

# INMUNOLocalIZACIÓN DE RIBONUCLEASA “L” EN CÉLULAS DE CÉRVIX UTERINO NORMALES E INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

<sup>1</sup>Benítez-Rodríguez M.T., <sup>1</sup>Lara-Martínez R., <sup>2</sup>Guido-Bayardo R.L., <sup>2</sup>Cervantes-Chávez F.,  
<sup>1</sup>Jiménez-García L.F.

<sup>1</sup>Laboratorio de Microscopía Electrónica, Conjunto Tlahuizcalpan, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. <sup>2</sup>Servicios de Gineco-Obstetricia e Inmunología, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

e-mail: mtbenitez00@hotmail.com; lfjg@hp.fcencias.unam.mx.

**Introducción.** Se ha demostrado en numerosos trabajos clínicos que las Nucleasas (Ribonucleasas y Desoxiribonucleasas) tienen potente efecto antiviral<sup>[1,2]</sup> y tumoricida<sup>[3-5]</sup>. De acuerdo a su forma de acción se clasifican en: a) Nucleasas Dirigidas, cuando actúan específicamente contra el ADN o el ARN viral dentro de la célula; b) Nucleasas Colocalizadas, cuando destruyen ADN y ARN genómico celular y del virus presente dentro de la célula o la progenie viral; c) Nucleasas Citotóxicas, cuando tienen toxicidad selectiva sobre células lesionadas, viejas, infectadas por un virus y transformadas o cancerosas. Este efecto de las nucleasas se ha considerado muy relevante, lo que ha llevado a incluirlas en los métodos terapéuticos, antivirales y antineoplásicos<sup>[6]</sup>. En el Servicio de Gineco-Obstetricia del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE, se están aplicando en pacientes infectadas con el Virus del Papiloma Humano (VPH). El mecanismo de acción de las Nucleasas se conoce parcialmente<sup>[7]</sup> y como la administración es sistémica y local, se requiere información sobre su destino en el interior del organismo para tratar de esclarecer si corresponden a las Nucleasas dirigidas, colocalizadas o citotóxicas.

**Objetivo.** Realizar el seguimiento de la Ribonucleasa L (RNasa L) en células de Cérvix Uterino (CU) de pacientes sin infección e infectadas con el VPH para demostrar su presencia, ubicación, distribución y mecanismo de acción.

**Metodología.** Las muestras se obtuvieron de pacientes voluntarias del Servicio de Gineco-Obstetricia del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE. Se tomaron biopsias de una persona con CU normal (control negativo), de una paciente con CU infectado con VPH sin tratamiento de Nucleasas y de una paciente con CU infectado con VPH con tratamiento de Nucleasas (<sup>MR</sup>RIDASA) durante tres meses y que de acuerdo con los estudios clínicos se mostraba en remisión en ese momento. Las biopsias se procesaron para Microscopía Electrónica convencional y para Inmunolocalización ultraestructural de la RNasa L. Las muestras dirigidas a ultraestructura se incluyeron en resina epóxica y los cortes se contrastaron con la técnica convencional uranilo-plomo. Para la inmunolocalización las muestras se incluyeron en lowicryl (KM4)<sup>[8]</sup> y como anticuerpo primario se utilizó anti-RNasa L (Monoclonal Anti-RNase-L mouse Ig, SIGMA) y como anticuerpo secundario IgG de asno, anti-ratón acoplado con partículas de oro coloidal de 12 nm (12 nm colloidal Gold-affini pure donkey anti-mouse IgG H+L, Jackson I.R.L.I.), posteriormente se realizó contraste con uranilo-plomo.

**Resultados.** Por Microscopía Óptica se observa la coilocitosis en la paciente infectada con el VPH sin tratamiento, mientras que en la paciente con CU normal y la tratada con Nucleasas no se observan alteraciones. A nivel de Microscopía Electrónica se observa que la ultraestructura del CU de la paciente control no presenta alteraciones, mientras que la paciente infectada sin tratamiento presenta desmosomas en gran cantidad, grandes acúmulos de queratina, las células no presentan organelos y en el núcleo y el citoplasma se encuentran numerosas partículas virales; en cuanto a la paciente infectada y con tratamiento de Nucleasas se observa que las células del CU conservan la integridad de sus organelos y mayor cantidad de desmosomas en comparación con la paciente normal pero en menor cantidad en relación con la paciente infectada sin tratamiento, lo mismo se observa con respecto a la queratina; en cuanto a las partículas virales se observa su presencia pero con modificaciones ultraestructurales, ya que carecen del halo que las caracteriza.

Los resultados de la inmunolocalización indican que las células del CU de todas las pacientes contienen RNasa L en sus compartimentos nuclear y citoplasmático, con distribución heterogénea, predominando en el núcleo, en donde hay una mayor proporción en la eucromatina, lo que coincide con la literatura<sup>[9]</sup>. Al comparar la marca entre las células del CU de las distintas pacientes se encontró una cantidad similar en las células normales y en las infectadas, en cambio si hubo una mayor proporción de granos de oro en las células de la paciente que había recibido el tratamiento a base de <sup>MR</sup>RIDASA.

**Discusión y Conclusiones.** La presencia de partículas virales en las células de la paciente tratada con Nucleasas, demuestra que aún en presencia de las enzimas hay supervivencia de los virus, por lo que se puede pensar que, al menos en las concentraciones aplicadas, los virus no fueron destruidos pero sí inactivados ya que hay modificaciones ultraestructurales del virus y no se observa el efecto citopático en el CU. Igualmente se puede decir que no ejercen su efecto de manera dirigida, colocalizada ni citotóxica ya que los virus continúan dentro de las células y las células siguen conservándose. La posible explicación de la remisión de la paciente tratada con Nucleasas podría ser que éstas están ejerciendo su efecto a través de los oligonucleótidos vía interferones, mecanismo que ha sido demostrado en diversos modelos clínicos<sup>[10]</sup>.

#### **Bibliografía:**

- [1] Saxena S.K., Gravell M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Ardelt W., Youle R.J. Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease. *J Biol Chem* 271, 34: 20783 – 20788, 1996.
- [2] Maitra R.K., Silverman R.H. Regulation of human immunodeficiency virus replication by 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *J Virol* 72,2: 1146 – 1152, 1998.
- [3] Lee J.E., R.T. Raines. Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity. *Biochemistry* 42: 11443 – 11450, 2003.
- [4] Makarov A.A., O.N. Ilinskaya. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett* 540: 15 – 20, 2003.

- [5] Matousek J. Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 129: 175 – 191, 2001.
- [6] Rybak S.M., D.L. Newton. Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp Cell Res* 253: 325 – 335, 1999.
- [7] Saxena S.K., R.Sirdeshmukh, W. Ardlet, S.M. Mikulski, K. Shogen, R.J. Youle. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J Biol Chem* 277: 15142 – 15146, 2002.
- [8] Agredano-Moreno, L.T., M.A. González-Jiménez, M. de L. Segura-Valdéz, E. Ubaldo, C.H. Ramos, E. Martínez, L.F. Jiménez-García. Further ultrastructural characterization of the intranuclear ring-shaped bodies of the plant *Lacandonia Schismatica*. *J Struct Biol* 136:1–6, 2001.
- [9] Englebienne P. RNase L in health and disease: what did we learn recently? *J Chronic Fatigue Syn* 11, 2: 97 – 109, 2003.
- [10] Vasandi V.M., J.C. Castelli, J.S. Hott, S. Saxena, S.M. Mikulski, R.J. Youle. Interferon enhances the activity of the anticancer ribonuclease, onconase. *J Interferon Cytokine Res* 19: 447 – 454, 1999.

a) Tema: Biología Celular.

b) Dr. Luis Felipe Jiménez-García (Responsable); Grado Académico: Dr. en Ciencias Biológicas; Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM; Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel 5622-5396, Fax 5622- 4828, [lfjg@hp.fciencias.unam.mx](mailto:lfjg@hp.fciencias.unam.mx). Profr. Titular y Profr. de Asignatura.

María Teresa Benitez Rodríguez; Grado Académico: Dra. en Ciencias Biológicas; Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM; Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel 5622-5396, Fax 5622- 4828, [mtbenitez00@hotmail.com](mailto:mtbenitez00@hotmail.com). Profr. de Asignatura.

Reyna Lara Martínez; Grado Académico: Maestra en Ciencias; Laboratorio de Microscopía Electrónica, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM; Circuito exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México. Tel 5622-5396, Fax 5622- 4828, [rlm@fciencias.unam.mx](mailto:rlm@fciencias.unam.mx), Profr. de Asignatura, Técnico Académico y Estudiante de Doctorado.

R. L. Guido-Bayardo; Grado Académico: Médico Cirujano; Servicios de Gineco-Obstetricia, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE, Av. Félix Cuevas No. 140, Col. Del Valle, México, D. F., C.P. 03100.

F. Cervantes-Chávez; Grado Académico: Médico Cirujano; Servicios de Inmunología, Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE. Jefe de laboratorio. Av. Félix Cuevas No. 140, Col. Del Valle, México, D. F., C.P. 03100. Jefe del Laboratorio de Inmunología.

c) Presentación: Cartel.