponen que una sobreexpresión sostenida de *mica* puede promover una baja modulación del receptor NKG2D en células NK de pacientes con cáncer de cuello uterino.

De igual forma se describen otros mecanismos de regulación de estos ligandos como el clivaje por proteasas de los ligandos de NKG2D de la superficie celular para evitar el reconocimiento por parte de la célula NK, tales como metaloproteinasas de matriz y desintegrinas; particularmente *mmp14*, *adam 10* y *adam17*, que se han relacionado con el clivaje de *mica* y *micb* de la superficie de células tumorales (Dobrovina *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 2012). Los ligandos liberados se pueden detectar en el suero de pacientes con diferentes tipos de cáncer donde se han encontrado grandes cantidades de *mica* y *micb* solubles comparado con el suero de pacientes sanos (Salih *et al.*, 2002; Boutet *et al.*, 2009).

Por lo anterior nosotros evaluamos por primera vez la expresión génica de todos los ligandos descritos (*mica*,

**Tabla 1.** Secuencias y condiciones de estandarización de primers de NKG2DL - *ulbps 1-6*, *mic-a*, *mic-b*; metaloproteinasas (*adam 17*, *adam 10* y *mmp14*) y gen house keeping de  $\beta$ -*actina*.

Gen	Secuencia primer (5'-3')	Temperatura (°C)	Tamaño del amplímero (pb)
<i>ulbp-1</i>	F: GCAGAGGATCTTGGCAGTTC R: ATGAGAAGGCTCCAGGGACT	62°C	298 pb
<i>ulbp-2</i>	F: CAGAGCAACTGCGTGACATT R: CATGCCCATCAAGAAGTCCT	62°C	299 pb
<i>ulbp-3</i>	F: TGGAACTGGCTGACACTGAG R: GCCTCTTCTCCTGTGCATC	62°C	306 pb
<i>ulbp-4</i>	F: TGGAACTGGCTGACACTGAG R: GCCTCTTCTCCTGTGCATC	62°C	93 pb
<i>ulbp-5</i>	F: CCATGTCCTCAGGCACAGC R: CAGGGAACCATCAAGATATGG	64°C	375 pb
<i>ulbp-6</i>	F: CGCCATCCCAGCTTTGCTTC R: TTTTCATCCACTGGCCTTGA	60°C	165 pb
<i>mic-a</i>	F: GGGAAACGGAAAGGACCTCAG R: GGGGCATTGTCCATTCCTCA	60°C	190 pb
<i>mic-b</i>	F: GATAAGCGTCTGCTGAGCGGG R: AGCCCCATGGCCCCCTACGTC	62°C	120 pb
<i>adam17</i>	F: TTGTGTGGTTTGGCCCTTCT R: CTGCTTTTGACCACAGGTC	60°C	116 pb
<i>adam10</i>	F: CGAACTCTGCCATTTCACTC R: ACTTCCTCTACACCAGTCAT	62°C	140 pb
<i>mmp14</i>	F: CGAACTCTGCCATTTCACTC R: ACTTCCTCTACACCAGTCAT	60°C	124 pb
$\beta$ - <i>actina</i>	F: ATGCCCAGACAGGATGCAGA R: GAGTACTTGGCTCAGGAGGA	60°C	89 pb

*micb* y *ulbp 1-6*) para el receptor activador NKG2D en humano, además de las metaloproteinasas *adam10*, *adam17* y *mmp14* involucradas; en las líneas celulares de referencia para el cáncer cervical como HeLa positiva para el tipo viral VPH 18 y C33A negativa para VPH.

## METODOLOGÍA

Se utilizaron líneas celulares de referencia para cáncer cervical: HeLa (positiva para VPH 18) y C33 A (negativa para VPH), las cuales fueron mantenidas en cultivo de acuerdo a las recomendaciones de la ATCC.

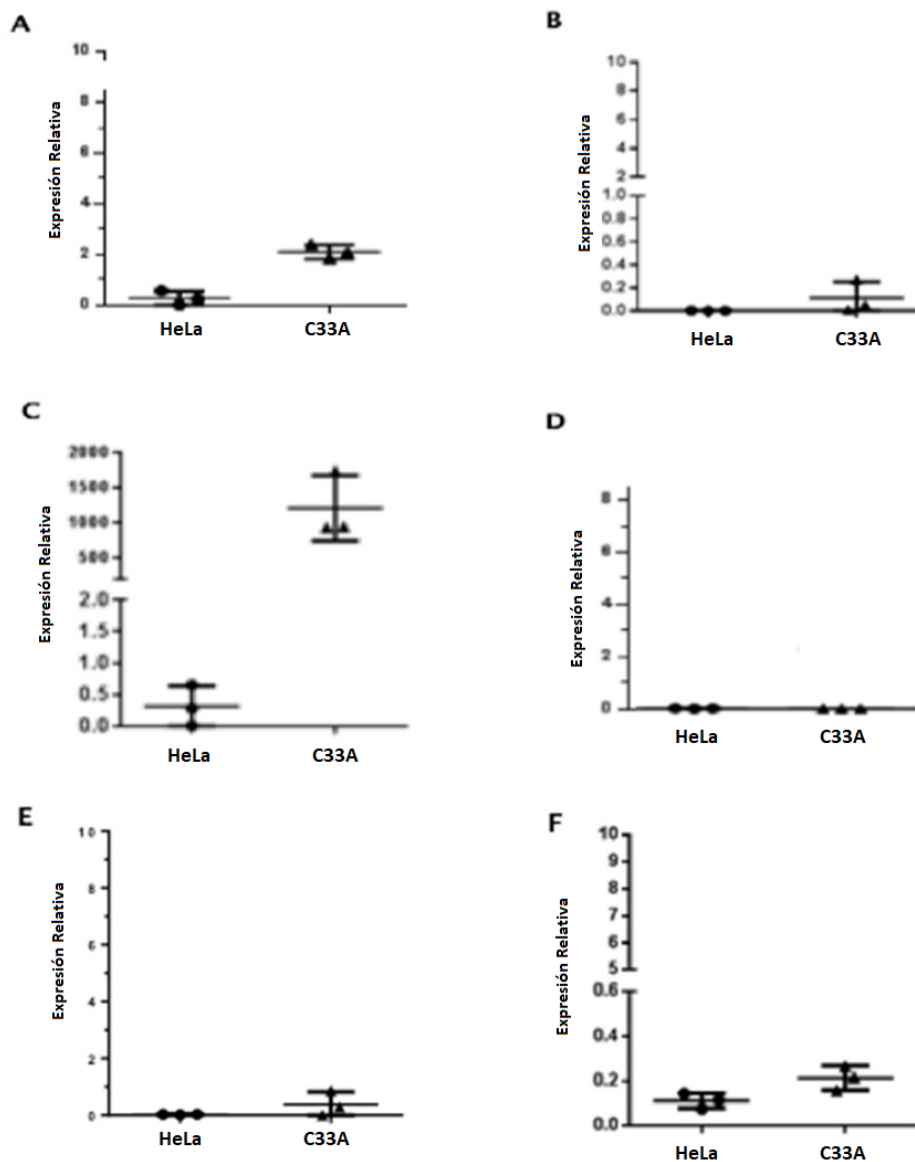
### Extracción de RNA

A partir de las líneas celulares se realizó la extracción del RNA bajo las indicaciones y recomendaciones del fabricante del Kit RNeasy Quiagen®. Una vez obtenido el RNA fue cuantificado por espectrofotometría utilizando NanoDrop®ND-100 y de acuerdo a su calidad fue

tratado bajo las indicaciones y recomendaciones del fabricante del Kit de DNasa I de Invitrogen®.

### Síntesis de cDNA

Posteriormente, se realizó la retrotranscripción de la muestra de RNA para obtener cDNA bajo las indicaciones y recomendaciones del fabricante del Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen), donde se adiciono al RNA previamente tratado con DNasa 1µl de dNTP (10mM), se incubo a 65°C por 5 minutos e inmediatamente se colocó sobre hielo por un minuto. Luego se adiciono 2µl de RT buffer 10X, 4µl cloruro de magnesio (25mM), 2µl de DTT (0,1M), 1µl RNAaseOut (40U/µl) y 1µl de SperScript III RT (200U/µl); se incubo a 50°C por 50 minutos seguido de una temperatura a 85°C por cinco minutos e inmediatamente se colocó en hielo durante un minuto. Finalmente se adiciono 1µl de RNAase H (2U/µl) seguido de una incubación de 20 minutos a 37°C.



**Figura 1.** Expresión del ligandos *ulbp* (1-6) de NKG2D en líneas celulares de CCU: HeLa: Positivo para VPH -18 y C33A: Negativo para VPH. A) *ulbp-1*  $p=0.01$ , B) *ulbp-2*  $p=0.04$ , C) *ulbp-3*  $p=0.03$ , D) *ulbp-4*  $p= 0.81$  E) *ulbp-5*  $p= 0.32$  F) *ulbp-6*  $p=0.14$ . Se considera valores estadísticamente significativos  $p = <0.05$ .

El cDNA se cuantificó espectrofotométricamente por NanoDrop®ND-100 y se realizaron alícuotas de trabajo de 125ng/μl las cuales se almacenaron a -70°C para su uso posterior.

#### **Diseño de primers**

En la tabla 1 se resume las secuencias de los primers para el cual se utilizó el software Primer Blast y Primer 3 IDT y corroborados mediante alineamiento con BLAST para comprobar que los iniciadores diseñados corres-

pondían a los genes de interés, además de las condiciones de estandarización para los ensayos de RT-PCR de cada uno de los genes del estudio.

#### **PCR en tiempo real (RT-PCR)**

Los ensayos de qRT-PCR para las líneas celulares de cáncer de cérvix se realizaron bajo las siguientes condiciones:

En placas de real time del equipo Light Cycler® 480 System, por cada gen se preparó la mix 1X para cada línea celular por triplicado con 0.2 µM de los iniciadores tanto forward como reverse correspondiente, 5.0 µl de solución Master Syber Green, 2 µl de cDNA (250 ng /µl) y se completó con agua desionizada libre de RNAasa hasta un volumen final de 10 µl. En el equipo Light Cycler® 480 System se procesaron las reacciones bajo el programa establecido así: Un ciclo de denaturación a 95°C por 4 minutos; treinta cinco (35) ciclos de amplificación cada uno de 95°C por 10 segundos; la temperatura descrita para cada tipo de gen en la tabla 1 (60°C, 62°C o 64°C) por 20 segundos y 72°C por 1 segundo y finalmente un paso de enfriamiento a 4°C por 10 segundos. Como control negativo fue utilizado agua desionizada libre de RNAasa en las mismas condiciones mencionadas.

Para la optimización de la qRT-PCR se obtuvieron las eficiencias para cada uno de los genes en estudio, realizando curvas estandar utilizando diluciones seriadas de DNA de la línea celular HeLa y aplicando la fórmula  $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ , dicha eficiencia debía estar entre 1.7 – 2.0 siendo indicativo de adecuadas condiciones en la corrida de las reacciones (Yun *et al.*, 2006).

El análisis de la expresión se realizó utilizando el método de cuantificación relativa donde cada muestra fue normalizada con la expresión del gen de referencia β-actina. La expresión relativa de los genes de interés fue calculada y fundamentada en el método  $2^{-\Delta CT}$  teniendo en cuenta las eficiencias obtenidas para cada set de iniciadores como factor de corrección, por lo que el cálculo se realizó basado en la siguiente fórmula:  $(E \text{ actina}) * CP \text{ muestra} / (E \text{ gen de interés}) * CP \text{ muestra}$  (Pfaffl, 2001).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos de tiempo real fue realizado utilizando el software Graph Pad-Prism 6, en el cual se realizaron gráficos de dispersión con media y desviación estándar DS. Para la significancia estadística, se realizó la prueba t-test. Un *p* valor < 0,05 fue considerado como significativo.

### **RESULTADOS**

La expresión relativa de los genes de interés *ulbp* (1-6), *mica*, *micb* y metaloproteinasas (*mmp14*, *adam10* y *adam17*), se realizó a través qRT-PCR por triplicado en las líneas celulares: HeLa (positiva para VPH tipo 18) y C33-A (negativo para VPH). Se obtuvieron valores óptimos de

eficiencia para todos los primers de los genes utilizados incluyendo nuestro gen constitutivo de β-actina.

### **Expresión de los ligandos de NKG2D**

Como se observa en la figura 1, la expresión genica relativa de los ligandos *ulbp-1* y *ulbp-2* en las líneas celulares presento una diferencia significativa con un valor *p* de 0.01 y 0.04 respectivamente, siendo la línea **C33** la que obtuvo un mayor nivel de expresión de estos dos ligandos respecto a HeLa donde los niveles de expresión génica son prácticamente nulos. Para el ligando *ulbp-3* su expresión presento también diferencias significativas con un valor *p* de 0.03 siendo igualmente la línea C-33A la que mayores niveles presentó, mientras que la línea celular HeLa presentó menor expresión de éste ligando. Para el ligando de *ulbp-4*, no se observó expresión en ninguna de líneas celulares evaluadas. La expresión génica de los ligandos *ulbp-5* y *ulbp-6* fue ligeramente mayor en la línea celular C-33A, con respecto a la HeLa, pero éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la figura 2, se observa que la expresión génica de *mica* presenta diferencias estadísticamente significativas con un valor de *p* de 0,02 siendo la línea celular C-33A la de mayor nivel de expresión, en contraste la línea celular HeLa dicha expresión fue nula. En relación al ligando *micb* su expresión fue baja en las dos líneas celulares evaluadas, sin embargo, se observa un leve incremento en la línea celular C-33A.

Finalmente, para las desintegrinas y metaloproteinasas, observamos en la figura 3, la expresión relativa para *adam10* y *adam17* fue similar en las dos líneas celulares evaluadas, sin embargo, la *mmp14*, mostró diferencias estadísticamente significativas con un *p*=0.006, con un incremento en su expresión en la línea celular HeLa positiva para VHP18 y una expresión nula en la línea celular C-33A negativa para VPH.

### **DISCUSIÓN**

La mayoría de *ulbp* no se expresan en tejido normal a diferencia de los ligandos *mica* y *micb* los cuales son expresados en células gastrointestinales por acción de flora bacteriana. Para el caso específico de la patología cervical, el VPH ocasiona la transformación del DNA en la célula blanco induciendo la disminución de la expresión de moléculas MHC-I y la expresión de ligandos *ulbp* y *mic* que a su vez activa el receptor NKG2D de las células NK promoviendo la lisis celular; es así como se ha observado la expresión de todos estos los ligandos mencionados en líneas de cáncer de cérvix tanto

**Tabla 2.** Eficiencias de ULBPs (1 al 6), mica, micb, adam10, Adam 17 y mmp14 utilizando DNA de línea celular HeLa.

Gen	Eficiencia Obtenida
<i>ulbp-1</i>	1.797
<i>ulbp-2</i>	1.989
<i>ulbp-3</i>	2.013
<i>ulbp-4</i>	1.915
<i>ulbp-5</i>	1.769
<i>ulbp-6</i>	1.816
<i>mic-a</i>	1.781
<i>mic-b</i>	1.889
<i>adam17</i>	1.762
<i>adam10</i>	1.891
<i>mmp14</i>	1.848
$\beta$ -actina	2.301

**Eficiencia recomendada: 1.70 – 2.10** (Yun *et al.*, 2006).

positivas (HeLa) y negativas (C33) para VPH pero con patrones totalmente diferentes.

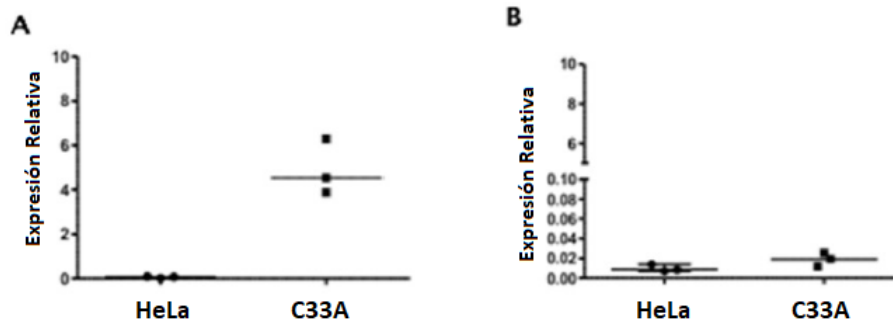
La expresión de *ulbp-1*; *ulbp-2* *ulbp-3* y *mica* presentaron diferencias estadísticamente significativa ( $p=0.01$ ;  $p=0.04$ ;  $p=0.003$ ;  $p=0.02$  respectivamente) entre las dos líneas celulares (HeLa y C33A) pero destacándose su expresión en la línea celular C33A la cual no contiene genoma de VPH, contrario a lo presentado en el estudio realizado por Jiménez y colaboradores en el 2012 (Jiménez *et al.*, 2012) y Textor y colaboradores en el 2008 (Textor *et al.*, 2008) en el que se destaca la expresión genica del ligando *ulbp-2* en SiHa (línea celular asociada con VPH tipo 16) y los reportados por Del Toro y colaboradores en el 2011 (Del Toro *et al.*, 2011) donde reportaban una baja expresión de *mica* en la línea negativa para VPH. En cuanto a *micb* no se observaron diferencias de la expresión del gen en las líneas

celulares empleadas las cuales fueron menores a las reportadas Del Toro y colaboradores (Del Toro *et al.*, 2011), quienes encontraron una mayor expresión en la línea C33A que en HeLa. Sin embargo, estudios recientes de McCarthy y colaboradores en el 2018 (McCarthy *et al.*, 2018), demuestran como en líneas celulares tumorales de cáncer cervical (HeLa), fibrosarcoma (HT1080) y cáncer de seno (MCF7) al ser tratadas con glucosa en distintas concentraciones (2,5 – 25mM) incrementan la expresión de *mica* y *micb*, esto se relaciona con el estudio realizado por Jung y colaboradores en el 2017 (Jung *et al.*, 2017), donde en líneas celulares positivas y negativas para VPH en cáncer de cabeza y cuello, demuestran una regulación diferencial en el metabolismo anaeróbico de la glucosa y la fosforilación oxidativa mitocondrial, estos autores observan que las células positivas para VPH y con privación de glucosa durante 48 horas, sobreviven en un 90% ó mas, mientras que las células negativas para el virus únicamente sobreviven un 40 a 60%, por otra parte, alta producción de lactato y bajo consumo de oxígeno es característico de las células VPH negativas contrario a las VPH positivas. Estos hallazgos pueden explicar como por las diferencias metabólicas entre las líneas celulares positivas y negativas para el virus, pueden influenciar la expresión de *mica* y *micb*, encontrándose en menor proporción en células HeLa que en C33A.

Los ligandos *ulbp-4*, *ulbp-5* y *ulbp-6* no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.92$ ,  $p=0.72$  y  $p=0.64$  respectivamente), contrario al estudio de Eagle y colaboradores en el 2009 (Eagle *et al.*, 2009) donde para la expresión del gen *ulbp-6*, éste se caracteriza por ser restringido para líneas celulares positivas para VPH y derivadas de cáncer de cérvix (SiHa, CaSki, HeLa) al compararlo con 10 tipos diferentes de líneas celulares tumorales y por lo tanto es considerado como un indicador de la respuesta inmune frente al VPH.

Diversos estudios describen el perfil de expresión de los ligandos del receptor NKG2D en otras patologías malignas como el cáncer de seno y cáncer de ovario presenta un comportamiento totalmente diferente como por ejemplo incrementos estadísticamente significativos en la expresión de *mica*, *micb*, *ulbp-4* y *ulbp-2* siendo este último de mal pronóstico para cáncer de ovario (Huego-Zapico *et al.*, 2014; de Krujif *et al.*, 2012).

Es importante aclarar que en la expresión de las proteínas *ulbp* se han descrito diferentes mecanismos que intervienen en su modulación como el clivaje de algunas isoformas solubles de *ulbp2- ulbp-4* que se unen al receptor NKG2D, realizando una alteración en la expre-



**Figura 2.** Expresión del ligandos *mica* y *micb* de NKG2D en líneas celulares de CCU: HeLa: Positivo para VPH -18 y C33A: Negativo para VPH. A) *mica*  $p=0.02$  B) *micb*  $p=0.19$ . Se considera valores estadísticamente significativos  $p = <0.05$ .

sión del receptor NKG2D favoreciendo una disfunción de las NK. Otro mecanismo es el contacto persistente entre células NK y células que expresan NKs el cual modulan la expresión de ligandos como el *ulbp-3* o del receptor NKG2D, como por ejemplo, al realizar cocultivos entre células de cérvix SiHa (VPH 16) o HeLa (VPH 18) con NK se disminuye la actividad citotóxica, contrario a lo ocurrido con línea celular C33A (VPH negativo) donde se incrementa la actividad citotóxica.

De igual forma, se han descrito mecanismos de regulación de estos ligandos que involucran procesos transcripcionales y postranscripcionales, como por ejemplo la capacidad de las oncoproteínas E6 y E7 de VPH-AR de interferir en la unión de ciertas inmunoproteínas como factores de transcripción (IRF1, IRF3) implicados en la respuesta inmune innata, los cuales podrían realizar la retención intracelular de esos ligandos evitando su expresión a la superficie tal como sucede en infecciones con citomegalovirus (CMV) y herpes virus (Jiménez *et al.*, 2012). Por otro lado, algunos procesos de metilación del DNA se correlacionan con la ausencia de transcripción de ligandos del receptor NKG2D, constituyendo un mecanismo de evasión de las células tumorales principalmente en leucemia mieloide aguda (LMA) (Raneros *et al.*, 2015).

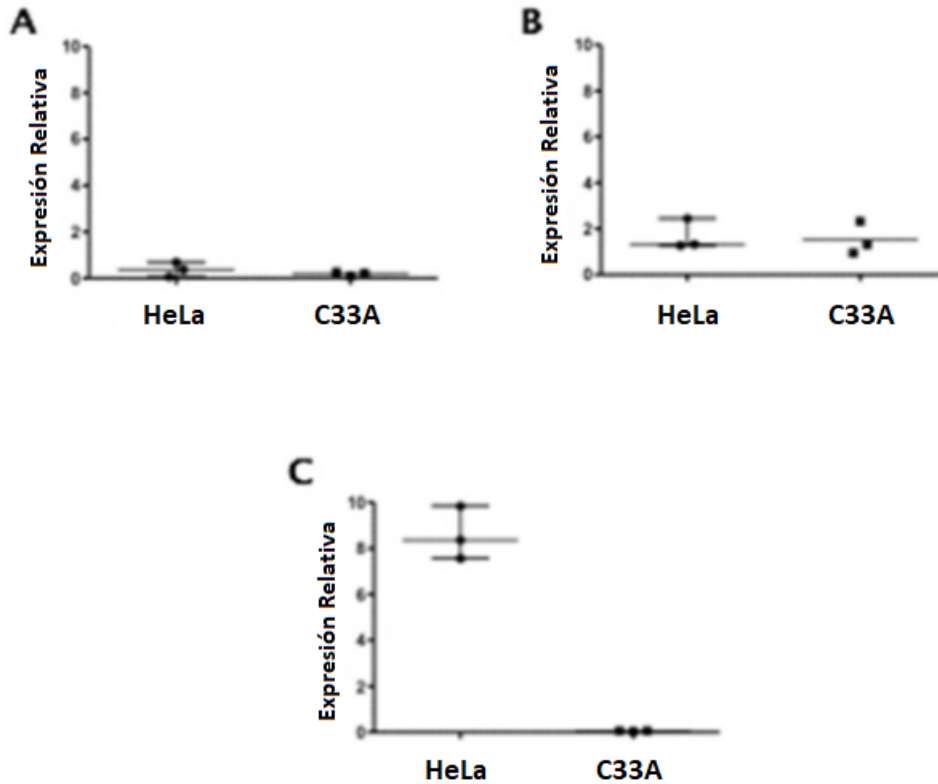
Teniendo en cuenta lo anterior podría sugerirse que la presencia o no del virus (VPH) interviene de forma directa en la expresión de los diferentes ligandos tanto *ulbp* y *mica* y *micb* en líneas celulares de cérvix.

Otra característica descrita para los ligandos de NKG2D, son los polimorfismos presentes principalmente en *mica* y *micb*, para el caso de *mica* se han descrito 68 alelos y para *micb* 25, los cuales se distribuyen de

manera diferente entre las distintas poblaciones como caucásicos, japoneses, amerindios entre otros. Algunos de esos polimorfismos se han asociado a distintas patologías como por ejemplo para artritis reumatoide el polimorfismo MICB\*004, enfermedad celiaca MICA-A5.1 y MICB\*0106, artritis psoriática MICA-A9 y enfermedad de Behcet's MICA\*009 entre otras (Mendoza, 2007). En cuanto a estudios de relación de polimorfismos de *mica* ó *micb* asociados a cáncer cervical, Chen y colaboradores en el 2005, no encontraron ninguna asociación en población de Taiwan (Chen *et al.*, 2005) y más recientemente Chen y colaboradores pero en el año 2013 (Chen *et al.*, 2013), en un estudio de GWAS describe asociación a mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical en personas que presentaran el alelo A5.1 del gen *mica*.

Se ha determinado que uno de los posibles mecanismos del tumor para evadir el sistema inmune es clivar los ligandos como *mica* y *micb* para evitar ser reconocido por el receptor NKG2D; algunas de las proteínas que al parecer están involucradas en este proceso hacen parte de las metaloproteinasas de matriz y desintegrinas, como es el caso de *adam10*, *adam17* y *mmp14*. Además, la unión del NKG2D a los ligandos solubles promueve su internalización y posterior degradación, como consecuencia se obtiene una disminución de la expresión del receptor y por lo tanto una menor actividad citotóxica de las células NK (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2013).

En una línea celular de carcinoma pancreático se encontró que solo la baja regulación de *adam10* y *adam17* inhibía el clivaje de MICA mientras que ADAM17 se identificó como el principal responsable del clivaje de esta proteína en otras líneas celulares co-



**Figura 3** Expresión de las desintegrinas y metaloproteinasas *adam10*, *adam17* y *mmp14* en líneas celulares de CCU: HeLa: Positivo para VPH -18 y C33A: Negativo para VPH. A) *adam10*  $p=0.51$  B) *adam17*  $p=0.85$  C) *mmp14*  $p=0.006$ . Se considera valores estadísticamente significativos  $p < 0.05$ .

mo es el caso de la línea MDA-MB-231 (cáncer de seno). En el clivaje de *micb* tanto *adam10* como *adam17* son igualmente efectivas en la línea PancTu-1 (cáncer de páncreas), mientras que *adam17* fue más efectiva en otras líneas como la de cáncer de próstata PC-3. De lo anterior se podría llegar a concluir que el papel que juegan estas proteínas en el clivaje es mas una cuestión selectiva por parte de la célula tumoral que una especificidad de sustrato (Chitadze *et al.*, 2013; Waldhauer *et al.*, 2008).

Para el caso de *adam17*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas C-33A y HeLa; además se observó una expresión baja en las dos líneas celulares empleadas. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Xu y colaboradores en el 2013, quienes encontraron altos niveles de la proteína en tejidos con CCU en comparación con tejidos adyacentes

no cancerígenos y una alta expresión de ésta se ha asociado con un mal pronóstico en pacientes con CCU (Xu *et al.*, 2013), por lo que podría sugerirse que podría llegar a ser un buen marcador de pronóstico, por lo tanto, era de esperarse que un modelo de CCU en líneas celulares se encontrará una alta expresión de *adam17*.

Según nuestros resultados la expresión del gen *mmp14* muestra diferencias de expresión entre las líneas celulares, siendo mayor expresión en la línea celular HeLa. Sheu y colaboradores en el 2003 (Sheu *et al.*, 2003), encontraron que queratinocitos primarios humanos que expresaban las oncoproteínas virales exhibían una sobreexpresión de *mmp9* asociado, probablemente, a que las proteínas E6 y E7 mediaban la baja regulación de inhibidores de *mmp* como RECK y TIMP-2, sin embargo, las otras metaloproteinasas no presentaron cambios.



## CONCLUSIONES

En los análisis de expresión génica de *ulbps* y *mic-a* en líneas celulares de cáncer de cérvix que fueron estadísticamente significativos, similar al predominio de la expresión de la metaloproteínasa *mmp14* en la línea celular positiva para VPH, por lo que se sugiere una posible estrecha relación entre la patología cervical asociada a la infección por el VPH y la respuesta inmune innata a expensas del receptor NKG2D de las células NK.

## AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por su financiación bajo el proyecto "Influencia del estado de metilación del ADN en cáncer cervicouterino (CCU), asociado o no al virus del papiloma humano (VPH), en la regulación de la expresión de ligandos del receptor NKG2D de células Naturales Aseñinas" código 110151928973.

A Pontificia Universidad Javeriana por la financiación del proyecto "Evaluación de biomarcadores pronósticos en cáncer cervical y carcinomas orofaríngeos de células escamosas asociados a infección por Virus de Papiloma Humano (VPH) en población Colombiana". PUJ ID 5613.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran tener ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

Barry, M., & Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2, 401-409.

Boutet, P., Agüera, S., Atkinson, S., et al. (2009). Cutting Edge: The Metalloproteinase ADAM17/ TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme Regulates Proteolytic Shedding of the MHC Class I-Related Chain B Protein. *J. Immunol.*, 182, 49-53.

Chen, J.R., Lee, Y.J., Chen, T., et al. (2005). MHC class I chain-related gene A (MICA) polymorphism and the different histological types of cervical cancer. *Neoplasma*, 52, 369-73

Chen, D., Juko-Pecirep, I., Hammer, J., et al. (2013). Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 105, 624-33

Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., & Kabelitz, D. (2013). Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scandinavian Journal of immunology*, 78(2), 120-129.

Choy, M.K., & Phipps, M.E. (2010). MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med.*, 16, 97-106.

de Kruijf, E. M., Sajet, A., van Nes, J. G., Putter, H., Smit, V. T., Eagle, R. A., ... & Kuppen, P. J. (2012). NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC cancer*, 12(1), 24.

del Toro-Arreola, S., Arreygue-Garcia, N., Aguilar-Lemarroy, A., Cid-Arregui, A., Jimenez-Perez, M., Haramati, J., ... & Hernandez-Flores, G. (2011). MHC class I-related chain A and B ligands are differentially expressed in human cervical cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 11(1), 15.

Dobrovina, E. S., Dobrovin, M. M., Vider, E., Sisson, R. B., O'Reilly, R. J., Dupont, B., & Vyas, Y. M. (2003). Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *The Journal of Immunology*, 171(12), 6891-6899.

Eagle, R. A., Traherne, J. A., Hair, J. R., Jafferji, I., & Trowsdale, J. (2009). ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *European Journal of Immunology*, 39(11), 3207-3216.

GLOBOCAN 2012: Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)

Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., López-Soto, A., Villa-Álvarez, M., Gonzalez-Rodriguez, A. P., & Gonzalez, S. (2014). Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer. *Frontiers in immunology*, 5, 106.

Jimenez-Perez, M. I., Jave-Suarez, L. F., Ortiz-Lazareno, P. C., Bravo-Cuellar, A., Gonzalez-Ramella, O., Aguilar-Lemarroy, A., ... & del Toro-Arreola, S. (2012). Cervical cancer cell lines expressing NKG2D-ligands are able to down-modulate the

- NKG2D receptor on NKL cells with functional implications. *BMC immunology*, 13(1), 7.
- Jung, Y. S., Najy, A. J., Huang, W., Sethi, S., Snyder, M., Sakr, W., ... & Franceschi, S. (2017). HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer. *Oncotarget*, 8(31), 51530.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.*, 3, 361-370.
- McCarthy, M. T., Moncayo, G., Hiron, T. K., Jakobsen, N. A., Valli, A., Soga, T., ... & O'Callaghan, C. A. (2018). Purine nucleotide metabolism regulates expression of the human immune ligand MICA. *Journal of Biological Chemistry*, 293(11), 3913-3924.
- Mendoza J.F. (2007). Los genes mica y micb<sup>1</sup> su polimorfismo e importancia biológica. *VERTIENTES Rev Esp en Ciencias de la Salud*, 10,3-7.
- Obeidy, P., & Sharland, A.F. (2009). NKG2D and its ligands. *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(12), 2364-7.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C. C., Biasoni, R., Conte, R., ... & Moretta, A. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer research*, 62(21), 6178-6186.
- Pffaf, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, (9),1-6.
- Raneros, A. B., Martin-Palanco, V., Fernandez, A. F., Rodriguez, R. M., Fraga, M. F., Lopez-Larrea, C., & Suarez-Alvarez, B. (2015). Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. *Genes and immunity*, 16(1), 71.
- Salih, H., Rammensee, H., Steinle, A. (2002). Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *J. Immunol.*, 169, 4098-4102.
- Sheu, B. C., Lien, H. C., Ho, H. N., Lin, H. H., Chow, S. N., Huang, S. C., & Hsu, S. M. (2003). Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer research*, 63(19), 6537-6542.
- Textor, S., Dürst, M., Jansen, L., Accardi, R., Tommasino, M., Trunk, M. J., ... & Cerwenka, A. (2008). Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 123(10), 2343-2353.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., ... & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., ... & Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Research*, 68(15), 6368-6376.
- Xu, Q., Ying, M., Chen, G., Lin, A., Xie, Y., Ohara, N., & Zhou, D. (2013). ADAM17 is associated with EMMPRIN and predicts poor prognosis in patients with uterine cervical carcinoma. *Tumor Biology*, 35(8), 7575-7586.
- Yun, J.J., Heisler, L.E., Hwang, I.L., et al. (2006). ADN genómico funciona como un estándar universal externa cuantitativa en tiempo real PCR. *Nucleic Acids Research*. 34(12):e85.