



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**IL-2 regula la expresión de RNAm de la proteína
Bid en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y
CALO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Rubí Raquel Massé Acevedo

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Rosalva Rangel Corona

MÉXICO, D.F. 2013





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **MASSÉ ACEVEDO RUBÍ RAQUEL**, con número de cuenta **408062644**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **27** del mes de **agosto** de 2013 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES
- VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
- SECRETARIO BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA
- SUPLENTE DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
- SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ



El título de la tesis que presenta es: **IL-2 REGULA LA EXPRESIÓN DE ARNm DE LA PROTEÍNA BID EN CÉLULAS DE LAS LÍNEAS DE CÁNCER DE CÉRVIX INBL Y CALO.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 3 de junio de 2013.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4 pb, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. Bajo la dirección de la C. a Dra. Rosalva Rangel Corona y el soporte económico de Programa PAPIME de la DGAPA, PE-213312.

DEDICATORIAS

*A mi abuelita **PAULA**: porque aunque ya no estás con nosotros, desde que era niña me impulsaste a soñar siempre más allá de lo que creí lograr. Además por tu amor y comprensión en todo momento de tu existencia, y aunque ya no estás presente, siempre lo estarás en mi corazón y en todos mis logros.*

*A mi **MAMA RUTH**: por tu esfuerzo, consejos y apoyo desde niña, por la confianza y esperanza que algún día depositaste en mí.*

*A **MARCOS** por tu paciencia, por estar a mi lado y ser una buena figura paterna.*

*A mis **HERMANOS: BRENDA, RUTH, EVERARDO**; por nunca dejar de creer en mí, y estar presente siempre en los momentos en que más los eh necesitado y principalmente por ser mis mejores amigos en los años que llevo de vida, agradezco especialmente a **RUTH** mi amiga incondicional por tus buenos regaños, tu lealtad y cariño ante todo.*

*A mis **TIOS: AMADOR y ROLANDO**; por sus consejos, apoyo moral y económico y sobre todo por darme seguridad.*

*A mi pareja **GIOVANI**: especialmente a ti por todo el amor que me has brindado desde que empecé con esta meta, por todo tu apoyo, consejos, por estar conmigo en los momentos buenos y malos, en situaciones difíciles, y por impulsarme a siempre terminar lo que ya eh empezado y sobre todo porque nunca has dejado de creer en mí y por consentirme tanto.*

*A mi amiga **ADRIANA AGUILAR** gracias por creer en mí y por tantos momentos alegres y tristes que hemos pasado juntas y sobre todo porque siempre dijiste que lo lograría.*

AGRADECIMIENTOS

*A mi director de tesis **C. a Dra. Rosalva Rangel Corona** por su confianza para pertenecer a su grupo de trabajo, por su paciencia, sus buenos consejos, y sobre todo por el conocimiento que me brindo en mi estancia en el laboratorio.*

*A mis AMIGOS incondicionales: **RICARDO, JUAN Y MIGUEL** por su amistad, apoyo y sobre todo por tantas alegrías, que entre risas hicieron de mi estancia en la carrera y en la facultad aún más agradable.*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio: **ITZEL, MIGUEL, REYNA, LEO, LUZ, TANIA, CUPA, CHEN, DANIEL, DANY, EDITH, NOEMI, YETZI, CARLOS, EL PROFE, ALFREDO, MARIANA, ARTURO VALLE, ARTURITO, SALVADOR**: porque gracias a ustedes mi estancia en laboratorio fue más amena, por compartir conmigo momentos de alegría, diversión, y por tantos vivencias juntos que recordare el resto de mi vida. Y sobre todo por el conocimiento y su ayuda en el laboratorio.*

*Quiero agradecer especialmente a la **Biol. ITZEL DEL RIO** y al **Dr. ARTURO VALLE** por darme su amistad, parte de sus conocimientos y su cariño a lo largo de estos últimos años de la carrera.*

*Al jurado **M. en C. Rosalva Rangel Corona, M. en C. Carlos Bautista Reyes, Dra. Maria de Lourdes Mora García, a la Biol. Reynalda Roldán Pérez** y al **Biol. Carlos Martínez Montoya** por su tiempo y sus aportaciones a mi trabajo muchas gracias por acompañarme en un día tan importante.*

*Al técnico de laboratorio por su dedicación y compromiso con nosotros: **Don José***

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	6
RESUMEN	7
MARCO TEÓRICO	9
Muerte celular	9
Necrosis.....	9
Apoptosis	10
Vías de activación de la apoptosis	12
Vía extrínseca o de receptores de muerte.....	12
Vía intrínseca o mitocondrial	15
Proteínas de la familia Bcl-2	17
Intersección entre la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.....	18
Miembro de la familia Bcl-2 con dominio de homología única BH-3: Bid	19
El cáncer	21
Cáncer de Cérvix.....	22
Inmunoterapia contra el Cáncer de Cérvix	25
Citocinas.....	26
Interleucina 2 (IL-2)	27
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MÉTODO	31
Material biológico.....	31
Cultivo de células tumorales INBL y CALO	31
Cultivo de células tumorales en presencia de IL-2.....	31
Extracción de RNAm	32
Cuantificación de RNAm	32
Retrotranscripción (RT)	34
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	35
Electroforesis de los productos de PCR.....	37
RESULTADOS	39
i. Integridad del RNA en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO	40
• Células no sincronizadas.....	40

• Células sincronizadas.....	41
ii. Expresión de β - actina en células de las líneas INBL y CALO.....	42
• Células no sincronizadas.....	42
• Células sincronizadas.....	44
➤ Comparación de la expresión de β -actina entre células de las líneas CALO e INBL cultivadas en ausencia de IL-2.....	45
➤ Comparación de la expresión de β -actina entre células de las líneas CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2	46
iii. Expresión del RNAm de la proteína Bid en células de las líneas INBL y CALO.....	47
• Células no sincronizadas.....	47
• Células sincronizadas.....	48
➤ Comparación de la expresión de bid entre células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix cultivadas en presencia y ausencia de IL-2	50
➤ Comparación de la expresión del mensajero para la proteína Bid entre células de las líneas de Cáncer de Cérvix cultivadas en presencia de IL-2	52
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
CONCLUSIONES	58
PRESPPECTIVAS.....	59
BIBLIOGRAFIA	60
Anexo I. Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR	66
a. Retrotranscripción.....	66
b. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	67
Anexo II. Reactivos y soluciones utilizados	68
Anexo III. Preparación de reactivos y soluciones	69



LISTA DE ABREVIATURAS

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

ANT: Adenine Nucleotide Translocator.

Apaf- 1: Apoptotic protease activating factor-1.

ATM: Gen mutado en Ataxia-telangiectasia Mutated.

ATR: ATM- and Rad3- Related.

Bad: Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, asociado a Bcl-XL /Bcl-2.

Bak y Bax: Miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.

Bcl-2: (B-Cell lymphoma 2) Miembro de la familia Bcl-2, identificada como producto del proto-oncogen bcl-2.

Bcl-XL: Miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1.

BH: (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica.

BH₃: Dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.

BH₄: Dominio anti-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bid: Dominio de muerte para la interacción BH₃, del inglés BH-3 (Interacting domain Death).

Bik: Del inglés Bcl-2 interacting killer.

Bim: Miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl2 comparte la secuencia de homología sólo en el dominio BH₃.

Ca⁺²: Calcio.



CAD: DNAsas activables por caspasas.

CASPASAS: Cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticas que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a aspartato.

c-DNA: DNA complementario.

cFLIP: FADD-like ICE-inhibitory protein.

DD: Death Domain.

DEDs: Death Effector Domain.

DISC: Death-Inducing Signaling Complex.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

FADD: Fas Associated Death Domain.

Fas: APO1/CD95 (Apoptosis antigen-1).

FasL: Fas Ligand.

FNT β : Factor de necrosis tumoral β .

IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins.

I-CAD: Proteína inhibitoria de CAD.

IL-2: Interleucina 2.

IL-2R α : Receptor α de Interleucina -2.

IL-2R β : Receptor β de Interleucina -2.

IL-2R γ : Receptor γ de Interleucina -2.

INF γ : Interferón gamma.

JAK/STAT: Janus tyrosine kinases- Signal Transducers and Activators of Transcription.



kDa: kilo Dalton.

NF- κ B: Nuclear Factor κ B.

NK: Natural Killer.

Omi/HtrA2: Del inglés high temperatura required protein.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PTPM: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAm: RNA mensajero.

RNAr: RNA ribosomal.

RT: Retrotranscripción.

Smac/ DIABLO: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases / Direct IAP-Binding protein with low pI.

tBid: Bid truncado.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TNFR1: TNF receptor 1.

TRADD: TNF receptor associating protein with DD.

TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand.

TRAILR1: TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1.

VDAC: Voltage Dependent Anion Channel.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama comparativo entre las características morfológicas de muerte por necrosis (izquierda) y apoptosis (derecha).....	11
Figura 2: Vía extrínseca de la apoptosis.....	12
Figura 3: Vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis	17
Figura 4: La familia de proteínas Bcl-2	18
Figura 5: Estadios de la etapa invasiva del Cáncer de Cérvix	22
Figura 6.- Integridad del RNAm en células no sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	40
Figura 7.- Integridad del RNAm en células sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	41
Figura 8.- Expresión del RNAm para β -actina en células no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	43
Figura 9.- Expresión del RNAm para β -actina en células no sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	43
Figura 10.- Expresión del RNAm para β -actina en células sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	44
Figura 11.- Expresión del RNAm para β -actina en células sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	44
Figura 12.- Expresión de β -actina en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en ausencia de IL-2	45
Figura 13.- Expresión de β -actina en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en presencia de IL-2.....	46



Figura 14.- Expresión del RNAm para Bid en células no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	47
Figura 15.- Expresión del RNAm para Bid en células no sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	48
Figura 16.- Expresión del RNAm para Bid en células sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2.....	49
Figura 17.- Expresión del RNAm para Bid en células sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2	49
Figura 18.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de la línea INBL en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2	50
Figura 19.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de la línea CALO en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2.....	51
Figura 20.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas INBL y CALO en presencia de 100 UI/mL de IL-2	52
Figura 21.- Modelo hipotético propuesto de la regulación de apoptosis por IL-2	53



LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Características de las líneas celulares de Cáncer de Cérnix (CALO e INBL)	37
Tabla 2.- Reactivos empleados en la RT.....	40
Tabla 3.- Reactivos empleados en la PCR.....	41
Tabla 4.- Secuencias de los primers	42
Tabla 5.- Condiciones para RT	72
Tabla 6. Condiciones para cada reacción en la técnica PCR	73



RESUMEN

La apoptosis o muerte celular programada tiene como objetivo eliminar células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas, esto implica una programación genética de la célula, que conlleva en su interior a una cascada de cambios morfológicos y bioquímicos dependientes de energía, los cuales la conducen a su muerte y eliminación.

En las dos últimas décadas la incidencia del cáncer se ha incrementado dramáticamente a nivel mundial, siendo el Cáncer de Cérvix el segundo cáncer más frecuente en las mujeres en países en desarrollo y la séptima en los países desarrollados, y afectando a mujeres de todas las edades.

En la actualidad la inmunoterapia representa una alternativa terapéutica contra el cáncer; recientemente el uso de citocinas se ha convertido en un blanco terapéutico contra varias patologías incluyendo el Cáncer de Cérvix, ya que son sintetizadas por casi todas las células y participan en la homeostasis del organismo.

En nuestro grupo de trabajo, en el Laboratorio de Oncología Celular se evalúa el efecto de IL-2 como una posible alternativa terapéutica contra el Cáncer de Cérvix. Diversos trabajos experimentales han demostrado que 100 UI/mL de IL-2 administrados *in vitro* en cultivos de células de las líneas INBL y CALO inducen muerte por apoptosis. También hemos confirmado que IL-2 regula la expresión del mensajero para varias moléculas implicadas en el proceso apoptótico como caspasa 8. Por esta razón el objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del mensajero de la proteína pro-apoptótica Bid en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.

Los productos de amplificación obtenidos por la técnica de RT-PCR demuestran que 100UI/mL de IL-2 regula la expresión del mensajero para la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO. Sin embargo existe una regulación diferencial de la expresión del RNAm para Bid en células no sincronizadas de las líneas celulares de Cáncer de Cérvix. Siendo más susceptible a IL-2



la línea CALO (estadio IIB) ya que el mensajero de Bid se detectó a las 2 horas de cultivo, mientras que en la línea INBL (estadio IV) responde a la acción de IL-2 hasta las 72 horas. Lo cual nos hablaría de una resistencia a la inducción de apoptosis en células tumorales de estadio avanzado.

Con esto podemos concluir que 100 UI/mL de IL-2 inducen muerte celular programada en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO, por medio de la formación de un puente de unión entre la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, dado por la proteína pro-apoptótica Bid y esta regulación es directamente proporcional al estadio de la línea celular.

Por esta razón se propone a IL-2 como una alternativa terapéutica para el tratamiento de pacientes con Cáncer de Cérvix, al inducir muerte por apoptosis de tumores malignos sin importar el estadio clínico.

MARCO TEÓRICO

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Este número es resultado de dos procesos: La multiplicación y la muerte celular la cual consiste en la eliminación de un número igual de células (Dubin, 2000).

Muerte celular

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes, según criterios clásicos la muerte celular se puede dividir en dos tipos; una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis; y la muerte no regulada también llamada necrosis (Degterev, 2008).

Necrosis

La muerte celular se puede producir por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego *nekrós* "muerte") es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo (Lizarbe, 2007). Es un proceso pasivo, que no requiere de la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido; Es un proceso que presenta cambios característicos, tales como pérdida de la permeabilidad de la membrana celular al comienzo, para culminar en la lisis celular, la cual causa inflamación del medio adyacente debido a la liberación del contenido citosólico al medio extracelular (Malet, 2005).

Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deteriora las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la ruptura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra (Figura 1a).

Apoptosis

El cuerpo humano adulto elimina de forma natural alrededor de 1×10^{11} células diariamente, fundamentalmente a través del proceso denominado muerte celular programada o apoptosis (Malet, 2005).

La apoptosis (Kerr, 1972) es el término más usado como referente de muerte celular programada, proviene del griego y significa "La caída otoñal de hojas y pétalos" (Homero, 1972). La muerte celular programada participa en diversos procesos cruciales como el desarrollo normal del embrión y el posterior mantenimiento de la homeóstasis de los diferentes tejidos (García, 2007). La apoptosis corresponde al punto final de una cascada de eventos moleculares dependientes de energía iniciados por estímulos extra y/o intracelulares, los cuales juegan un papel muy importante en la mantención de los tejidos y en el desarrollo embrionario, manteniendo así un equilibrio entre el ritmo de proliferación y muerte celular de modo que el número de células se mantenga constante, si se rompe este equilibrio se llega a una situación crítica, ya sea por aumento de células o por disminución de ellas (Cotran, 1999).

La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una cascada dependiente de energía, de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación. Su misión es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas en células cancerosas. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye la condensación de la cromatina, condensación citoplasmática y nuclear, la rotura endolítica del DNA en fragmentos oligonucleosómicos, la ruptura específica de proteínas celulares y la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos manteniendo las membranas celulares intactas que finalmente serán fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas (Figura 1b).

La apoptosis se da a través de una secuencia bien determinada de señalización, siendo un mecanismo común en todas las células del organismo. En primer lugar presenta una fase

de iniciación, mediada por una vía mitocondrial (vía intrínseca) o por una vía activada a través de receptores de muerte (vía extrínseca). Posteriormente, ambas vías convergen en una segunda fase de ejecución caracterizada por la activación de las caspasas y que es la última responsable de las características morfológicas de la muerte apoptótica (Krantic, 2005).

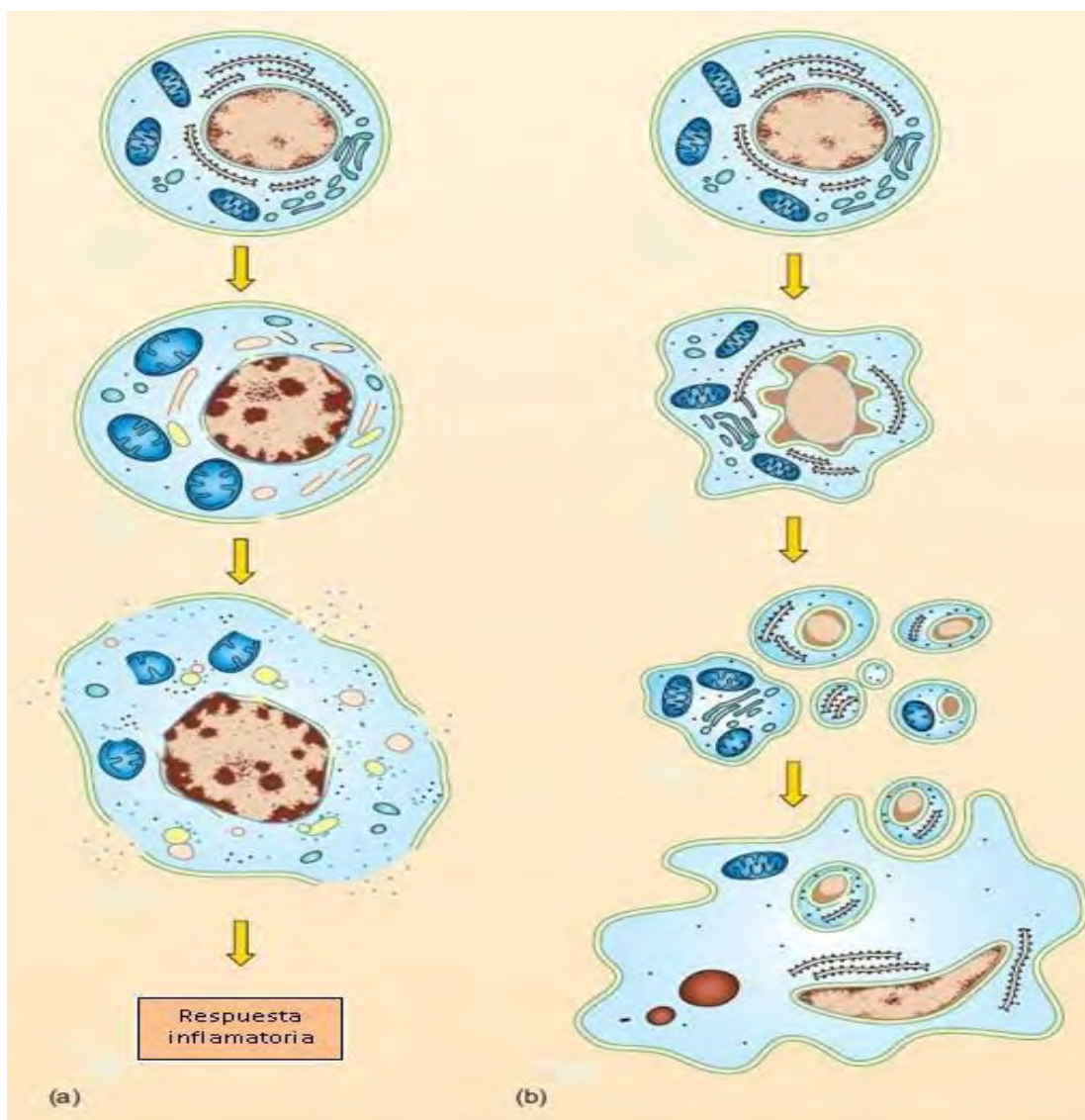


Figura 1. Diagrama comparativo entre las características morfológicas de muerte por necrosis (izquierda) y apoptosis (derecha). (a) Se pueden observar eventos característicos de la necrosis; como condensación de la cromatina irregular, hinchazón de las mitocondrias y ruptura de las membranas y ribosomas, liberando así su contenido y dando una respuesta inflamatoria. **(b)** En contraste en una célula apoptótica hay condensación del núcleo y encogimiento celular, el núcleo y el citoplasma forman cuerpos apoptóticos que posteriormente son fagocitados por células del sistema inmune. **Tomado de Lodish, 2006.**

Vías de activación de la apoptosis

El mecanismo de la apoptosis descansa en la activación de una cascada de enzimas cistein proteasas perteneciente a la familia de las CASPASAS, las cuales desmantelan la célula en forma rápida, controlada y silenciosa (sin causar daños en el entorno que den signos de alarma e induzcan un proceso inflamatorio). El nombre caspasa deriva de su actividad enzimática, la "C" representa al aminoácido cisteína y "ASPASA" se refiere a la acción catalítica de hidrólisis que induce la cisteína sobre el aminoácido ácido aspártico o sus enlaces produciendo la ruptura de la proteína o polipéptido (Salvesen, 2002).

Las caspasas se sintetizan como pro-enzimas o procaspasas, las cuales una vez activadas (hidrólisis del polipéptido inactivador por caspasas o auto catalíticamente) actúan sobre otra caspasa en una reacción secuencial en cadena. Muchas de estas procaspasas presentan un dominio C - terminal hidrofóbico que le permite anclarse en diferentes membranas ya sea citoplasmáticas, mitocondriales, retículo endoplásmico y nuclear donde ejercen su acción de desmantelamiento celular. Se conocen en la actualidad 14 caspasas, de ellas 6 se relacionan con procesos inflamatorios y las restantes con apoptosis, estas últimas se dividen a su vez en caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9 y 12) y caspasas ejecutoras (caspasas 2, 3 y 6) (Thornberry, 1998). Tanto las caspasas iniciadoras como las efectoras participan de forma simultánea en cada vía de la apoptosis, tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca.

Vía extrínseca o de receptores de muerte

Una primera ruta de señalización del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana celular a través de lo que se conoce como vía extrínseca o de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar, estos receptores también participan en el control de otros procesos como la respuesta inmune e inflamatoria, la homeóstasis ósea, el desarrollo y diferenciación de estructuras



epiteliales además de la regulación de la supervivencia y la muerte celular o la diferenciación (Plati, 2008).

En la vía extrínseca la señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos que son citoquinas pro-apoptóticas y pro-inflamatorias tales como FasL (Fas Ligand), TNF- α y TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1) a sus respectivos receptores de muerte como son Fas/ APO1/CD95 (Apoptosis antigen-1), TNFR1 (TNF receptor 1) y TRAILR1 (TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1). Aunque a diferencia de Fas y TRAIL, TNF no induce muerte celular espontánea, ya que puede activar al NF- $\kappa\beta$ (Nuclear Factor $\kappa\beta$) y promover la supervivencia debido a que NF- $\kappa\beta$ promueve la expresión de factores anti-apoptótico como IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) y cFLIP (FADD-like ICE-inhibitory protein) debido a esto el efecto citotóxico de TNF solo se manifiesta cuando está bloqueada la activación de NF- $\kappa\beta$ (Danial, 2004).

La unión del ligando al receptor de muerte provoca la homotrimerización del receptor y de este modo, el receptor es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte DD (Death Domain) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína FADD (Fas Associated Death Domain); para los receptores Fas y TRAILR1 o bien TRADD (TNF receptor associating protein with DD) en el caso del receptor TNFR1. Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DEDs (Death Effector Domain) capaces de interaccionar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas iniciadoras provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte llamado DISC (Death-Inducing Signaling Complex) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10 (Abe, 2002). La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte (Jin, 2005).

La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez puede activar a una vía alternativa por medio de la proteína Bid o bien activar a la

caspasa ejecutora, como lo es caspasa-3 que inicia la acción proteolítica fragmentando estructuras citoplasmáticas como citoesqueleto, organelos celulares y proteínas, en el núcleo fragmenta proteínas que participan en la transcripción y reparación del DNA y activa endonucleasas que segmentan el DNA en fragmentos regulares, consistentes en multímeros de 180 – 200 pares de nucleótidos (Figura 2).

Por otro lado, a través de la vía de señalización de los receptores de muerte, la activación de las caspasas iniciadoras puede ser regulada por la proteína cFLIP. Ésta contiene el dominio DED, lo que le permite unirse al prodominio de la procaspasa-8 bloqueando la interacción de dicha caspasa con los complejos receptor-proteína adaptadora e interfiriendo en el proceso apoptótico (Figura 2).

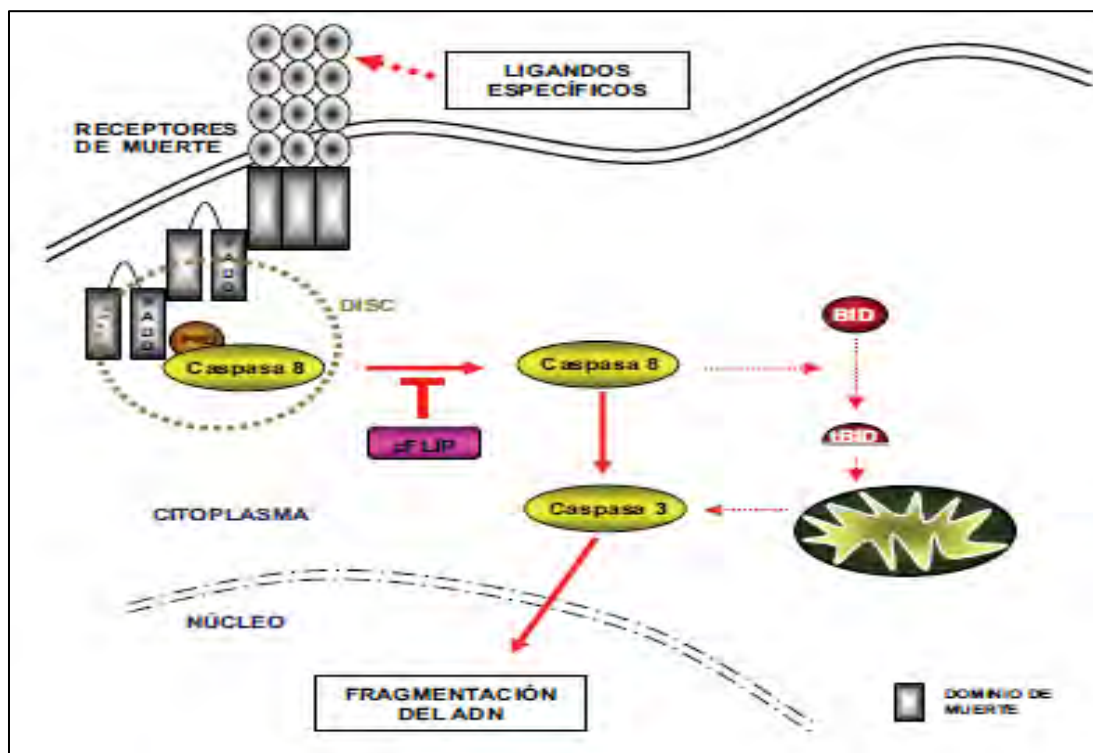


Figura 2. Vía extrínseca de la apoptosis. La señalización inicia cuando ligandos específicos se unen a receptores de muerte presentes en la membrana celular, al unirse el ligando al receptor sufre una homotrimerización con lo cual es capaz de reclutar proteínas adaptadoras como FADD hacia la membrana celular, posteriormente reclutan a caspasa iniciadoras como caspasa 8 activándola y formando un complejo llamado DISC que activa a caspasas ejecutoras como caspasa 3 que desencadena características morfológicas de la apoptosis culminando con la fragmentación del DNA en 180 a 200 pb, todo este proceso puede ser inhibido por la proteína cFLIP, que inhibe la activación de la caspasa 8. La caspasa 8 hidroliza a BID activando la vía intrínseca de la apoptosis. Tomado de Cascales, 2003.



Vía intrínseca o mitocondrial

Una gran parte de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones, agentes oxidantes, etc.) utilizan esta segunda ruta de señalización que se conoce como la vía mitocondrial o intrínseca, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. La función clave de los miembros de la familia de Bcl-2 es regular la liberación de factores pro-apoptóticos, en particular el citocromo C, que además de su implicación en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes requeridos para la activación de la caspasa 9 en el citosol (Díaz, 2006).

La vía mitocondrial se ejecuta en respuesta a agresiones externas y a daño en el DNA, cuando se ejecuta por daño en el ADN o estrés celular se activa el gen supresor de tumores p53 esto depende de las señales externas o internas que lleguen a la mitocondria (Orrenius, 2007).

P53 puede interactuar directamente con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L que se encuentran en la superficie de mitocondria, liberando así moléculas pro-apoptóticas como Bak y Bax que se encuentran unidas a las anti-apoptóticas, estas moléculas pro-apoptóticas inducen cambios mitocondriales (Bras, 2005). Se ha demostrado que Bax una vez liberado se asocia con el complejo de poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PTPM), que está formado por la ciclofilina D, el ANT (Adenine Nucleotide Translocator) que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y regula el paso de metabolitos y el VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) que está en la membrana externa mitocondrial la cual es permeable al paso de iones y de metabolitos debido a la presencia de la proteína porina (Gogvadze, 2006).

El poro PTPM mantiene la homeóstasis de la matriz mitocondrial y participa en la regulación del Ca²⁺, el pH, el potencial de la membrana, el volumen mitocondrial y funciona como un canal aniónico. La proteína pro-apoptótica Bax puede inducir la apertura del poro al formar un complejo con ANT, la apertura del poro trae consigo un descenso en el potencial de membrana y la salida de factores apoptóticos entre los que se



incluyen Citocromo C, Smac/DIABLO (Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) y DIABLO (Direct IAP-Binding protein with low pI)) que bloquea a las IAPs promoviendo así el curso de la apoptosis (Anguiano, 2007), además de moléculas como Omi/Htra 2 y AIF (Apoptosis Inducing Factor) que es una proteína oxidoreductasa mitocondrial que estimula la apoptosis a nivel nuclear independientemente de las caspasas (Torneró, 2002).

La liberación del citocromo C del espacio intermembranal de la mitocondria al citosol es un evento crítico ya que éste interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) y procaspasa 9 para la formación del apoptosoma (Figura 3). El cual es un megacomplejo heptamérico que sufre un cambio conformacional para ejecutar el programa apoptótico con la activación de la procaspasa 9 (Riedl, 2007). La caspasa 9 a su vez, rompe el predominio de caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, activándolas. En el caso de la caspasa 3 se ancla a un dímero llamado Factor de Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico y finalmente comienza una inminente muerte celular con la degradación de proteínas, daño en la membrana y fragmentación del DNA (Janeway, 2000).

El proceso global requiere de energía y que la maquinaria de la célula no esté muy dañada; si el daño alcanza ciertos niveles, la célula que ha iniciado las primeras fases de la apoptosis puede continuar su muerte vía necrosis.

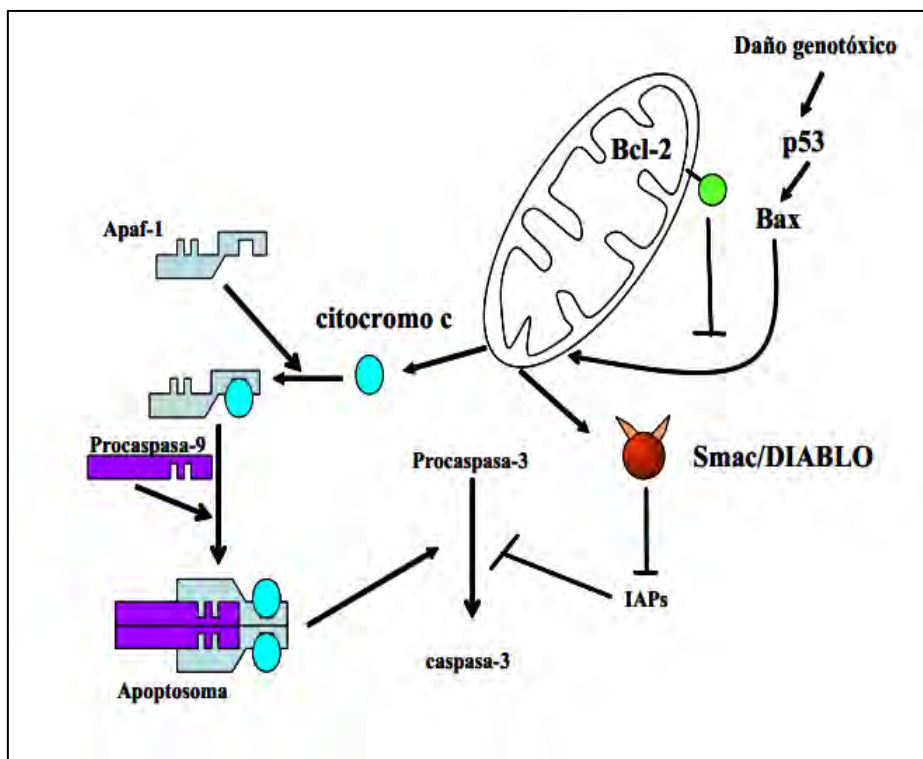


Figura 3. Vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. En la figura se representa esquemáticamente las moléculas implicadas en la regulación de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. Tomado de Jimenez, 2003

Proteínas de la familia Bcl-2.

La familia de Bcl-2 consta de 19 miembros que se han clasificado en tres grupos basándose en similitudes estructurales y funcionales. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados dominios de homología Bcl-2 (Bcl-2 homology domains, BH): BH1-BH4. La familia Bcl-2 está compuesta de tres subfamilias: las proteínas anti-apoptóticas, que incluyen a Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 y Bcl-w, que conservan los cuatro dominios de homología BH (BH1-BH4) y poseen una cola hidrofóbica en el extremo C-terminal que localiza la proteína en la membrana externa de la mitocondria. La segunda subfamilia incluye a las proteínas pro-apoptóticas que incluyen a las proteínas Bax y Bak que carecen del dominio BH-4 (Figura 4).

Estudios de estructura y función sugieren que la actividad anti y pro-apoptótica está determinada por una región relativamente larga que incluye dos hélices α que participan

en la inserción a la membrana. La tercer familia corresponde a las proteínas proapoptóticas con dominio "solo-BH3" que como su nombre lo indica solo presentan el dominio BH3 e incluye a las proteínas Bid, Bim, Bad, Bik (Cory, 2002).

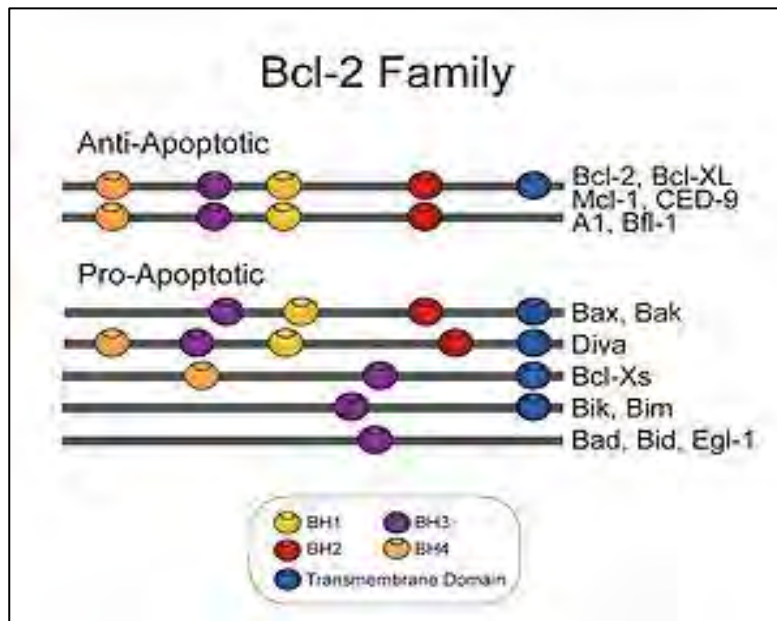


Figura 4. La familia de proteínas Bcl-2. Los miembros de la familia Bcl-2 están compuestos por 4 Dominios de homología BH₁,BH₂,BH₃,BH₄, algunos miembros de esta familia tienen un dominio transmembranal con una región hidrofóbica C-terminal que permite su localización en membranas intracelulares. Tomado de López, 2002.

Intersección entre la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Los estímulos de muerte por apoptosis pueden ser de diferente origen, aunque todos ellos convergen de algún modo en la mitocondria, utilizando para ello diferentes vías. Dentro de la activación de las vías apoptóticas existen dos mecanismos muy importantes, que dependen del tipo celular (Thorburn, 2004). Es por eso que algunos autores diferencian dos tipos de células (Schmitz, 2000): las Tipo I, son células en las que la expresión de caspasa 8 es abundante y podrían activar directamente a caspasa 3, aunque también a caspasa 6 y 7 a través de la cascada de las caspasas. Lo que llevaría a la condensación de la cromatina y a la fragmentación del DNA, entre otras características morfológicas de la apoptosis. En este tipo de inducción no está implicada la mitocondria.

En el caso de las células Tipo II; no hay una abundante expresión de caspasa 8 y está por lo tanto no puede activar eficientemente a caspasa 3, ni otras caspasas que se encuentran corriente debajo de la vía extrínseca. En estas células la activación de caspasa 8 provoca la activación proteolítica de un miembro de la familia Bcl-2, como Bid (Kaufmann, 2012) esta activación, provoca la translocación de Bid a la mitocondria(Figura 2), donde va interactuar con moléculas pro-apoptóticas como Bax y Bak que se encuentran como componentes de la membrana mitocondrial, inhibidas por miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, es así como Bid funciona como un puente de unión entre las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Yin, 2006).

Miembro de la familia Bcl-2 con dominio de homología única BH-3: Bid

Bid, es una molécula fundamental para la regulación de la tumorigénesis por sus múltiples funciones en la activación de la apoptosis, la supervivencia y proliferación celular (Song, 2010).

En general, la longitud completa de Bid es muy estable y es una proteína de larga vida, puede tener una vida media de alrededor de 1,5 horas, la activación de Bid es provocada por caspasa-8 que proteoliza a Bid convirtiéndolo en Bid truncado (tBid) (Breitschopf, 2000). La degradación de tBid está mediada por el sistema de ubiquitinación proteasomal y puede ser inhibida por los inhibidores de proteasas, que de este modo mejoran los efectos apoptóticos de tBid.

En cuanto a su estructura, Bid se compone de 8 hélices alfa y con dos hélices alfa hidrófobas centrales (6 y alfa 7) que están rodeadas por hélices anfipáticas formando una estructura de horquilla. Tal disposición se conserva entre otras proteínas de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2, Bcl-xL y Bax, y es también similar a la del dominio de translocación de membrana de las toxinas bacterianas, tales como las colicinas y toxina de la difteria, lo que implica una función de Bid en la formación de poros. Aunque Bid puede unirse tanto a Bcl-2 y Bax a través de su dominio BH₃, parece que la capacidad de interactuar con Bax es más correlacionada con su capacidad para inducir apoptosis (Yin, 2006).



Bid participa en una amplia gama de escenarios de la muerte, donde la activación de proteasas sirve como señal de estimulación, ya que Bid de longitud completa es generalmente mucho más débil que Bid truncado (Kim, 2000). Bid puede causar apoptosis mitocondrial a través de muchos mecanismos; uno de los cuales es la capacidad de interactuar con miembros como Bax y Bak para permeabilizar la membrana externa mitocondrial, y con ello inducir la liberación de múltiples proteínas del espacio intermembranal, incluyendo el citocromo C, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, endonucleasa G y AIF (Van Loo, 2001.). Bid es capaz de inducir otras disfunciones prominentes en la mitocondria como la despolarización mitocondrial (Zhao, 2003), la reorganización de crestas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ding, 2004 y Kim, 2000)

Se ha demostrado que Bid aparte de ser una molécula pro-apoptótica, también puede poseer funciones importantes para la vida de una célula. Ya que puede servir como sensor de daño en el ADN, con el fin de participar en la detención de la progresión del ciclo celular (Kamer, 2005 y Zinkel, 2005). Bid también está implicada en el punto de control de la mitosis ya que cuando las células en proliferación sufren un daño en el ADN se detienen en el límite S-G₂ del ciclo celular, esto se manifiesta como una acumulación en la fase S, curiosamente se ha visto que en fibroblastos o células hematopoyéticas deficientes de Bid no ocurre (Yin, 2006). Esto sugiere que Bid podría desempeñar un papel importante en el punto de control de la mitosis, lo que sería necesario para reparar el ADN de las células o la maquinaria de síntesis de ADN antes de que puedan completar el ciclo celular.

ATM y ATR son dos quinasas que se activan en respuesta a daños del ADN y el estrés replicativo, curiosamente se ha encontrado que Bid es un sustrato de estas quinasas. Los estudios de mutagénesis indican que la fosforilación de Bid por ATM / ATR es necesario para la detención en la fase S después de daño en el DNA. Bid está íntimamente conectado a la maquinaria del ciclo celular para regular el umbral de la célula en la progresión a través del ciclo celular y para la activación de su muerte (Billen, 2009).



Notablemente, Bid también desempeña un papel en que daña el ADN inducida por la apoptosis, en particular de una manera reguladora p53 lo que no parece requerir la escisión de la caspasa 8 (Sarig, 2003). Estas propiedades de Bid hacen que sea una molécula única y fascinante para ser investigada con el fin de entender los procesos de supervivencia y de muerte que podría integrarse en una célula.

Como corolario de lo anterior, se puede señalar que el conocimiento de los mecanismos de la apoptosis permite entender diferentes cuadros clínicos frecuentes, como autoinmunidad, generación de cáncer, mecanismos de supervivencia de virus, enfermedades neurodegenerativas, etc. Este conocimiento en profundidad abre camino para un diagnóstico más preciso y permite elaborar terapias dirigidas a corregir la alteración a nivel molecular (Cory, 2002).

En las dos últimas décadas la incidencia del cáncer se ha incrementado dramáticamente a nivel mundial. Numerosas anormalidades cromosómicas y por consecuencia, genéticas han sido asociadas con los tumores. La gran mayoría de esas alteraciones han sido asociadas con genes y proteínas que forman parte de la maquinaria del ciclo celular. La proliferación celular no controlada es la característica más común de los tumores. Su crecimiento excede inevitablemente, en parte, porque sus constituyentes celulares tienen un código genético alterado que los capacita a evadir los puntos de control y por tanto, a alterar el ciclo celular.

El cáncer

El cáncer es una enfermedad genética compleja común en todos los países del mundo, es resultado de mutaciones y alteraciones en genes que codifican para elementos cruciales en los procesos de regulación y señalización celular, en la cual clones mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus vecinas, destruyendo el entorno celular.

La probabilidad de que una persona lo desarrolle cuando llega a los 70 años, oscila entre un 10 y un 40 % en ambos sexos. En promedio, en los países desarrollados alrededor de



una persona de cada cinco morirá de cáncer. Esta probabilidad es de uno de cada 15 en los países en vías de desarrollo.

Los cánceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de las células epiteliales se denominan carcinomas, se denominan sarcomas aquellos que derivan del tejido conjuntivo o de fibras musculares, linfomas a los derivados de alteraciones en los linfocitos, gliomas a cánceres del cerebro o médula espinal derivados de células gliales y leucemia, a los que se derivan de células hematopoyéticas (Alberts, 2004).

Cáncer de Cérvix

Según la Organización Mundial de la Salud, el Cáncer de Cérvix es el segundo cáncer más común en las mujeres en países en desarrollo y la séptima en los países desarrollados, afecta a mujeres de todas las edades. Se estima que más de 500,000 nuevos cánceres cervicales invasivos se diagnostican en el mundo cada año (Ribeiro, 2012).

El Cáncer de Cérvix es uno de los 200 tipos diferentes de cáncer que existen, se desarrolla en el cérvix, que es parte del útero en forma de cono que conecta la parte superior con la vagina, el Cáncer de Cérvix se desarrolla cuando células anormales en la membrana superior del cérvix empiezan a multiplicarse en respuesta a la infección por el VPH (virus del papiloma humano). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado 12 tipos de VPH cancerígenos, como de riesgo oncogénico o alto:

Los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, y 59 (Schiffman, 2011). Estudios señalan a el VPH-16 como el responsable del 54% de los cánceres asociados a VPH, seguido del VPH-18 con un 15%, VPH-45 con 9% y VPH-31 con 6%, siendo estos los responsables del 84% de todos los cánceres asociados (López, 2007).

Las células anormales de la cérvix pueden formar un abultamiento conocido como tumor. Los tumores benignos (no cancerosos) no se extienden de su área y usualmente no son peligrosos. Los tumores malignos (cancerosos), por el contrario, se extienden y pueden convertirse en cánceres letales.



El Cáncer de Cérvix tiene las siguientes etapas para su clasificación (Alemán, 2007):

- Etapa oó carcinoma *in situ*. El carcinoma *in situ* es un cáncer en su etapa inicial. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden sus tejidos más profundos del cuello uterino.
- Etapa invasiva (Estadios 1-4). En esta etapa, el cáncer ya ha invadido la cérvix y posiblemente otros tejidos y órganos.

Estadio I. El cáncer está circunscrito estrictamente al cuello uterino y por lo tanto no hay metástasis (Figura 5 a).

Estadio II. Es la afección vaginal que excluye al tercio inferior o infiltración de los parametrios (ligamentos de sostén de cuello uterino) sin llegar a la pared lateral de la pelvis (Figura 5b).

Estadio III. El cáncer se ha extendido a toda la región pélvica. Las células cancerosas también pueden haberse expandido a la parte inferior de la vagina. Las células también pueden haberse diseminado para bloquear los tubos que conectan los riñones a la vejiga (Figura 5c).

Estadio IV. Extensión por fuera de los límites del tracto reproductor, el Cáncer de Cérvix está en una etapa invasiva a avanzada (Figura 5d).

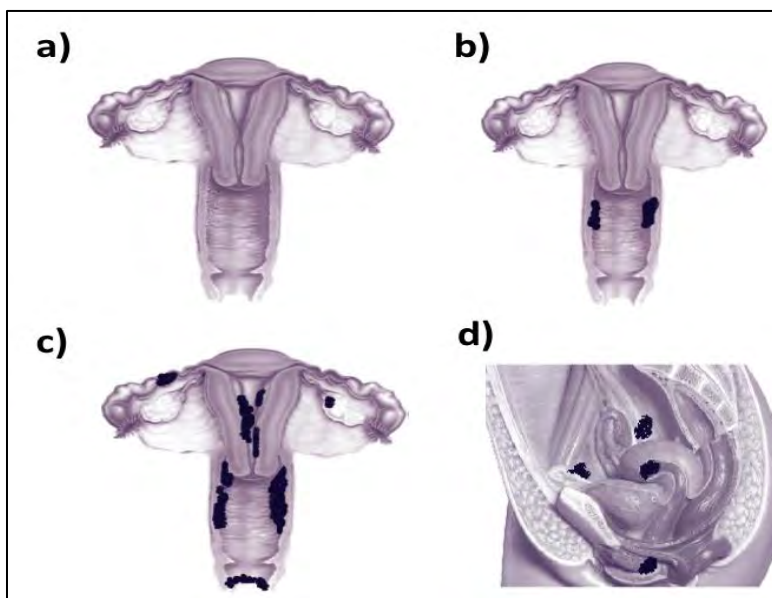


Figura 5. Estadios de la etapa invasiva del Cáncer de Cérvix. La imagen ilustra con manchas negras la invasión del Cáncer de Cérvix a lo largo de cada estadio. **a)** Estadio I. **b)** Estadio II. **c)** Estadio III. **d)** Estadio IV. Tomado de Montalvo 2011.

El tratamiento del Cáncer de Cérvix depende de la etapa y de la fase, es decir si se encuentra en un estado temprano o avanzado de la enfermedad, del tamaño de la forma del tumor, de la edad y salud general de la mujer.

Existen varias opciones de tratamiento disponibles para las lesiones pre-cancerosas y cancerosas de cérvix. (López, 2007)

1. Fase pre-invasiva (Estadio 0 – Carcinoma in Situ). Cuando el cáncer ha afectado únicamente la membrana exterior de la cérvix el tratamiento puede incluir lo siguiente:
 - Cirugía láser para destruir las células anormales.
 - Criocirugía para destruir las lesiones pre-cancerosas y cancerosas por congelación.
 - Procedimiento de extracción electroquirúrgica: es un procedimiento en el cual se usa un aro delgado de alambre eléctrico (por donde pasa la corriente) para extraer la sección del tejido con células anormales.



- Conización: es un procedimiento quirúrgico en el que se extrae una biopsia en forma de cono de la cérvix.
 2. Etapa invasiva (Estadios 1-4). Cuando el cáncer ya ha invadido la cérvix y haya metástasis el tratamiento puede incluir:
 - Radiación para reducir los tumores y destruir la capacidad de que las células se reproduzcan.
 - La quimioterapia donde se usan los medicamentos anti-cancerosos para llegar a todas las áreas del cuerpo para destruir las células cancerosas incluyendo las que se han extendido a otros órganos distantes.
 - La histerectomía que se puede hacer de dos formas dependiendo del grado del cáncer 1) Histerectomía simple es la extirpación del cáncer, la cérvix y el útero. 2) Histerectomía radical envuelve la extirpación de la cérvix, el útero, parte de la vagina y los ganglios de esa área.

Las células tumorales adquieren ciertas características que las distinguen de las demás entre ellas podemos mencionar autosuficiencia en señales de crecimiento, un potencial ilimitado para su replicación, metástasis es decir, estas células se desprenden de la masa original y entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo donde establecen tumores secundarios que ya no son susceptibles a extirpación quirúrgica (Brandan, 2002).

Inmunoterapia contra el Cáncer de Cérvix

Existen numerosas alternativas terapéuticas que pueden aplicarse para atacar el cáncer y una de ellas tiene que ver con la posibilidad de que sea el propio sistema inmune el que detecte las células cancerosas y las aniquile. A este tipo de terapia se le denomina inmunoterapia.



Actualmente se ha tratado de prevenir este tipo de cáncer utilizando la vacunas contra el cáncer las cuales tienen como objetivo activar el sistema inmune, sin embargo esto no siempre es aplicable a mujeres con la enfermedad ya presente. Es por ello que investigadores de múltiples áreas de la biología se han dado a la tarea de desarrollar terapias biológicas para los pacientes con cáncer, aunque esto se ha visto obstaculizada en parte por la extraordinaria complejidad y la promoción de mecanismos intrínsecos de retroalimentación en la homeóstasis de la lesión tisular, la reparación, la inflamación y la inmunidad. Recientemente la administración o el bloqueo de citocinas se han convertido en un blanco terapéutico para deficiencias inmunes, hipersensibilidad, autoinmunidad y cáncer, entre otras patologías ya que son sintetizadas por casi todas las células y participan en la homeostasis del organismo, por lo que su disminución, así como el exceso en su producción, tienen consecuencias patológicas severas (Vega, 2010).

Citocinas

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares, hidrosolubles, variando entre 8 y 30 kDa. Se generan por medio de diversos tipos de células en la región de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteincinasas activadas por mitógeno. Dentro de este nombre se agrupan: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral (Barros, 2011).

Las citocinas han sido consideradas tradicionalmente por sus efectos inmunomoduladores y por su papel en las respuestas a la infección y la inflamación, pero muchas tienen también efectos sobre el metabolismo intermediario, de modo que funcionan en la intersección entre metabolismo e inmunidad (Bonet, 2009). Se unen a receptores específicos de la membrana de las células donde van a ejercer su función, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta biológica (Roitt, 1998).

Las interleucinas son citocinas que se desarrollan de manera natural en el cuerpo, aunque se pueden producir en el laboratorio, ejercen múltiples efectos sobre el sistema neuro-inmuno- endocrino. Se les conoce como interleucinas (IL) porque actúan como señales de comunicación entre distintos leucocitos. Las IL ejercen efectos inmunomoduladores y catabólicos en condiciones patológicas (inflamación, infección), bajo las cuales aumenta su expresión en células del sistema inmunitario. Además, determinadas IL podrían participar en la modulación del metabolismo, la homeóstasis energética y la adiposidad corporal en condiciones no patológicas.

Hasta ahora se han identificado cerca de 100 interleucinas; dentro de las cuales interleucina-2 ha sido la más estudiada en el tratamiento del cáncer. La IL-2 estimula el crecimiento y la actividad de muchas células inmunes, como los linfocitos, que pueden destruir células cancerosas.

Interleucina 2 (IL-2).

La IL-2 es una proteína de 15 kDa, producida principalmente por células T-CD4, y en una menor cantidad, por células T-CD8+. Actúa por medio de los receptores IL-2R α , IL-2R β y IL-2R γ , usando la vía intracelular JAK/STAT (Familia Janus de tirosino cinasas / factores de transcripción) para estimular el crecimiento y la proliferación de linfocitos T y células B. También induce a la producción de otras citocinas, como, por ejemplo, IFN γ y FNT β , lo que resulta en la activación de los monocitos, neutrófilos y células NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK. De esa forma, queda demostrado que la IL-2 contribuye para la generación y la propagación de las respuestas inmunológicas específicas del antígeno (Raeburn, 2002). La IL-2 normalmente no se detecta en las lesiones agudas, aunque estudios *in vitro* indican que IL-2 es pro inflamatoria, su inyección genera un efecto antihiperalgésico (Song, 2000). La IL-2 se ha estudiado extensamente en aplicaciones clínicas, tales como la terapia oncológica, la inmunodeficiencia y el rechazo a los trasplantes (Ali, 2009).



JUSTIFICACIÓN

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, además en un informe difundido en el año 2008, aseguró que el Cáncer de Cérvix ocupa el segundo lugar dentro de los tipos de cáncer más frecuentes en la mujer, ya que al año se producen alrededor de 27 500 muertes.

Es por esto que nuestro grupo de trabajo evalúa el efecto de IL-2 sobre la regulación de proteínas pro-apoptóticas en células de las líneas de Cáncer de Cérvix: INBL y CALO. Se ha demostrado que 100 UI/ml de esta citocina tienen un efecto inhibitor sobre la proliferación de estas células e induce su muerte. Se sabe que la muerte por apoptosis consta de dos vías la extrínseca y la intrínseca que tienen como punto de confluencia la proteína pro-apoptótica Bid, por esta razón el presente trabajo tiene como objetivo determinar la participación de IL-2 en la regulación de esta proteína. Si comprobamos que IL-2 regula la expresión de bid en células de Cáncer de Cérvix contribuiremos a esclarecer los mecanismos moleculares por medio de los cuales IL-2 induce apoptosis en células de Cáncer de Cérvix.



HIPÓTESIS

Se ha confirmado que 100 UI/ml de IL-2 inhibe la proliferación de células de Cáncer de Cérvix INBL y CALO e induce su muerte vía apoptótica; por lo cual suponemos que en dicha muerte podría estar interviniendo la proteína Bid, la cual se sabe actúa como un puente de unión entre la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Por lo cual si estimulamos a células de las líneas de Cáncer de Cérvix con IL-2, se podrá confirmar la regulación de la expresión del mensajero para la proteína pro-apoptótica Bid.



OBJETIVOS

General

- ✓ Evaluar la expresión del RNAm de la proteína pro-apoptótica Bid en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.

Particulares.

- ✓ Obtener cultivos de las líneas celulares derivada de Cáncer de Cérvix INBL y CALO
- ✓ Extraer y purificar RNAm de las líneas celulares INBL y CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2.
- ✓ Obtener la expresión del mensajero para la proteína Bid por medio de las técnicas de RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa.

MÉTODO

Material biológico

- Líneas celulares de Cáncer de Cérvix INBL y CALO (Tabla 1) las cuales están criopreservadas en el laboratorio de Oncología celular de La UMIEZ de La FES Zaragoza, UNAM.

Línea celular de Cáncer de Cérvix	Estádio clínico	HPV	Características
CALO	II B	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL	IV B	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

Tabla 1.- Características de las líneas celulares de Cáncer de Cérvix (CALO e INBL). (Cáceres et al, 2001; Rangelet al, 2010).

Cultivo de células tumorales INBL y CALO.

Las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO se cultivaron en botellas de 75cm³ con medio RPMI-1640^(MICROLAB) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB)^(GIBCO, Life Technologies) previamente desactivado (Anexo II) y se incubaron bajo una atmosfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37° C, durante 48hr, con el fin de que proliferaran y de esta manera obtener la cantidad necesaria para realizar ensayos posteriores con IL-2 a los tiempos de 2h, 2 días y 3 días. Se revisó el cultivo cada 24 horas en microscopio invertido.

Cultivo de células tumorales en presencia de IL-2.

Con el fin de evaluar la cantidad y viabilidad celular se procedió a despegar las células en cultivo con verseno y teñirlas con azul de tripano para medir su viabilidad, el número de



células se determinó con la cámara de Neubauer^(American Optical, USA). Para cada ensayo se colocó un millón de células en cajas de 25 cm³ para tiempos cortos y 75cm³ para los tiempos largos, se agregaron 100 UI/mL de IL-2 en medio de cultivo para cada ensayo, y se incubaron con un pH de 7.0-7.2 durante los tiempos de 2, 48 y 72 horas.

Como controles del experimento se utilizaron los mismos ensayos pero en ausencia de IL-2. Como control positivo a apoptosis se utilizó un ensayo con un millón de células por cada línea celular en el cual se agregaron 2µL de camptotecina por cada mililitro de medio de cultivo y se incubó durante 24 horas en las condiciones mencionadas anteriormente.

Con el fin de observar variaciones en la expresión del mensajero entre células sincronizadas y no sincronizadas se realizó la misma cantidad de ensayos tanto en presencia como en ausencia de IL-2, en ellos se realizó previamente una sincronización celular para que los cultivos se encontraran en la misma fase del ciclo celular (G₁), esto se hizo cultivando a las células 24 horas en ausencia de SFB.

Extracción del RNAm

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo para cada ensayo se procedió a recuperar el medio de las botellas con IL-2^(R&D systems) en tubos y agregar verseno durante 6 minutos a cada botella, para obtener las células en suspensión. Una vez obtenidas las células en suspensión se procedió a decantar en el mismo tubo con medio recuperado y se centrifugó a 3000 Rpm durante 5 minutos, con el fin de obtener el botón celular. Al cual se le realizó un lavado con PBS y posteriormente se le agregó 1 mL de trizol^(Invitrogen, USA), se resuspendió homogéneamente transfiriendo a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se procedió a agregarle 200 µL de cloroformo a cada muestra y centrifugarse a 12 000 Rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4° C. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo eppendorf y



se agregaron 500 μ L de isopropanol (Sigma Aldrich) con el fin de precipitar el RNAm, se centrifugó nuevamente a 12 000 Rpm durante 15 minutos a 4° C y se dejó reposar cada muestra a -72 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se descongeló la muestra y se centrifugó nuevamente 12 000 Rpm durante 10 minutos a 4 °C, se decantó el isopropanol y se agregó 1mL de etanol (J.T BAKER) al 70 % para posteriormente centrifugar las muestras a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 ° C, con el fin de lavar y purificar la muestra. Centrifugada la muestra se decantó el etanol con micro pipeta y se dejó secando a temperatura ambiente. La muestra se rehidrato agregando 20 μ L de agua libre de RNAsas (Fermentas, USA), el stock fue conservado a -72°C.

Cuantificación del RNAm

Se realizó una dilución de la muestra en agua inyectable 4:200 y con su blanco que contenía 200 μ L de agua inyectable los cuales se colocaron en una celda, se procedió a cuantificar el RNA en un biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf) a una absorbancia de 260nm, 280 nm y la relación entre estas absorbancias con el fin de confirmar su pureza. Una vez obtenida las absorbancias se procedió a los cálculos correspondientes para lograr una concentración de μ g / μ L, para lo cual se ocupó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g / mL} = [(\text{Absorbancia } 260\text{nm})(\text{Volumen total de la dilución}) (\text{Densidad Óptica} = 40 \mu\text{g})] / 1000$$

Retrotranscripción (RT)

De acuerdo a la concentración de RNA obtenido se determinó el volumen de la solución necesaria para tomar 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA requerido para la técnica (Anexo Ia). Se procedió a la retrotranscripción utilizando un kit de RT-PCR en el que se establecieron las siguientes condiciones para una reacción (1Rx) el cual fue multiplicado por el número de muestras tanto control como con IL-2 (Tabla 2):

REACTIVOS	1 RX
Amortiguador 5x ^(Invitrogen, USA)	5 μl
DNTP's (Desoxirribonucleótidos trifosfato) ^(Invitrogen, USA) 5 μM	1.5 μl
Enzima MMLV (RT) ^(Invitrogen, USA)	1 μl
Oligo DT ^(Promega, USA)	1.8 μl
Agua libre de RNAsas ^(Fermentas, USA)	X μl
Muestra (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	X μl
Volumen Total	24 μl

Tabla 2.- Reactivos empleados en la RT. La tabla muestra la cantidad de reactivo utilizado para una reacción de Retrotranscripción (1 RT) para cada muestra.

La manipulación para la preparación de cada muestra fue en hielo. Las reacciones se colocaron en un termociclador ^(Eppendorf Estándar) el cual fue programado a 42° C durante 1 hora. El cDNA obtenido se conservó a -72°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el cDNA se procedió a amplificar una secuencia pequeña y específica del ADN utilizando primers específicos para la secuencia que deseamos amplificar (Tabla 3), esto es posible gracias a la técnica de PCR la cual se compone de tres fases: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión.

Para realizar esta técnica se utilizó un kit de PCR Go taq Polimerasa, en el cual por cada reacción (1Rx) se utilizan los siguientes reactivos con sus respectivas cantidades (ver Anexo I b), que se multiplicaron por el número de muestras (Tabla 4):

Reactivos	1 Rx
Amortiguador 5x Green ^(Promega)	6 μ L
DNTP's 10 Mm ^(Invitrogen)	0.8 μ L
Enzima GoTaq Polimerasa ^(Invitrogen)	0.15 μ L
Primer 1 (Sentido) ^(Unipars, S.A.)	1 μ L
Primer 2 (Antisentido) ^(Unipars, S.A.)	1 μ L
Agua libre de RNAsas ^(Fermentas)	7.05 μ L
Muestra de cDNA	4 μ L
Volumen Total	20 μ L

Tabla 3.- Reactivos empleados en la PCR. La tabla muestra la cantidad de reactivo utilizado para la amplificación de cada muestra (1 Rx).

Para la preparación de cada muestra: tanto para células en ausencia como en presencia de IL-2 de cada línea celular se realizó un Mix en tubos eppendorf de todos los reactivos con las cantidades previamente multiplicadas por el número de reacciones a realizar agregando por último la enzima. Preparado el Mix para todas las reacciones se

repartieron 16 μL en diferentes tubos eppendorf destinados para cada muestra a amplificar que contenían 4 μL del cDNA obtenido de la RT. Las muestras se prepararon en hielo y se colocaron en un termociclador ^(eppendorf estandar) el cual llevo el siguiente programa para la amplificación de las muestras:

1er ciclo: Fase de desnaturalización del DNA

94°C 6 minutos

2do ciclo: se repite 29 veces

94°C 45 segundos (**Fase de desnaturalización del DNA**)

55° C 2 minutos (**Fase de alineamiento del DNA**)

72°C 2 minutos (**Fase de Extensión del DNA**)

3er ciclo:

55°C 2 minutos (**Fase de alineamiento del DNA**)

72°C 7 minutos (**Fase de extensión de DNA**)

20°C 15 minutos (**Fase de Estabilización**)

4°C 1 hora

Primer	Sentido / Antisentido	Secuencia	Pares de Bases
bid	Sentido	CCT GTG ACC ACA ACA TGA GG	195
	Antisentido	AAG CTT TTG CCC ACT TTC AA	
β – actina	Sentido	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	234
	Antisentido	GGT CTCAAACATGATCTGGG	

Tabla 4.-Secuencias de los primers: Se muestran los pares de bases de cada uno de los primers utilizados en la detección del gen de interés para evaluar apoptosis (Bid) así como β -Actina como un control interno de la técnica. Los primers fueron diseñados con ayuda del programa computacional Primer 3:<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> y probados en ePCR:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-PCR/>



Electroforesis de los productos de PCR

Para visualizar la expresión del producto obtenido de la PCR de cada una de las muestras se realizó una electroforesis con 4 μ L del producto amplificado en un gel de agarosa al 1.5%.

Se prepararon los geles de agarosa pesando 1.5 gramos de agarosa, la cual se diluyó en 100 mL de TBE 1X (Ver Anexo II y III) en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Para obtener un mejor homogeneizado la dilución se calentó a 50 °C hasta que la muestra fue completamente homogénea, posteriormente se agregaron 13 μ L de Bromuro de etidio y se agitó la muestra vigorosamente para diluirlo. Se procedió a montar la cámara de electroforesis ^(Owl, USA) junto con los peines con los pozos deseados y se procedió a vertir la solución y dejar polimerizar durante 20 minutos aproximadamente. Una vez polimerizado el gel se retiran los peines y se monta la cámara para la corrida electroforética, en la cual se agregó aproximadamente un litro de Buffer de corrida (TBE 0.5x).

Posteriormente se colocaron en el primer pozo 5 μ L de la escalera con pares de bases y posteriormente las muestras control y problema no sincronizadas y después los ensayos control y problema de células sincronizadas de los cuales se colocó 4 μ L de cada muestra amplificada en cada pozo. Se corrió el gel durante 1 hora aproximadamente a 80-90 volts.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el ánodo. De tal manera la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA en función de su tamaño y movilidad. Para la visualización de los ácidos nucleídos se utilizó un colorante fluorescente, bromuro de etidio ^(MERCURY). Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleícos y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300 nm) de un



transiluminador^(UVP, USA). De este modo se permite la visualización del DNA y la identificación de los productos de interés (α y β -actina) por sus tamaños en pares de bases en relación al recorrido de cada banda con el marcador o escalera de peso molecular (MassRuler TM Express DNA ladder, LR Recerse)^(Fermentas, USA), así como la identificación del RNAr en sus subunidades 28S y 18S.

Los ensayos mencionados se realizaron en tres ocasiones de manera independiente para confirmar que los resultados fueran confiables y reproducibles.



RESULTADOS

El proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis, suele estar desregulado en células neoplásicas por lo que el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de inducción de apoptosis en este tipo de células es importante para proponer nuevas alternativas terapéuticas.

Al respecto, en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza ya se ha demostrado que IL-2 exógena regula la expresión del mensajero para caspasa 8, molécula inductora de la vía extrínseca en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO (Sierra Mondragón, 2011) la cual puede activar a Bid.

Estos datos son muy interesantes ya que caspasas 8 (iniciadora), puede activar directamente a caspasa 3 o bien puede participar en la activación de la vía intrínseca o mitocondrial activando a la proteína pro-apoptótica Bid, que se ha reportado puede servir como un puente entre ambas vías apoptóticas ya que esta proteína activa la vía intrínseca por medio de p53, o bien por receptores de muerte a través de caspasas iniciadoras como la 8.

Dado que IL-2 regula la expresión del mensajero de proteínas apoptóticas y con la finalidad de evaluar si también regula la expresión del mensajero para la proteína Bid, en este trabajo se definieron dos grupos de muestras para ambas líneas de Cáncer de Cérvix: un grupo con células no sincronizadas y otro grupo con células sincronizadas; en ambos grupos se contó con células cultivadas a 2, 48 y 72 horas en presencia y/o ausencia de 100 UI/mL de IL-2.

Como control positivo de apoptosis se utilizaron células cultivadas con Camptotecina durante 24 horas. Como control interno de la técnica de PCR se utilizó la expresión del mensajero para β -actina.

i. Integridad del RNA en células de las líneas de CaCu INBL y CALO.

- **Células no sincronizadas**

Después de obtener el RNA mensajero de las células de las líneas de Cáncer de Cérvix no sincronizadas y cultivadas por 2, 48 y 72 horas en las condiciones antes descritas, se procedió a confirmar la integridad del RNA. Esto se realizó al correr los mensajeros en un gel de agarosa en el que se colocaron los RNAs teñidos con bromuro de etidio. Al excitar el gel con luz UV observamos nítidamente las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal (RNAr). En general no se observan diferencias significativas en los productos de amplificación de las muestras de las líneas celulares INBL y CALO cultivadas en presencia (+) y en ausencia (-) de IL-2 (Figura 6).

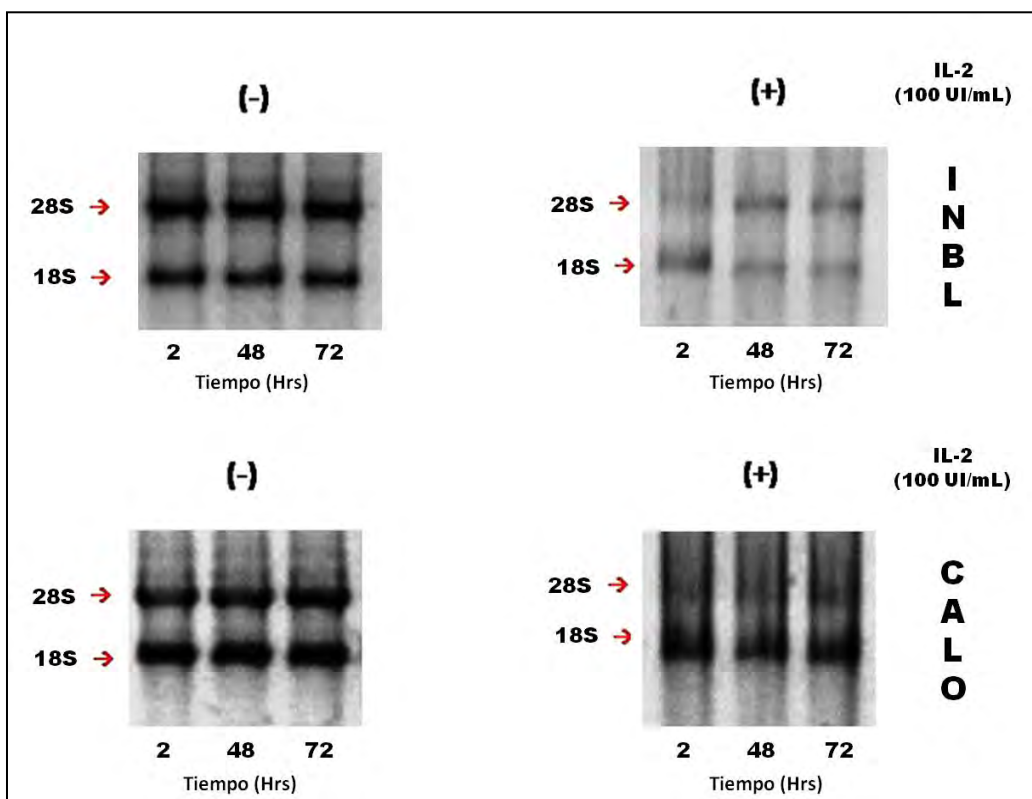


Figura 6.- Integridad del RNAm en células no sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue 2, 48 y 72 horas. Las bandas obtenidas muestran la integridad de las subunidades 28 S y 18 S del RNAr.

- **Células sincronizadas**

Para evaluar la integridad del mensajero obtenido de células de las líneas INBL y CALO previamente sincronizadas por 24 horas y después cultivadas por 2, 48 y 72 horas, en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2. Se realizó un gel de agarosa en el que se colocaron los RNA mensajeros teñidos con bromuro de etidio, la micrografía muestra las subunidades 28S y 18S del RNAr, en ambas muestras celulares de las líneas de Cáncer de Cérvix no se observa diferencia significativa en su expresión (Figura 7).

En general, tanto en células no sincronizadas y sincronizadas, se observa integridad del RNAm obtenido de las líneas INBL y CALO (Figura 6 y 7).

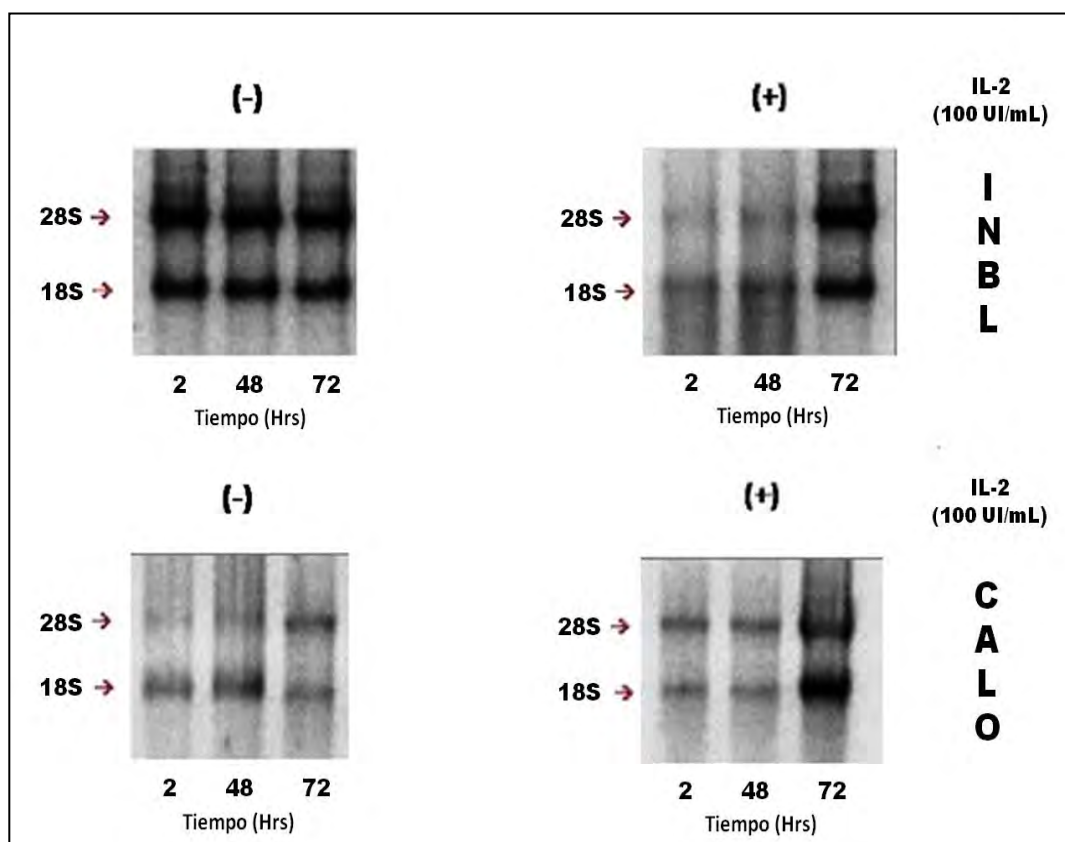


Figura7.- Integridad del RNAm en células sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2,48 y 72 horas. Las bandas obtenidas muestran la integridad de las subunidades 28 S y 18 S del RNAr.

Una vez confirmada la integridad del mensajero extraído de células de las líneas CALO e INBL no sincronizadas y sincronizadas y cultivadas en ausencia o presencia de 100 UI/mL de IL-2 se procedió a determinar la expresión del mensajero para β -actina.

ii. Expresión de β - actina en células de las líneas INBL y CALO.

Se sabe que β -actina es una proteína constitutiva de la célula, que continuamente se está transcribiendo ya que desempeña importantes funciones biológicas, como dar soporte a la célula. Por lo tanto esta proteína que se encuentra en continua síntesis lo que permite se use como un indicador de síntesis proteica. Por lo que la presencia del mensajero para β -actina fue empleado como control interno de la técnica.

Con la finalidad de confirmar la expresión del mensajero para β -actina en células sincronizadas y no sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix, cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2, se realizó la amplificación del gen para esta proteína usando la técnica de RT-PCR.

- **Células no sincronizadas**

Los resultados obtenidos de la expresión de β -actina para células no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 muestran un producto de amplificación de 234 pb que corresponde al esperado para este gen. Se observa una expresión uniforme para el mensajero de β -actina tanto en células en ausencia como en presencia de IL-2 (Figura 8).

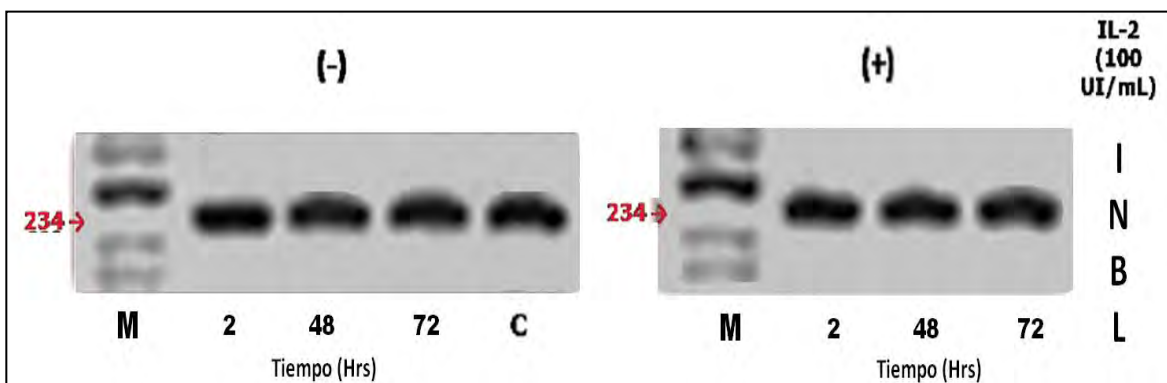


Figura 8.- Expresión del RNAm para β -actina en células no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2, 48 y 72 horas. Las bandas muestran la expresión uniforme del mensajero para β -actina en células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2. Sin variaciones en el tiempo. Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

Para el caso de células no sincronizadas de la línea celular CALO cultivadas en presencia y ausencia de IL-2, también se obtuvo un producto de amplificación de 234 pb. Los resultados para las células de la línea CALO no sincronizadas, muestran la expresión uniforme del mensajero para β -actina entre células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 (Figura 9).

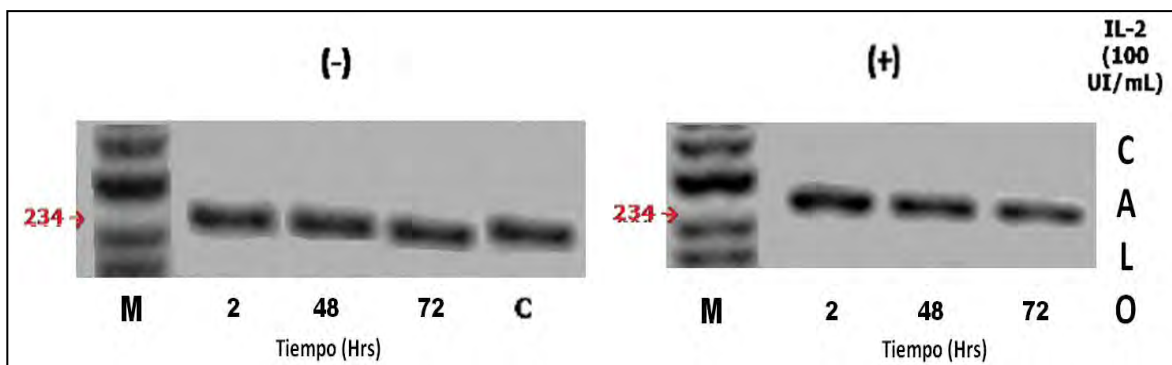


Figura 9.- Expresión del RNAm para β -actina en células no sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2, 48 y 72 horas. Las bandas muestran la expresión uniforme del mensajero para β -actina entre células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2. Sin variaciones en el tiempo. Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

- **Células sincronizadas**

Para las células sincronizadas, es decir cultivadas por 24 horas en ausencia de SFB previo al cultivo a 2, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de IL-2, se realizó la técnica RT-PCR con células de la línea INBL, las cuales muestran un producto de amplificación para β -actina de 234pb, sin variación en la expresión entre las muestras cultivadas en presencia o ausencia de IL-2 y sin cambios en el tiempo (Figura 10).

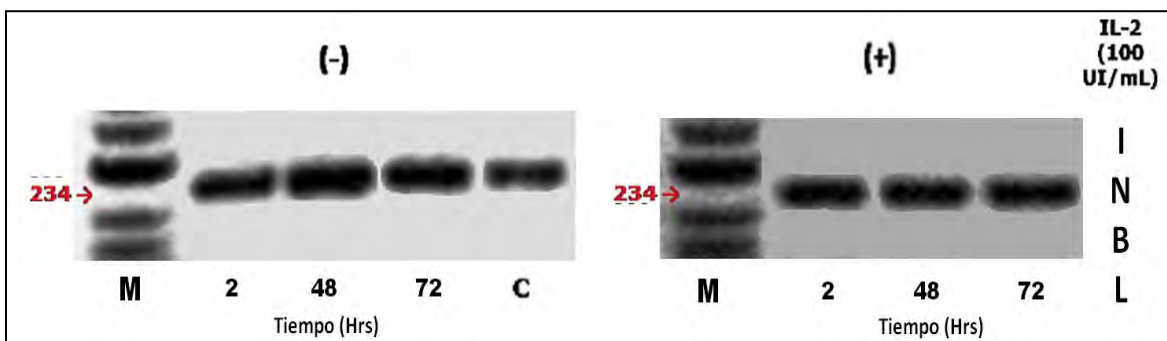


Figura 10.- Expresión del RNAm para β -actina en células sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2,48 y 72 horas. Las bandas muestran la expresión constante del mensajero para β -actina en células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2. Sin variaciones en el tiempo. Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

En relación a la línea CALO se obtuvo un producto de amplificación de 234 pb, el esperado para β -actina. Las bandas muestran la expresión uniforme del RNAm para en células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 y sin variación en el tiempo (Figura 11).

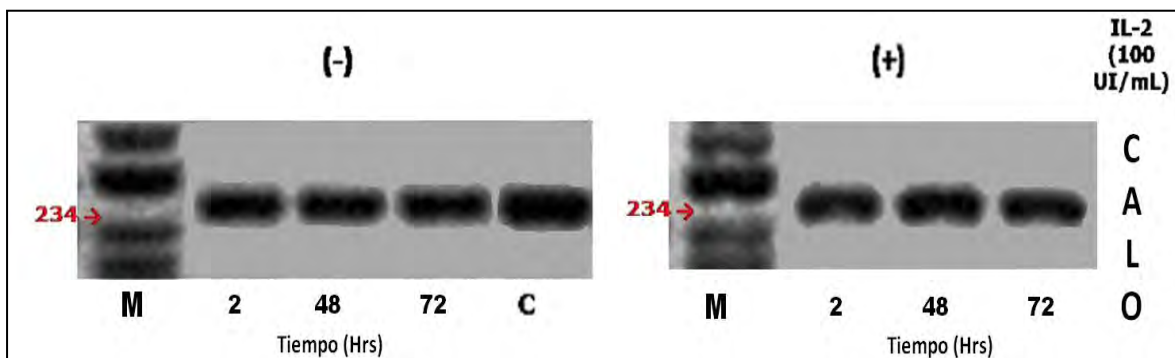


Figura 11.- Expresión del RNAm para β -actina en células sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2,48 y 72 horas. Se muestra la expresión uniforme del mensajero para β -actina en células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2. Sin variaciones en el tiempo.

Con el fin de verificar si había variación en la expresión de β -actina entre células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas INBL y CALO se realizó una comparación entre los productos de amplificación para β -actina obtenidos de las líneas de Cáncer de Cérvix tanto para células cultivadas en presencia como en ausencia de IL-2.

- **Comparación de la expresión de β -actina entre células de las líneas CALO e INBL sincronizadas y no sincronizadas, cultivadas en ausencia de IL-2.**

Para la línea CALO, se presenta una disminución en la expresión de β -actina en células no sincronizadas (Figura 12).

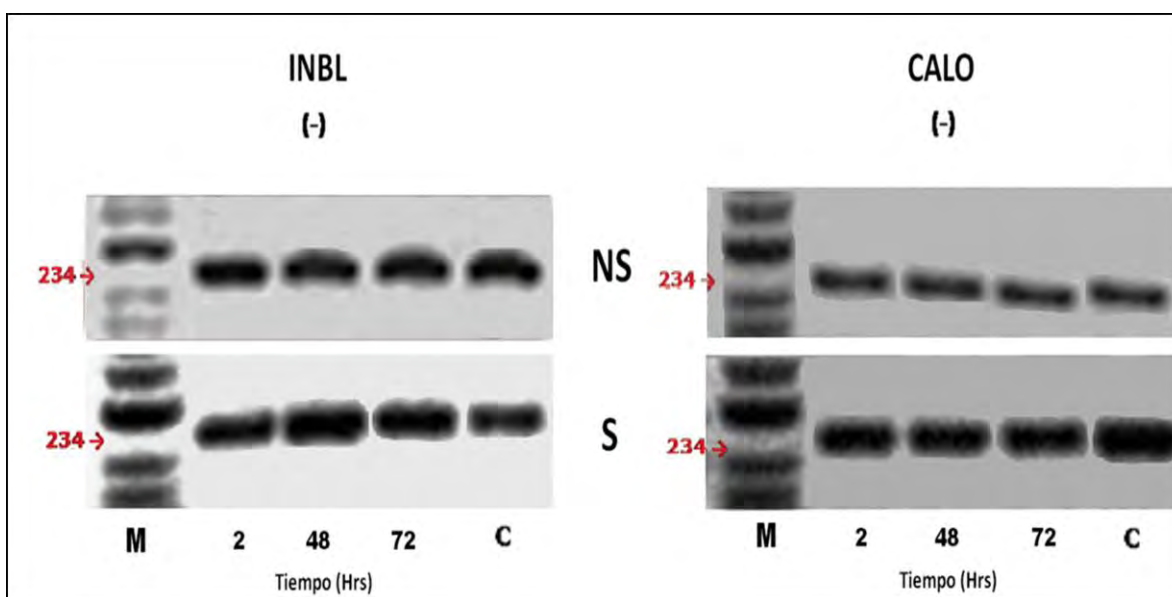


Figura 12.- Expresión de β -actina en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas INBL y CALO cultivadas en ausencia de IL-2. En células no sincronizadas de la línea CALO se observa una disminución en la expresión del mensajero para β -actina con respecto a las células sincronizadas. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C). Células no sincronizadas (NS). Células sincronizadas (S).

- Comparación de la expresión de β -actina entre células de las líneas CALO e INBL sincronizadas y no sincronizadas, cultivadas en presencia de IL-2.

Se muestra un decremento en la expresión de β -actina en células no sincronizadas de la línea CALO con respecto a las células sincronizadas (Figura 13).

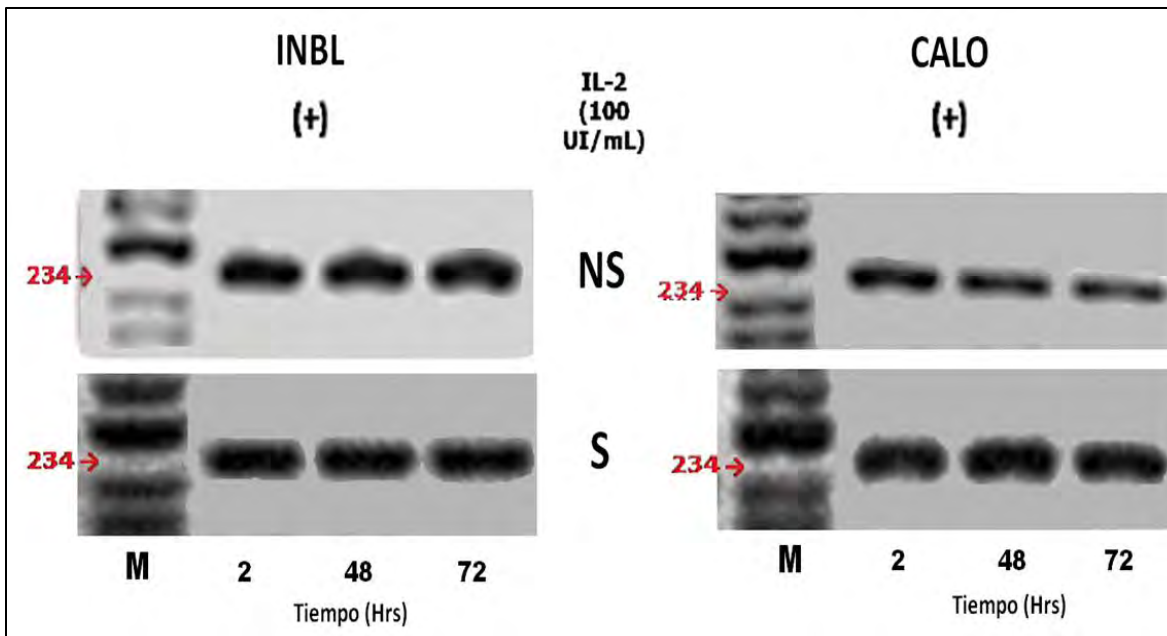


Figura 13.- Expresión de β -actina en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO cultivadas en presencia de IL-2. En células no sincronizadas de la línea CALO la expresión del mensajero para β -actina disminuye con respecto a las células sincronizadas. Marcador en pares de bases (M). Células no sincronizadas (NS). Células sincronizadas (S).

Dado que se obtuvieron productos de amplificación para β -actina muy semejantes en los diferentes cultivos confirmamos que el protocolo diseñado para la técnica de PCR garantiza la amplificación de cualquier primer. Por lo cual se procedió a confirmar la expresión de β -actina en células de las líneas INBL y CALO sincronizadas y no sincronizadas cultivadas por 2, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2.

iii. Expresión del RNAm de la proteína Bid en células de las líneas INBL y CALO.

Se sabe que la proteína Bid juega un papel muy importante en la inducción de muerte por apoptosis ya que sirve de puente de unión entre las vías intrínseca y extrínseca. Por ello, en el presente trabajo se determinó la expresión de su mensajero por medio de la técnica de RT-PCR. Esto con el propósito de evaluar si IL-2 regula la expresión de esta proteína pro-apoptótica. Así mismo, se valoró la influencia de la sincronía celular en dicha expresión.

- **Células no sincronizadas**

En células no sincronizadas de la línea de Cáncer de Cérvix INBL cultivadas en presencia y ausencia de IL-2, se realizó la técnica de PCR para obtener el producto de amplificación para bid, el cual fue de 195pb. En las células cultivadas en presencia de IL-2 la expresión del mensajero para la proteína Bid aumento con respecto al tiempo de cultivo (2,48 y 72 horas) mientras que en las células cultivadas en ausencia de IL-2 la expresión de bid es constante (Figura 14).

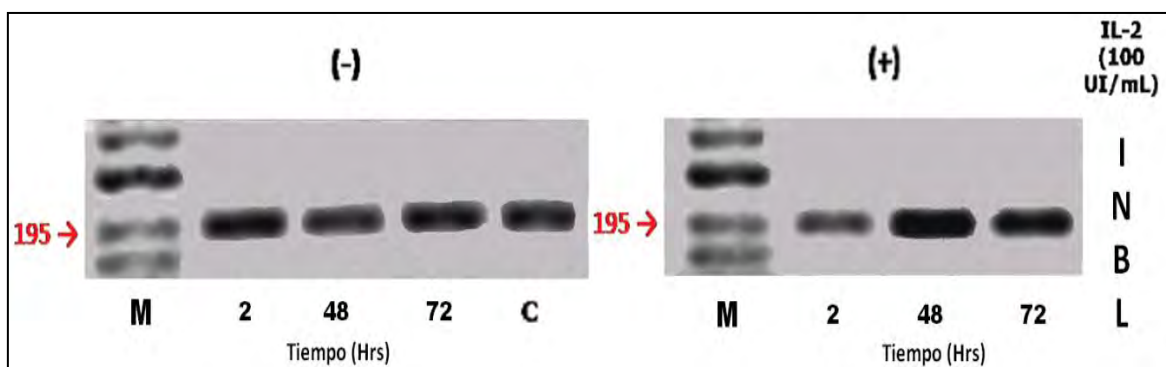


Figura 14.- Expresión del RNAm para Bid en células no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. En las células en presencia de IL-2, la expresión de bid aumento conforme aumento el tiempo de cultivo. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2,48 y 72 horas. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

En cuanto a las células de la línea CALO cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2, se observó que en ausencia de IL-2 la expresión del mensajero para Bid fue uniforme con respecto al tiempo de cultivo, mientras que para las células cultivadas en presencia de IL-2 su expresión disminuyó en el tiempo (Figura 15).

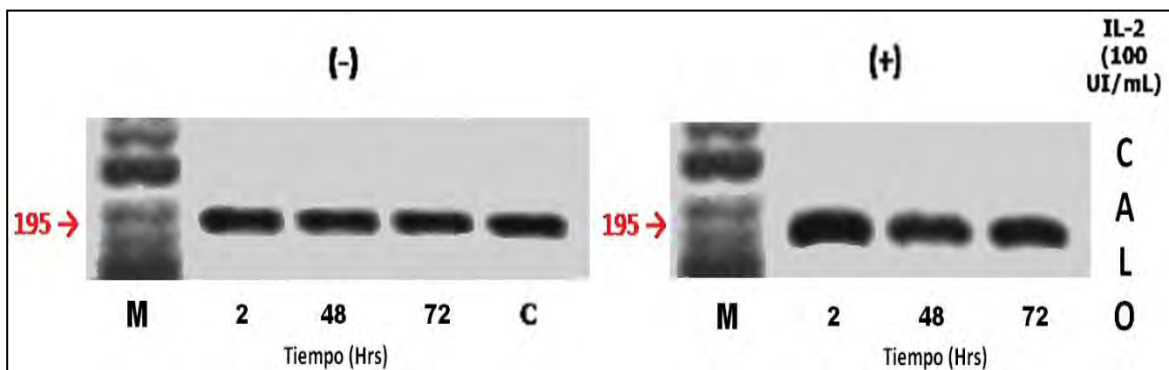


Figura 15.- Expresión del RNAm para Bid en células no sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. En las células en presencia de IL-2, la expresión de bid disminuyó conforme aumentó el tiempo de cultivo. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2, 48 y 72 horas. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

- **Células sincronizadas**

En lo que respecta a células de la línea INBL sincronizadas, previamente al cultivo por 2, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de 100 UI/ml de IL-2 muestran un producto de amplificación de 195 pb, el esperado para el gen de Bid. Se detecta una disminución en la expresión de mensajero para Bid con respecto al tiempo en células cultivadas en presencia de IL-2, teniendo la mayor expresión a 2 horas. En los cultivos en ausencia de IL-2 no se observa variación de la expresión del gen (Figura 16).

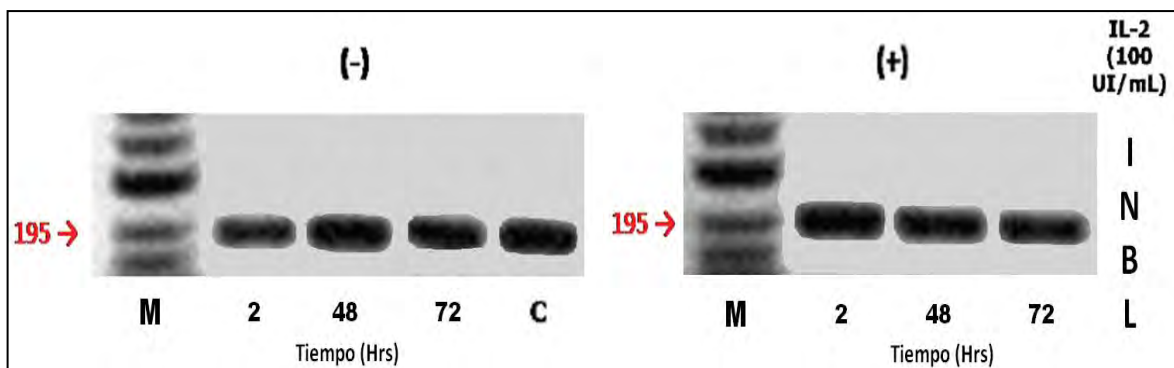


Figura 16.- Expresión del RNAm para Bid en células sincronizadas de la línea INBL cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. En las células en presencia de IL-2, la expresión de bid disminuyó conforme aumentó el tiempo de cultivo. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2, 48 y 72 horas. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

En las células sincronizadas de la línea celular CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL se observó una disminución del mensajero para Bid con respecto al tiempo con la menor expresión a 72 horas, mientras que para las células cultivadas en ausencia de IL-2 la expresión del mensajero de Bid es constante (Figura 17).

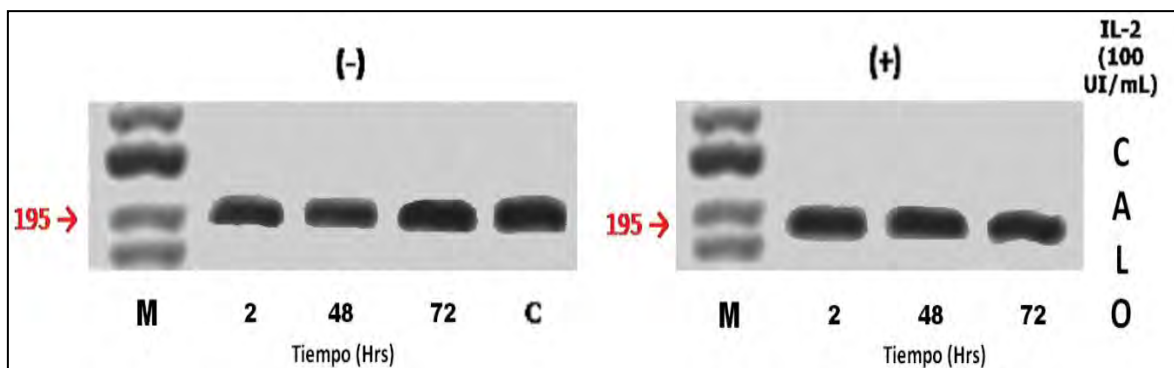


Figura 17.- Expresión del RNAm para Bid en células sincronizadas de la línea CALO cultivadas en ausencia (-) y presencia (+) de IL-2. En las células en presencia de IL-2, la expresión de bid disminuyó conforme aumentó el tiempo de cultivo. El tiempo de cultivo en ambas líneas celulares fue de 2, 48 y 72 horas. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C).

Con la finalidad de verificar si la expresión del mensajero para bid de células de las líneas INBL y CALO presenta variaciones en células no sincronizadas y sincronizadas cultivadas por 2, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de 100UI/mL de IL-2. Se realizó una comparación entre los productos de amplificación para bid de células sincronizadas y no sincronizadas para cada línea tumoral.

- **Comparación de la expresión de bid entre células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas de Cáncer de Cérnix cultivadas en presencia y ausencia de IL-2.**

Al comparar la expresión del producto de amplificación para bid en células sincronizadas y no sincronizadas de la línea INBL cultivadas en presencia y ausencia de IL-2, se observó que en células no sincronizadas cultivadas en presencia de IL-2 hay un aumento en la expresión del mensajero para Bid con respecto al tiempo de cultivo, mientras que en células sincronizadas y cultivadas en presencia de IL-2 la expresión de bid disminuyó conforme transcurrió el tiempo de cultivo (Figura 18).

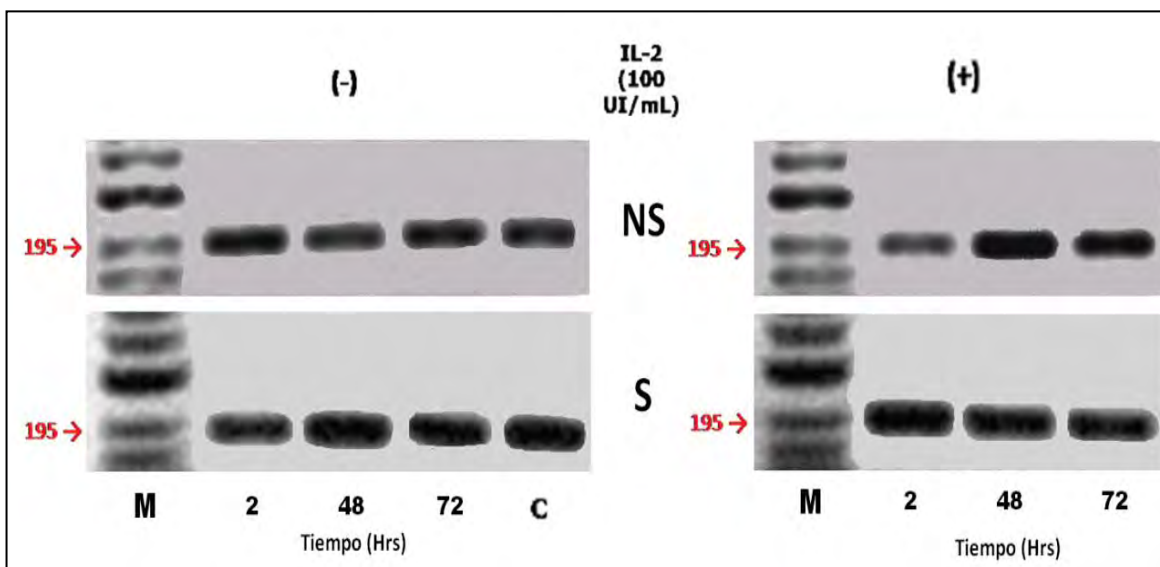


Figura 18.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de la línea INBL en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2. Se observa un aumento en la expresión de bid en células no sincronizadas cultivadas en presencia de IL-2, mientras que en células sincronizadas hay un decremento en la expresión de gen. Marcador en pares de bases (M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C). Células no sincronizadas (NS). Células sincronizadas (S).

Para el caso de la línea CALO observamos que las células no sincronizadas y cultivadas en presencia de IL-2 tienen un aumento en la expresión de bid con respecto a las células sincronizadas(Figura 19).

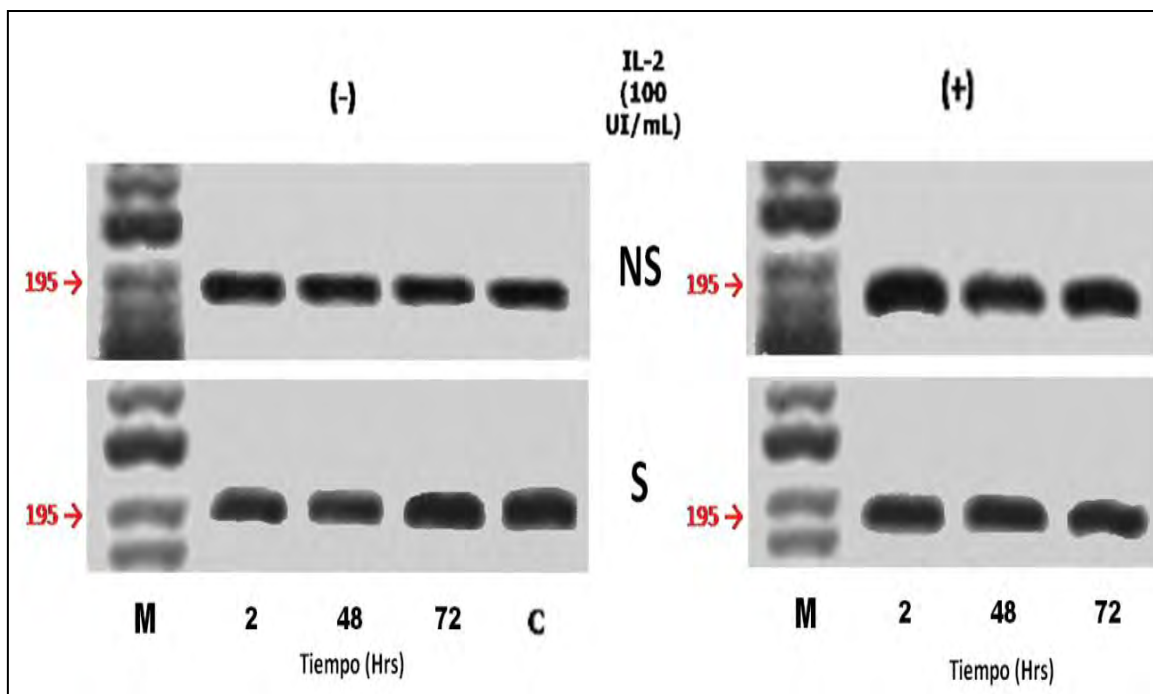


Figura 19.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de la línea CALO en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2. Se observa un aumento en la expresión de bid en células no sincronizadas cultivadas en presencia de IL-2 con respecto a las células sincronizadas y a las células cultivadas en ausencia de IL-2. Marcador en pares de bases(M). Camptotecina como control positivo a apoptosis (C). Células no sincronizadas (NS). Células sincronizadas (S).

Con el propósito de evaluar el estadio de las líneas de Cáncer de Cérnix CALO e INBL modifica la expresión del mensajero para Bid, se realizó una comparación entre los productos de amplificación de células de ambas líneas celulares cultivadas a 2, 48 y 72 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2.

- **Comparación de la expresión del mensajero para la proteína Bid entre células de las líneas de Cáncer de Cérnix cultivadas en presencia de IL-2.**

Los resultados obtenidos para las células no sincronizadas de las líneas INBL y CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL muestran un aumento en la expresión de bid para la línea INBL (estadio IV), mientras que en la línea CALO (estadio IIB) la expresión de bid es inversamente proporcional al tiempo de cultivo.

En el caso de las células sincronizadas de las líneas celulares CALO e INBL, observamos una disminución progresiva con respecto al tiempo en la expresión de bid (Figura 20).

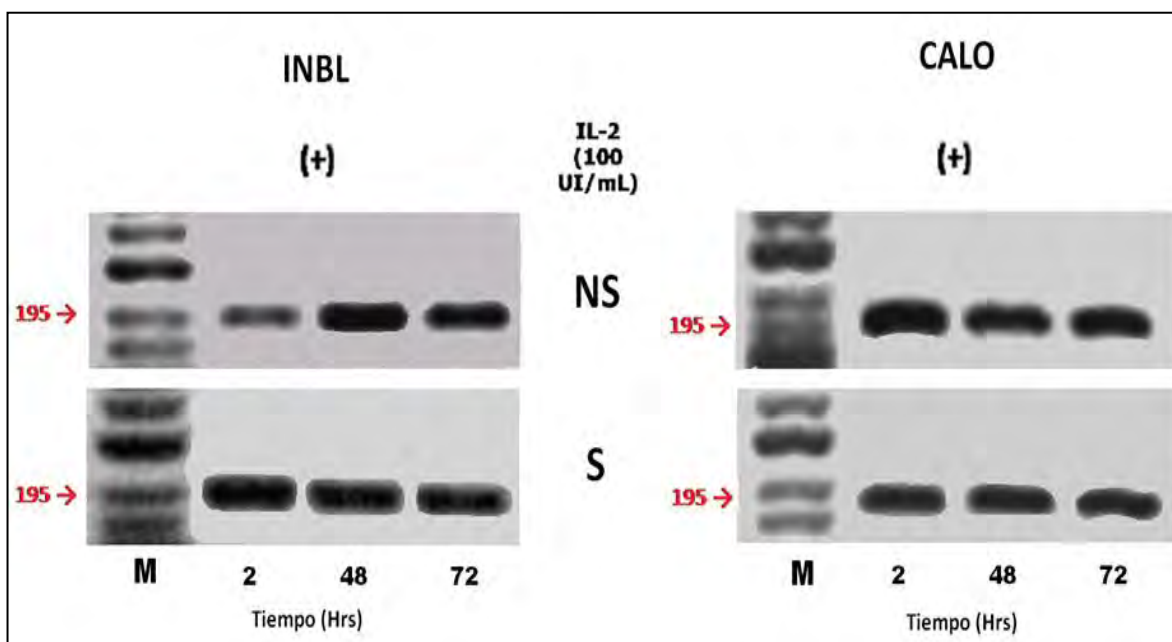


Figura 20.- Expresión del RNAm de la proteína Bid en células no sincronizadas y sincronizadas de las líneas INBL y CALO en presencia de 100 UI/mL de IL-2. La expresión del mensajero para Bid varía con respecto a la línea celular; en células no sincronizadas de la línea INBL la expresión de bid aumenta con respecto al tiempo, mientras que en la línea CALO la expresión disminuye conforme aumenta el tiempo de cultivo. En las células sincronizadas la expresión de bid disminuyó con respecto al tiempo en las dos líneas de Cáncer de Cérnix. Marcador en pares de bases (M). Células no sincronizadas (NS). Células sincronizadas (S).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente el desarrollo de terapias biológicas para los pacientes con cáncer se ha visto obstaculizado por su extraordinaria complejidad. Hoy en día el uso de citocinas en la inmunoterapia proporciona nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer. Las citocinas son moléculas solubles involucradas en la regulación de la respuesta inmune, estas moléculas actúan ya sea aumentando la expresión de anticuerpos o directamente contra células tumorales. En nuestro grupo de trabajo se evalúa a IL-2 como alternativa terapéutica contra el Cáncer de Cérvix, debido a que IL-2 se ha empleado en diversos modelos preclínicos, incluyendo el carcinoma de mama, cabeza, cuello, entre otros, además de que tiene la capacidad de activar poblaciones de células citotóxicas con actividad antitumoral y es una proteína muy importante en la respuesta inmunológica al promover la activación de linfocitos T. Por lo que su aplicación podría ser una buena opción para pacientes con Cáncer de Cérvix.

Al respecto, el Laboratorio de Oncología Celular, recientemente ha publicado que el uso de 100UI/mL de IL-2 inhibe la proliferación de células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO. Así mismo, han demostrado la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en estas mismas líneas celulares (Alvarado, 1997 y Rangel et. al 1998). Por lo que el Cáncer de Cérvix se suma a la lista de células tumorales que expresan este receptor al igual que el melanoma, carcinoma de mama, colorectal, pulmón, hígado, estomago, renal, y líneas linfoides. Además, de los tipos celulares normales como riñón, células endoteliales de cordón umbilical, queratinocitos, células intestinales, células de origen nervioso.

Por otro lado, se ha comprobado, *in vitro*, que 100 UI/mL de IL-2 administrado a cultivos de células de las líneas INBL y CALO induce su muerte por apoptosis (Del Rio Ortiz, 2012). Otro dato importante, es que IL-2 aumenta la expresión del mensajero para caspasa 8 (caspasa iniciadora), proteasa que puede activar la vía intrínseca de la apoptosis a través de la molécula Bid (Sierra Mondragón, 2011). Sin embargo, no se cuenta con datos que indiquen como es que la proteína Bid se activa para inducir la apoptosis de



células de Cáncer de Cérvix. Por esta razón, este trabajo de investigación se proporciona información que demuestra la participación de Bid en la inducción de apoptosis estimulado por IL-2 en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO, además de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares por los cuales IL-2 regula la expresión del mensajero para proteínas pro-apoptóticas, como Bid; la cual forma un puente de unión entre la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Para esclarecer la participación de Bid en la muerte por apoptosis inducida por IL-2 en células de Cáncer de Cérvix; se utilizó la técnica RT-PCR para evaluar la regulación de la expresión del mensajero para esta proteína. Se definieron dos grupos experimentales: uno en el que se incluyen células no sincronizadas (es decir, células en diferentes fases del ciclo celular) y en el otro grupo células sincronizadas, donde se tiene un 80% de células en fase G₁, con el fin de que el mayor número de células inicien de la misma fase del ciclo celular, que suele ser G₁, cuando son estimuladas. En las células de las líneas INBL y CALO sincronizadas y cultivadas en presencia de IL-2, se encontró un aumento en la expresión de Bid que atribuimos a la presencia de la citocina. Se logró observar la evidente presencia de Bid debido a que la mayoría de las células se encontraban en la fase G₁ del ciclo celular al administrar el tratamiento con IL-2. Por lo tanto, pudimos determinar la mayor cantidad de RNAm para esta proteína pro-apoptótica. Debido a la sincronización es más evidente el efecto de IL-2 sobre las líneas INBL y CALO a las 2 horas de cultivo, induciendo su muerte por apoptosis a través de la activación de Bid.

Es interesante que IL-2 muestre un mayor efecto en la regulación de la expresión de Bid en células sincronizadas, sin embargo, debemos recordar que las células de los tumores *in vivo*, suelen encontrarse en diferentes fases del ciclo celular, por lo que los resultados obtenidos con células no sincronizadas tienen mayor relevancia. En este caso demostramos que IL-2 también induce un aumento de la expresión del RNAm de Bid en ambas líneas celulares. Por lo que una posible administración *in vivo* de IL-2 como tratamiento induciría la muerte de las células de Cáncer de Cérvix. Sin embargo, pudimos



detectar que existe una regulación diferencial de la expresión del RNAm para bid en las líneas celulares de Cáncer de Cérvix CALO e INBL. Siendo más susceptible a IL-2 la línea CALO (estadio IIB) ya que el mensajero de Bid se detectó al menor tiempo de cultivo, mientras que en la línea INBL (estadio IV) responde a la acción de IL-2 hasta las 72 horas. Lo cual nos hablaría de una resistencia a la inducción de apoptosis en células tumorales de estadio avanzado, no obstante, después de 72 horas también se tiene un aumento de bid.

Por lo tanto, el hecho de haber comprobado que IL-2 regula la expresión diferencial al alta de bid en ambas líneas celulares nos permite establecer el siguiente mecanismo hipotético de como IL-2 está regulando la expresión de diversas moléculas implicadas en la muerte por apoptosis en las células de Cáncer de Cérvix.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha comprobado que IL-2 está regulando al alta la expresión del mensajero de otras moléculas apoptóticas en las líneas de Cáncer de Cérvix CALO e INBL. Entre ellas podemos mencionar a caspasa 8 (Sierra Mondragón, 2012), caspasa 3 (Torres, 2012) y citocromo C (Del Rio Ortiz, 2012). Asimismo, se han observado en células de Cáncer de Cérvix, los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de células apoptóticas, como la fragmentación del DNA en 180 a 200 pares de nucleótidos y la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular (Del Rio Ortiz, 2012), también se ha publicado que las células de Cáncer de Cérvix INBL y CALO poseen el receptor para IL-2, lo que nos hace suponer que posiblemente el receptor para IL-2 junto con los receptores de muerte de la familia de TNF como Fas, TRAIL y TNF estén siendo activados por IL-2 para iniciar la apoptosis vía extrínseca, provocando la activación de la caspasa 8, una caspasa iniciadora de cual se sabe que al adquirir su forma catalítica puede activar directamente caspasas efectoras (3, 6 y 7). En nuestro modelo hemos mostrado que IL-2 también activa caspasa 3 (Torres, 2012) que se sabe es la responsable de los cambios morfológicos y bioquímicos que presentan las célula en apoptosis.



Por otro lado, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo y los datos proporcionados por otros colegas podemos proponer que IL-2 está induciendo la muerte apoptótica de las líneas INBL y CALO por medio de un puente de unión entre la vía intrínseca y extrínseca mediado por Bid. Dicho puente se formaría cuando IL-2 al unirse a su receptor activara a caspasa 8 y una vez activa adquiriera su capacidad catalítica para hidrolizar a la proteína pro-apoptótica Bid. De esta manera Bid es translocada a la mitocondria, donde va a interactuar con otras moléculas como Bax y Bak para formar un poro de permeabilidad transitoria (PTPM) en la membrana mitocondrial, liberando moléculas como citocromo c, para formar el apoptosoma el cual activa a caspasas efectoras como caspasa 3, 6 y 7; la caspasa 3 es la encargada entre otras funciones de la inactivación proteolítica de proteínas que protegen las células de la apoptosis, una de estas es la ICAD, proteína que mantiene inhibida a CAD, nucleasa responsable de la degradación del ADN. En cuanto a caspasa 6 y 7 trabajan en conjunto ya sea entre ellas o en colaboración con caspasa 3; algunas de sus funciones en las que participan son en la degradación de moléculas involucradas en la regulación del citoesqueleto, como la gelsolina, la cinasa de adhesión focal y la cinasa 2 activada por p21. Además de que caspasa 6 en colaboración con caspasa 7 cortan las proteínas filamentosas que constituyen la lámina nuclear, estructura rígida que tapiza internamente la membrana nuclear, por lo que el corte de estas proteínas produce colapso de la lámina y contribuye a la condensación de la cromatina. Caspasa 6 junto con caspasa 3 puede estar relacionada con la degradación de algunas proteínas relacionadas con los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN (como ADN-PKC) y con el procesamiento del ARNm como la U1-70 K (Chowdhury, 2008).

A pesar de los aspectos moleculares que hemos demostrado es conveniente averiguar el tiempo de activación de la proteína Bid por IL-2 en cada línea celular de Cáncer de Cérvix, además de evaluar si Bid está activando a otras moléculas de la membrana mitocondrial como Bax y Bak, para corroborar la liberación de citocromo c por permeabilidad

transitoria mitocondrial (PTPM), además de SMAC/DIABLO que activa caspasas efectoras.

Finalmente se propone que IL-2 puede usarse como una alternativa terapéutica para el tratamiento en pacientes con Cáncer de Cérvix, al inducir muerte por apoptosis de tumores malignos sin importar el estadio clínico.

En base a lo anterior se diseñó un modelo hipotético de como IL-2 podría estar desencadenando muerte por apoptosis en las células de Cáncer de Cérvix INBL y CALO (Figura 21).

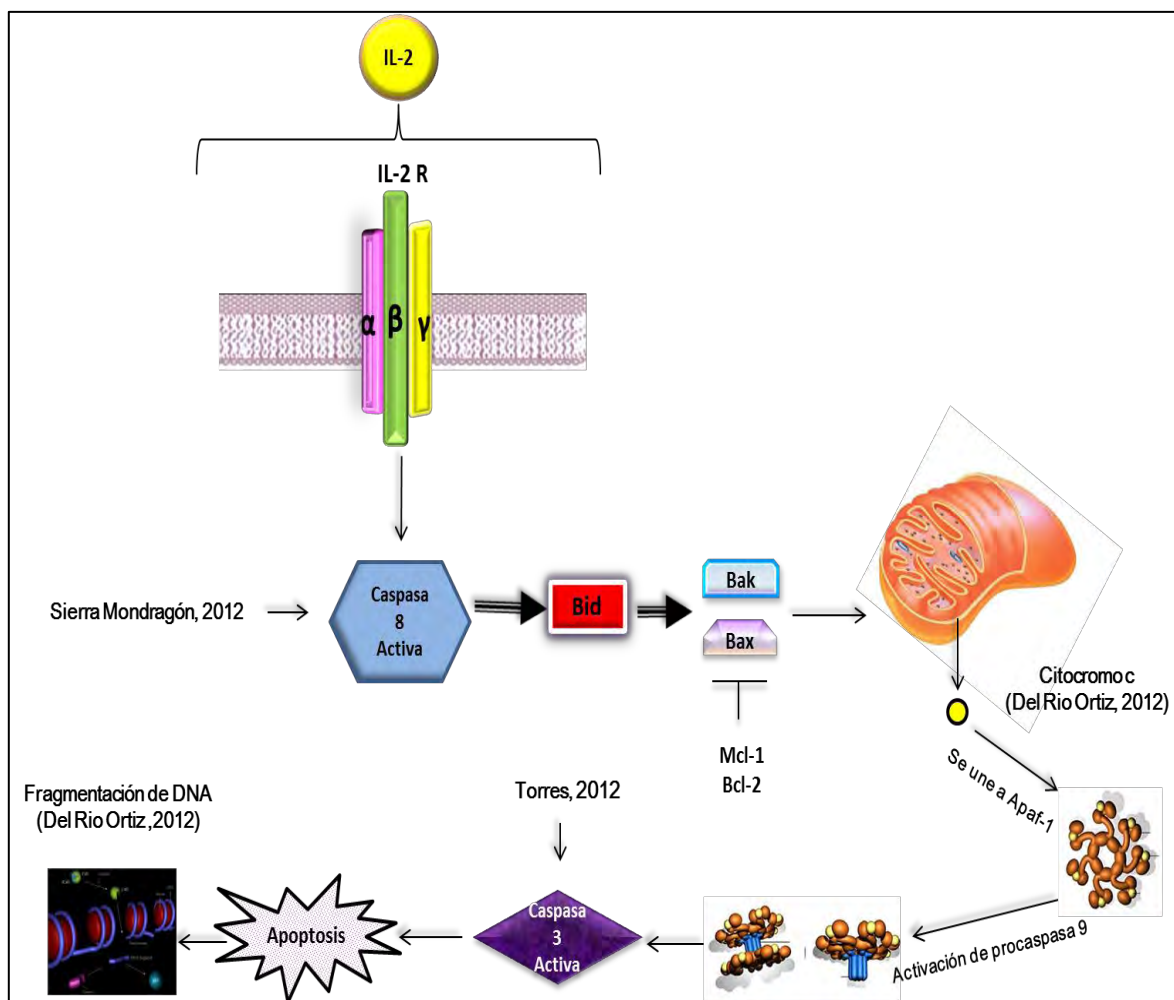


Figura 21. Modelo hipotético propuesto de la regulación de apoptosis por IL-2. La imagen muestra moléculas apoptóticas que IL-2 regula al alta en células de las líneas de Cáncer de Cérvix y el supuesto proceso apoptótico por el que IL-2 está llevando a cabo en células de las líneas INBL y CALO. **Realizado por Massé, 2012**



CONCLUSIONES

- 100 UI/mL de IL-2 regula positivamente la síntesis del mensajero para Bid en las células no sincronizadas y sincronizadas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO.
- IL-2 aumenta la expresión del ARNm para Bid en células sincronizadas y no sincronizadas de la línea celular CALO a las 2 horas de cultivo.
- IL-2 regula al alta la expresión de bid en células no sincronizadas de la línea INBL a las 72 horas de cultivo.
- IL-2 induce apoptosis en células no sincronizadas por la activación de Bid directamente proporcional al estadio de la línea celular de Cáncer de Cérvix.



PERSPECTIVAS

Para complementar los resultados obtenidos en este trabajo sería conveniente realizar las siguientes propuestas:

- Confirmar si IL-2 está induciendo la traducción de la proteína Bid en las líneas celulares de Cáncer de Cérvix INBL y CALO por medio de Citometría de Flujo.
- Determinar si IL-2 regula la expresión de moléculas implicadas en la permeabilización de la membrana mitocondrial como Bax y Bak.
- Comprobar si IL-2 está regulando la expresión de la molécula SMAC/DIABLO que es liberada junto con citocromo C con la permeabilización de la membrana mitocondrial.



BIBLIOGRAFIA

- Abe T, Kobayashi M, Araki K, et. al. 2002. Infantile convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* Vol. 22. Pág: 301-306.
- Alberts, B. et al. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona: Omega. pp 918.
- Alemán Escobar Ma. de Lourdes. 2007. Intervenciones de enfermería para la prevención del cáncer cérvicouterino (CaCU). *Boletín del Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud. INSP.* Pág: 1-6.
- Ali G, Boldrini L, Lucchi M et al. 2009. Treatment with interleukin-2 in malignant pleural mesothelioma: immunological and angiogenetic assessment and prognostic impact. *Br J Cáncer.* Vol. 101. Pág: 1869-1875.
- Alvarado, M.J.A. 1997. Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Anguiano Hernandez Y.M., Chartier A. y Huerta S. 2007. Smac/DIABLO and colon cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* Vol. 7. Pág: 467-473.
- Barros de Oliveira Caio Marcio, Kimiko Sakata Rioko, Machado Issy Adriana et. al. 2011. Artículo de revisión, Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología.* Elsevier. Vol.61. Núm. 2. Pág: 138-142.
- Billen LP, Shamas-Din A y Andrews DW. 2009. Review Bid: a Bax-like BH3 protein. Department of Biochemistry and Biomedical Sciences. *Oncogene.* McMaster University. Cánada. Vol.27. Pág: S93–S104.
- Bonet María Luisa, Ribot Joan y Andreu Palou. 2009. Citocinas y control metabólico. *Revista Española de Obesidad.* Laboratorio de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología (UIB), y CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. Palma de Mallorca (España). Vol. 7. Núm. 1. Pág: 22-47.



- Brandan Nora, Juaristi Julián, Aguirre Victoria, et. al. 2002. ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNNE. Universidad Nacional del Nordeste. Pág: 1- 12.
- Bras M., Clément M.V., Pervaiz S. et.al. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*. Vol. 20. Pág: 205-219.
- Breitschopf K., Zeiher A.M., Dimmeler S., 2000. Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction. *J. Biol. Chem*. Vol. 275. Pág: 21648–21652.
- Caceres Cortes J, Alvarado Moreno J, Waga K, et al. 2001. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res*. Vol. 61. Pág: 6281-6289.
- Cascales Angosto Maria. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Real Academia de Farmacia*. Vol. 69. Pág: 14.
- Chowdhury Indrajit, BinuTharakan, Ganapathy K. Bhat. 2008. Review Caspases, An update. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Elsevier. Vol. 151. Pág: 10-27.
- Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nat Rev Cancer*. Vol. 2. Pág: 647–656.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. 1999. *Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company. Philadelphia USA. Sixth edition. Pág: 18-25.
- Danial N.N. y Korsmeyer S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. Vol.116. Pág: 205-219.
- Degterev A. y Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev. Mol. Cell. Biol*. Vol. 9. Pág: 378-390.
- Díaz Martín David. 2006. Desarrollo de nuevas metodologías para la enumeración de células en cultivo y la cuantificación de la apoptosis. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá. Departamento de Medicina. Alcalá de Henares. Pág: 17-19.



- Ding, W.X., Ni, H.M., et. al. 2004. Bid dependent generation of oxygen radicals promotes death receptor activation induced apoptosis in murine hepatocytes. *Hepatology*. Vol. 40. Pág: 403–413.
- Dubin Marta, Stoppani O.M: Andrés. 2000. Muerte celular programada y apoptosis, función de las mitocondrias. *Medicina. UBA. Conicet*. Vol. 60. Núm. 3. Pág: 375-386.
- García Martínez Juan Manuel. 2007. Mecanismos intracelulares de supervivencia y muerte neuronal en modelos excitotóxicos y transgénicos de la enfermedad de huntington. Departamento de biología celular y anatomía patológica. Facultad de medicina. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Gogvadze V., Orrenius S. y Zhivotovsky B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *BiochimBiophys Acta*. Vol. 1757. Pág: 639-647.
- Janeway C., Travers P, Walport M. et. al. 2000. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Edit. Masson, Barcelona. Pág: 115-136.
- Jimenez C. Felipe, Merchant Horacio. 2003. *Biología celular y molecular*. 1a edición. Editorial Pearson Educación. Pág: 632.
- Jin Z, El Deiry WS.2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer BiolTher*. Vol. 4. Pág: 139–163.
- Kamer I., Sarig Rachel, Zaltsman Yehudit, et. al. 2005. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell*. Vol. 122. Pág: 593–603.
- Karp, G. 1998. *Biología Celular y Molecular: Conceptos y Experimentos*. México: McGraw-Hill Interamericana. Pág: 679-712.
- Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ.2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ. Gynecol Oncol. Institute of Pharmacology. University of Bern. Bern, Switzerland*. Vol. 126. Núm. 2. Pág: 291-303.
- Kerr J., Wyllie A., Currie A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. Vol. 26. Pág: 239-57.



- Kim T.H., Zhao Y., Barber M.J., et. al. 2000. Bid induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J. Biol. Chem.* Vol. 275. Pág: 39474–39481.
- Krantic S, Mechawar N, Reix S, et.al. 2005. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* Vol. 28. Pág: 670–676.
- Lizarbe Iracheta M^a Antonia. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* Vol. 101. Núm 2. Pág: 1-33.
- Lodish Harvey. 2006. *Biología Celular y Molecular.* 5^a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pág: 630.
- López Luna, López Armando, Díaz Guerrero Norma E., et. al. 2002. El fantástico Mundo de la proteína Bcl-2. *Revista de Educación Bioquímica. UNAM.* Vol. 27. Núm. 3. Pág: 93-102.
- López Saavedra A. y M. Lizano S. 2007. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología.* Vol. 1. Pág: 31-51.
- Malet Engra Gema. 2005. Identificación de moduladores del apoptosoma mediante química combinatoria. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia. Tesis doctoral. I.S.B.N. Pág: 1-13.
- Montalvo Gonzalo, Esquivel Jaime, Coronol Alberto, et. al. 2011. Cáncer cervicouterino. Instituto de Cancerologia.
- Orrenius S. 2007. Reactive oxygen species in mitochondria- mediated cell death. *Drug Metab Rev.* Vol. 39. Pág: 443-455.
- Plati Jessica, Octavian y Roya Khosravi Far. 2008. Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Institute of Biochemistry of the Romanian Academy. Bucharest, Romania. Vol. 104. Núm 4. Pág: 1124–1149.
- Raeburn C. D., Sheppard F., Barsness K. A. et al. 2002. Cytokines for surgeons. *Am J Surg.* Vol. 183. Pág: 268-273.
- Ribeiro Cubal Adelaide Fernanda, Ferreira Carvalho Joana Isabel, Martins Costa Maria Fernanda, et. al. 2012. Review Article Fertility-Sparing Surgery for Early-



Stage Cervical Cancer. International Journal of Surgical Oncology. Gynecology Department. Portugal. Vol. 2012. Pág: 1-11.

- Riedl S.J. y Salvesen G.S. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. Nat. Rev- Mol. Cell. Biol. Vol. 8. Pág: 405-413.
- Roittlvan. 1998. Inmunología, Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. 9ª Ed. Pág: 34, 78, 201 y 207.
- Salvesen Guy S., Duckett C.S. 2002. IAP proteins: Blocking the road to death's door. Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol. 3. Pág: 401-410.
- Sarig R., Zaltsman Y., Marcellus R.C., et. al. 2003. BID-D59A is a potent inducer of apoptosis in primary embryonic fibroblasts. J. Biol. Chem. Vol. 278. Pág: 10707–10715.
- Schiffman Mark, Wentzensen Nicolas, Sholomwacholder, et. al. 2011. Review Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical. Cancer Review. JNCI. Oxford University. Vol. 103.
- Schmitz I., Kirchhoff S., and Krammer P. H. 2000. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. Int. J. Biochem. Cell Biol. Vol. 32 Pág: 1123-1136.
- Sierra Mondragón Edith. 2011. Participación de caspasa 8 y 12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino, cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Song G., Chen G.G., Hu T., et. al. 2010. Bid stands at the crossroad of stress-response pathways. Curr Cancer Drug Targets. Cancer Research Center. Medical College. Xiamen University. China. Vol. 10. Núm 6. Pág: 584-92.
- Song P., Zhao Z.Q. and Liu X.Y. 2000. Expression of IL-2 receptor in dorsal root ganglion neurons and peripheral antinociception. Neuroreport. Vol. 11. Pág: 1433-1436.
- Thorburn C. 2004. Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics. Cardiol. Clin. Vol. 19. Pág: 31-43.
- Thornberry N.A., Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. Science. Vol. 281. Pág: 1312-1316.



- Tornero D., V. Ceña, C. González-García, et. al. 2002. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. Revista de neurología. Vol. 35. Núm 4. Pág: 354-361.
- Torres Corioriles Edgar Ivan. 2012. Interleucina 2 regula la expresión de la caspasa 3 en líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKI, CALO, INBL, SIHA. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Van Loo G., Schotte P., Van Gurp M., et. al. 2001. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. Cell Death Differ. Vol. 8. Núm. 12. Pág: 1136–1142.
- Vega Robledo Gloria Bertha. 2010. Citocinas. Inmunología para el médico general. Departamento de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. UNAM. Rev. Fac. Med. UNAM. Vol. 53. Núm. 2.
- Yin Xiao-Ming. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. Department of Pathology. University of Pittsburgh School of Medicine. Elsevier. United States. Gene. Vol. 369. Pág: 7–19.
- Zhao Y., Li S., Childs E.E, et. al. 2003. Activation of pro-death Bcl-2 family proteins and mitochondria apoptosis pathway in tumor necrosis factor-alpha-induced liver injury. J. Biol. Chem. Vol. 276. Pág: 27432–27440.
- Zinkel S.S., Hurov K.E., Ong C., et. al. 2005. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. Cell. Vol. 122. Pág: 579–591.

ANEXO I.

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR.

a. Retrotranscripción:

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (controles y Estimuladas). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$1 \mu\text{g} / \mu\text{L} = [(\text{Absorbancia } 260) (\text{Volumen de la disolución}) (40)]/1000$$

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro.

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 4:200 en un volumen de 200µL.

40: Unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40µg/mL del biofotómetro.

Teniendo los cálculos de todas las muestras, y partiendo de 2µg de RNAm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), (Tabla 5). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (3 controles y 3 tratamientos) y se incluyó para cada línea un control con camptotecina:

REACTIVOS	1 RX	4RX (controles)	3 RX (estimulo)
Amortiguador 5x ^(INVITROGEN, USA)	5 µl	20 µl	15 µl
DNTP's (Desoxirribonucleótidostrifosfato) (INVITROGEN, USA) 5µM	1.5 µl	6 µl	4.5 µl
Enzima MMLV (RT) ^(INVITROGEN, USA)	1 µl	4 µl	3 µl
Oligo DT ^(PROMEGA, USA)	1.8 µl	7.2 µl	5.4 µl
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS, USA)	X µl	X µl	X µl
Muestra (2µg /mL)	X µl	X µl	X µl
Volumen Total	24 µl	120 µl	96 µl

Tabla 5. Condiciones para RT.

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con los cDNA obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren para cada línea celular tanto de células sincronizadas como de no sincronizadas se realizó lo mismo (Tabla 6), para cada primer utilizado en el presente estudio (β -actina, Bid).

Reactivos	1 Rx	7 RX β - actina	7 RX BID
Amortiguador 5x Green ^(PROMEGA, USA)	6 μ l	42 μ l	42 μ l
DNTP 's 10 Mm ^(INVITROGEN, USA)	0.8 μ l	5.6 μ l	5.6 μ l
Enzima GoTaq Polimerasa ^(INVITROGEN, USA)	0.15 μ l	1.05 μ l	1.05 μ l
Primer 1 (Sentido) ^(UNIPARS, S.A.)	1 μ l	7 μ l	7 μ l
Primer 2 (Antisentido) ^(UNIPARS, S.A.)	1 μ l	7 μ l	7 μ l
Agua libre de RNAsas ^(FERMENTAS, USA)	7.05 μ l	49.35 μ l	49.35 μ l
Muestra de cDNA	4 μ l	28 μ l	28 μ l
Volumen Total	20 μ l	140 μ l	140 μ l

Tabla 6. Condiciones para cada reacción en la técnica PCR.

ANEXO II.

Reactivos y Soluciones Utilizados.

▪ Soluciones para cultivo

RPMI-1640/10% SFB

Solución fisiológica de verseno

Solución de Fosfatos (PBS)

▪ Reactivos Extracción ARN Total

Trizol^(INVITRÓGEN, USA)

Cloroformo

Isopropanol

Etanol 70%

H₂O inyectable

H₂O libre de RNAsas

▪ Reactivos Retrotranscripción (RT)

Amortiguador 5X^(INVITRÓGEN, USA)

Enzima MMLV-RT^(INVITRÓGEN, USA)

DNTP'S 5mM^(INVITROGEN, USA)

Oligo dT^(PROMEGA, USA)

H₂O libre de RNAsas^(FERMENTAS, USA)

▪ Reactivos (PCR)

Amortiguador 5X Green GoTaq^(PROMEGA, USA)

DNTP'S 10 mM^(INVITROGEN, USA)

Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5U/ L
(Invitrogen)

Primers: β - actina (1:5), bid (1:5)^(Unipars S.A)

H₂O libre de RNAsas^(FERMENTAS, USA)

▪ Electroforesis

Agarosa^(Invitrogen)

TBE 10X, 1X, 0.5 X

Gel de agarosa al 1.5%

Marcador de peso molecular

Buffer de carga Blue/Yellow 6X^(PROMEGA, USA)

Bromuro de etidio



ANEXO III.

Preparación de Reactivos y Soluciones

▪ Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El Suero Fetal Bovino (GIBCO, Life Technologies) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

▪ Solución fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares.

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias.

- Tris base 3.04 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Cloruro de sodio 800 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.40 gramos g (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.20 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)

Nota: El pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

▪ Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

- Cloruro de sodio 8.0 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Fosfato de sodio monobásico 2.88 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Fosfato de potasio 0.4 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)



- Cloruro de potasio 0.20 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

- **DNTPS 10 mM (MIX)**

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

- A 100 μ l (Invitrogen S.A de CV)
- G 100 μ l (Invitrogen S.A de CV)
- T 100 μ l (Invitrogen S.A de C.V)
- C 100 μ l (Invitrogen S.A de C.V)

Estos se diluyen en 600 μ l de agua libre de Rnasas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

- **TBE 10X**

- Tris base 108 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- Ácido bórico 55 gramos (Sigma Chemical Co. U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 mL. (Sigma Chemical Co. U.S.A)

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se almacena a Temperatura Ambiente hasta su uso.

- **TBE 1X**

Tomar 50 mililitros de TBE 10X y diluirlo en 450 mililitros de agua destilada.

- **TBE 0.5X**

Tomar 250 mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250 mililitros de agua destilada.