

00345

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

2

DETERMINAR LA PRESENCIA DE c-Kit EN CELULAS
DE CARCINOMA DE CERVIX Y SU PAPEL EN LA
ACTIVACION DEL RIL-2.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
BIOLOGIA CELULAR**
P R E S E N T A
BIOL. JOSE ANTONIO ALVARADO MORENO

288588



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER (LABORATORIO DE
ONCOLOGÍA) DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE**

**DR. JULIO R. CACERES CORTES.
Y
M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA.**

**DURANTE LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTO CON EL
APOYO ECONÓMICO DE LA DIRECCIÓN DE ASUNTOS DEL PERSONAL
ACADÉMICO DGAPA CON EL PROYECTO IN227198; Y DEL CONACYT CON
EL PROYECTO 27880-M.**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Julio R. Cáceres Cortés

A la M. en C. Rosalva Rangel Corona

Por su excelente asesoría...

Al Dr. Benny Weiss Steider

A la Dra. María Isabel Soto Cruz

A la Dra. Rebeca López Marure

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta

*Por la revisión de este trabajo, sus acertadas observaciones y por sus
invaluables consejos...*

Al Sr. José Chavarría

Por su valiosa asistencia técnica.

A mis amigos y compañeros del laboratorio.

A Dios...

A mis padres:

Ma. Del Carmen Moreno y Aarón Alvarado

Por su invaluable apoyo cariño y comprensión siempre presentes.

A María Antonieta:

**Esencia de mi vida,
y a quien hoy dedico mi esfuerzo.**

A mis hermanos:

Enrique †

y

Arturo

A todos mis familiares y amigos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Aa	Amino ácidos
ATP	Adenosin trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
CFU-E	Unidades Eritroides Formadoras de Colonias
CSF-1R	Receptor transmembranal para factor estimulante de colonias-1
EpO	Eritropoyetina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HPV	Papiloma Virus Humano
hrIL-2	Interleucina-2 recombinante humana
IL-2	Interleucina-2
JAK	Cinasa Janus (Por sus siglas en inglés Janus Kinase)
KL	Ligando de Kit
LAM	Leucemia mieloide aguda
LGL	Linfocitos granulares largos
LSP	Linfocitos de sangre periférica
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno (por sus siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinase)
MGF	Factor de crecimiento de células madre
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tioazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NBT	Azul de tetrazolio
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	Asesinas naturales
OPD	O-fenil-diamina
P	Prolina
PDGF- α	Receptor para factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa
PHA	Fitohemaglutinina
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa
PLC γ -1	Fosfolipasa C gama-1
PTK	Proteína tirosina cinasa
PTP	Proteína tirosina fosfatasas
REpO	Receptor de la Eritropoyetina
RIL-2	Receptor de la Interleucina-2
RTK III	Receptor de tirocina cinasa tipo 3
S	Serina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SF	Factor Steel
SFB	Suero fetal de bovino

SFm	Factor Steel membranal
STATs	Transductores de señales y activadores de la transcripción
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Tir	Tirfostina
TNF-α	Factor necrótico tumoral alfa
UI	Unidades Internacionales

ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Marco teórico.....	5
3.1. Cáncer cérvico-uterino.....	5
3.2. La Interleucina 2 (IL-2).....	6
3.3. Receptor de la IL-2 (RIL-2).....	7
3.3.1. Cadena β del receptor de la IL-2 (RIL-2 β).....	9
3.4. La IL-2 y el RIL-2 en células tumorales.....	11
3.5. Transducción de señales inducida por la IL-2 en linfocitos T.....	12
3.5.1. Activación de Shc e inducción de la vía de Ras.....	12
3.5.2. La vía de la fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3-K).....	13
3.5.3. La vía JAK-STAT.....	14
3.6. El receptor c-Kit.....	14
3.7. El Factor Steel (SF).....	17
3.7.1. Distribución celular del receptor c-Kit.....	19
3.8. Transducción de la señal c-Kit/SF.....	20
3.9. El receptor c-Kit en células tumorales.....	20
3.9.1. Alteraciones del receptor c-Kit.....	21
3.9.2. Expresión de c-Kit y SF durante el desarrollo.....	22
3.10. Apoptosis.....	23
4. Justificación y planteamiento del problema.....	27
5. Hipótesis.....	28
6. Objetivo general.....	29
6.1. Objetivos particulares.....	29
7. Materiales y métodos.....	30
7.1. Material biológico.....	30
7.2. Cultivos celulares.....	30
7.3. Disgregación mecánica y enzimática.....	31
7.4. Concentración del medio condicionado.....	32

	Página
7.5. Ensayo de ELISA para determinar el SF soluble.....	32
7.6. Obtención de linfocitos.....	33
7.7. Determinación de la presencia de c-Kit y SF membranal.....	34
7.8. Inducción del receptor c-Kit por la IL-2.....	34
7.9. Proliferación de CALO e INBL en presencia de la IL-2, SF e inhibidores de cinasas.....	35
7.10. Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos.....	35
7.11. Análisis de proteínas fosforiladas en tirosina inducidas por la IL-2 y SF.....	36
7.12. Inmunoprecipitación del RIL-2 β y c-Kit en presencia de la IL-2 y SF.....	37
7.13. Electroforesis (SDS-PAGE).....	37
7.14. Western-Blot.....	38
7.15. Reacción TUNEL.....	39
7.16. Análisis estadístico.....	40
8. Resultados.....	41
8.1. Detección de c-Kit y SF membranal.....	41
8.2. Respuesta biológica al SF.....	43
8.3. Inducción de la expresión del receptor c-Kit por la IL-2.....	45
8.4. Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos.....	47
8.5. Inhibición de la proliferación celular por tirfostinas.....	49
8.6. Cinética de fosforilación en tirosinas inducidas por la IL-2 y SF.....	51
8.7. Identificación del receptor c-Kit y del RIL-2 β	54
8.8. Inhibición de la fosforilación de la cinasa c-Kit por la tirfostina B-42.....	56
8.9. Inhibición de la fosforilación del RIL-2 β a través de c-Kit por la tirfostina B42.....	57
8.10. El SF inhibe el proceso de apoptosis.....	60
9. Discusión de resultados.....	61
10. Conclusiones.....	70
11. Principales contribuciones.....	71
12. Bibliografía.....	72

13. Apéndice.....	87
13.1. Solución salina de verseno.....	87
13.2. Preparación del colorante azul de tripano.....	87
13.3. Solución amortiguadora de fosfatos (SAF).....	87
13.4. Tripsina.....	88
13.5. Amortiguador de carbonatos.....	88
13.5.1. Amortiguador de citratos.....	88
13.6. Estructura molecular de las tirfostinas.....	89
13.7. Solución de lisis.....	90
13.7.1. Inhibidores de proteasas.....	90
13.7.2. Cuantificación de proteínas.....	90
13.7.3. Amortiguador de la muestra o Laemmli.....	91
13.7.4. Incubación de la proteína A sefarosa con los anticuerpos.....	91
13.7.5. Amortiguador de inmunoprecipitación.....	91
13.7.6. Amortiguador de lavado.....	92
13.7.7. Amortiguador AP (Fosfatasa Alcalina).....	92
13.7.8. BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato).....	92
13.7.9. NBT (azul de tetrazolium).....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Fig. 1. Esquema de las tres subunidades del receptor para la IL-2.....	8
Fig. 2. El receptor c-Kit.....	16
Fig. 3. Forma soluble y transmembranal de SF humano.....	18
Fig. 4. Co-expresión del c-Kit y el SFm en líneas celulares de carcinoma cérvico-uterino.....	42
Fig. 5. Expresión de SF soluble.....	43
Fig. 6. Efecto de la IL-2 y SF en la proliferación de las células CALO.....	44
Fig. 7. Efecto de la IL-2 y SF en la proliferación de las células INBL.....	45
Fig. 8. Inducción del receptor c-Kit por la IL-2 en las células CALO.....	46
Fig. 9. Inducción de receptor c-Kit por la IL-2 en las células INBL.....	46
Fig. 10. Inhibición de la proliferación de las células CALO por anticuerpos neutralizantes.....	47
Fig. 11. Inhibición de la proliferación de las células INBL por anticuerpos neutralizantes.....	48
Fig. 12. Efecto de inhibidores de proteínas tirosina cinasas en la proliferación de las células CALO.....	50
Fig. 13. Efecto de inhibidores de proteínas tirosina cinasas en la proliferación de las células INBL.....	50
Fig. 14. Comparación del patrón de fosforilación en tirosinas inducida por la IL-2 y SF en las células CALO.....	52
Fig. 15. Comparación del patrón de fosforilación en tirosinas inducida por IL-2 y SF en las células INBL.....	53
Fig. 16. Detección del RIL-2 β en las células CALO e INBL.....	55
Fig. 17. Detección del receptor c-Kit en las células CALO e INBL.....	55
Fig. 18. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Kit por tirfostinas en las células CALO.....	56
Fig. 19. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Kit por tirfostinas en las células INBL.....	57
Fig. 20. Inhibición de la fosforilación de RIL-2 β por tirfostinas en células CALO.....	58
Fig. 21. Inhibición de la fosforilación de RIL-2 β por tirfostinas en células INBL.....	59
Fig. 22. El oligonucleótido antisentido de SF induce apoptosis en las células CALO e INBL.....	60
Fig. 23. Estructura molecular de las tirfostinas.....	89

1. RESUMEN

Se ha demostrado que el Factor Steel (SF) es un estimulador de la supervivencia, proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, melanocitos y células germinales. Ejerce su función al interactuar con el receptor de tipo tirosina cinasa c-Kit. La activación del receptor c-Kit ha sido detectada en diversos tipos de cáncer no hematopoyético como: cáncer de colon, seminoma, cáncer cervical y pulmón. c-Kit colabora en la estimulación de la proliferación de unidades eritroides formadoras de colonias (CFU-E) a través de la fosforilación en tirosina de la cadena β del receptor de eritropoyetina (REpO) que es homóloga a la cadena β del receptor para la interleucina 2 (RIL-2 β).

En el presente estudio se trabajó con dos líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (CaCu) CALO e INBL en las que se ha encontrado la presencia de HPV18 y el RIL-2 β , detectándose que c-Kit esta presente en ambas líneas. Dado que el c-Kit y el RIL-2 se expresan en estas dos líneas, se postuló que ambos receptores podrían colaborar en la proliferación celular mediante la fosforilación de la cadena β del RIL-2 mediada por el c-Kit. Se determinó la expresión del SF membranal (SFm) y del c-Kit por medio de citometría de flujo, así como la presencia del SF soluble en el sobrenadante de las células mediante ensayos de ELISA. El efecto biológico del SF y la IL-2 se observó por incorporación de timidina tritiada, que a una concentración de 10 ng/ml, SF puede estimular la proliferación celular y la co-estimulación con SF/IL-2 tiene un efecto aditivo. Por citometría de flujo también se demostró que la IL-2 exógena puede inducir la expresión de c-Kit a las 48 hrs en CALO y a las 24 hrs en INBL.

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal anti c-Kit disminuyó la tasa de proliferación, evaluada por la técnica de MTT, hasta en un 60%, tal como se observó al bloquear la cadena β del RIL-2. De igual manera se observó que el anticuerpo monoclonal anti SF induce una disminución de la proliferación hasta en

un 50%. Se determinó mediante inmunoprecipitación de c-Kit, SDS-PAGE y Western Blot que a 10 μ M, el inhibidor específico de la cinasa c-Kit, la Tirfostina B42 (Tir B42), puede bloquear c-Kit impidiendo la fosforilación de la cadena β del RIL-2 y reprimir la proliferación. También se demostró que la máxima fosforilación en tirosina con 10 ng/ml de SF se logra a los 2 minutos para las células CALO y a los 3 minutos para las INBL. Finalmente se determinó mediante la reacción TUNEL, la participación de SF en la supervivencia celular, ya que al utilizar un oligonucleótido antisentido de SF, éste promueve la apoptosis de las líneas celulares de CaCu.

Se describe aquí a la cadena β del RIL-2 como un nuevo sustrato para c-Kit, cuya activación puede afectar la proliferación celular de líneas que expresan ambos receptores como linfomas y carcinoma cervical, en donde c-Kit podría conferir sobrevivencia y sostener la proliferación de linajes. Esta es información valiosa sobre la regulación del microambiente celular normal y en el proceso neoplásico.

2. INTRODUCCIÓN

La investigación desarrollada en diferentes áreas del conocimiento, como la biología molecular, ha permitido la caracterización de numerosas proteínas, las cuales forman parte de una clase de mediadores intercelulares conocidos como citocinas, que son secretadas en respuesta a estímulos específicos. Las citocinas actúan como hormonas ya que pueden tener un efecto pleiotrópico sobre diversos tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo, pero también tienen efecto autócrino, es decir son producidas y utilizadas por la misma célula a través de sus receptores, características que son de gran utilidad en la investigación (Kaplan, 1996).

En los últimos años se ha avanzado enormemente en el estudio de los receptores membranales (Watowich, 1996), y recientemente se ha podido caracterizar su estructura molecular, lo que ha facilitado el conocimiento de los mecanismos fundamentales de transducción de señales. Los receptores unidos a su proteína específica (ligando) inician una cascada de eventos de señalización intracelular destinados a conducir el mensaje externo. Tales estudios son de valor práctico, ya que nos muestran como los receptores de citocinas modulan importantes funciones biológicas, y de como las interacciones proteína-proteína ubicuas forman parte en eventos cruciales del proceso de regulación celular. Actualmente se sabe que las citocinas actúan a través de sus receptores específicos membranales, modulando el metabolismo celular; estos receptores funcionan como máquinas sensoriales que conducen señales externas hacia el interior de la célula, efecto que produce cambios metabólicos, inducción de genes y alteraciones estructurales dando como consecuencia eventos de proliferación, diferenciación, biosíntesis macromolecular y supervivencia celular (Taniguchi, 1993; Waldmann, 1993; Wells, 1996).

Sin embargo, aunque las consecuencias biológicas de la estimulación de los factores de crecimiento mediadas por su receptor pueden ser diferentes en algunos tipos celulares, la supervivencia es la función común en todas las células

después de la unión a éstos, ya que algunas producen una respuesta positiva en la proliferación como la Interleucina 2 (IL-2) y el Factor Steel (SF), o negativa como el Interferón. Asimismo, se ha encontrado que con un 5-10% de interacción de los receptores es suficiente para observar un efecto particular, y una alta o baja concentración puede afectar la intensidad y calidad del efecto.

De acuerdo a su importancia en las actividades fisiológicas celulares normales, los receptores juegan un papel fundamental en el aspecto biológico de ciertos cánceres humanos. Por esta razón han sido incluidos en protocolos de investigación básica y clínica para evaluar su eficiencia en el tratamiento del cáncer, con el propósito de ofrecer otras alternativas terapéuticas a los pacientes que lo sufren. El objetivo es el de conocer el papel de los receptores de citocinas en los mecanismos de señalización y proliferación neoplásica, que utilizan las células tumorales (Yannelli, 1991).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CÁNCER CÉRVICO UTERINO

El cáncer cervical constituye un problema importante de salud pública en la mujer y es el más común en el mundo, después del cáncer de mama. Aproximadamente el 80% de los 500,000 casos que se calcula se presentan anualmente en el mundo, corresponde a los países en desarrollo (Muñoz, 1997). En México es una de las principales causas de muerte en la mujer, registrándose más de 4,000 muertes anuales por esta enfermedad. A pesar de los programas de detección implementados, la incidencia de nuevos casos es muy alta debido principalmente a que las mujeres acuden tardíamente al médico y el tumor es detectado en estadios avanzados (Lazcano, 1996).

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del cáncer cérvico-uterino (CaCu), lo cual ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología. El cáncer de cérvix tiene un origen multifactorial, en el cual los más importantes factores de riesgo, propuestos o establecidos, indican que está asociado con el uso de tabaco, multiparidad, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, higiene genital deficiente, amplio número de compañeros sexuales, uso de anticonceptivos orales, dieta deficiente en frutas y vegetales, bajo consumo de vitamina C, β -carotenos y folatos. Asimismo, se ha detectado que el CaCu está asociado estrechamente con una etiología viral, en particular con el virus de papiloma, el Herpesvirus y en menor grado el Citomegalovirus. De más de 80 subtipos de virus de papiloma humano (HPV), alrededor de 30 de ellos se asocian con infecciones genitales, encontrándose con mayor frecuencia los tipos 16 y 18 que pueden inducir o no a una transformación de células epiteliales del cérvix denominada

NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) y poder transformarse a cáncer *in situ* y este a su vez a cáncer invasor (Brinton, 1992; Pontén, 1995; Bosch, 1995).

3.2. LA INTERLEUCINA 2 (IL-2)

En los últimos años se ha adquirido un mayor conocimiento, acerca de una familia de proteínas involucradas en la cascada de comunicación intercelular del sistema inmune. Estas sustancias son las citocinas, que están involucradas en una serie de eventos de interacción celular en el sistema inmune. Entre ellas se encuentra la IL-2, una proteína producida por linfocitos de sangre periférica, que induce la proliferación de linfocitos T estimulados con antígeno, además de modular *in vitro* e *in vivo* diversas funciones en células del sistema inmune (Aggarwal, 1992). Son limitados los tipos celulares que producen la IL-2, entre ellos podemos mencionar a las células T CD4 (Th1) y en menores proporciones las células T CD8 (Coventry, 1996).

La IL-2 promueve la progresión de linfocitos T a través de la fase G1 del ciclo celular aumentando el pH intracelular, induce la expresión de su receptor (RIL-2) y la de los genes *c-myc* y *c-myb* entre otros. Estimula la actividad citotóxica y la producción de citocinas en las que se incluye el Interferón- γ . También promueve la proliferación de Linfocitos Granulares Largos (LGL), incrementa la actividad de células asesinas naturales (NK), la proliferación de monocitos, células B activadas, células oligodendrogiales además de que ha sido considerado como un estimulador del cerebro (Ciacci, 1993; Nistico, 1991).

Se ha demostrado que la IL-2 puede actuar negativamente en la regulación de la muerte celular de los linfocitos T, lo cual sugiere que la IL-2 libera varias señales a través de su receptor en un amplio rango de tipos celulares, vía una interacción con su receptor (Lenardo, 1991).

El efecto de la IL-2 no se limita a poblaciones de células inmunes, ya que se ha descubierto que regula la proliferación y la expresión del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) y la lectina mac-2 en líneas epiteliales intestinales de

ratas pequeñas, mostrando en un modelo *in vivo*, que la IL-2 producida por la mucosa intestinal incrementa la migración celular epitelial, lo cual sugiere que ésta tiene un papel importante en la reconstitución epitelial y cicatrización cuando se presentan heridas intestinales, inflamaciones, infecciones y radiaciones (Dignass, 1996).

Otros de los efectos de la IL-2 son su capacidad antiviral, presenta un papel importante en el rechazo de injertos y debido a que es considerado un potente activador de células inmunocompetentes, ha sido empleada durante los últimos años en importantes protocolos de tratamientos clínicos, con el propósito de estimular y mantener la actividad de células citotóxicas en enfermedades malignas, particularmente en carcinoma renal (Rosenberg, 1989) y melanoma maligno (Rosenberg, 1987), en donde se han obtenido resultados interesantes de rechazo tumoral (Smith, 1989; Waldmann, 1984). Se sabe que estos mecanismos de respuesta están mediados a través del receptor para la IL-2.

3.3. RECEPTOR DE LA IL-2 (RIL-2)

El receptor para la IL-2 (RIL-2) es un complejo protéico formado por tres subunidades o cadenas conocidas como α de 55 kDa (p55), β de 75 kDa (p75) y γ de 64 kDa (p64), las cuales se expresan unidas no covalentemente en la superficie de linfocitos T, B, NK, macrófagos y monocitos (Waldmann, 1993). La cadena α no lleva a cabo ninguna señal de activación intracelular, ya que presenta un dominio citoplásmico de 13 amino ácidos (aa). Sin embargo, es importante en la interacción con su ligando (IL-2). Al asociarse las cadenas β y γ forman un complejo de alta afinidad (Fig. 1). Debido al gran dominio citoplásmico y las regiones ricas en serina, treonina, ácido y la asociación de JAK 1 que presenta la cadena β , y la asociación de γ con JAK 3, pueden activar la cascada de señalización intracelular como consecuencia de la interacción con su ligando, la cual permite la activación de diferentes genes que inducen la expresión y síntesis

de la IL-2, así como de su receptor, que son necesarios para la proliferación y diferenciación celular.

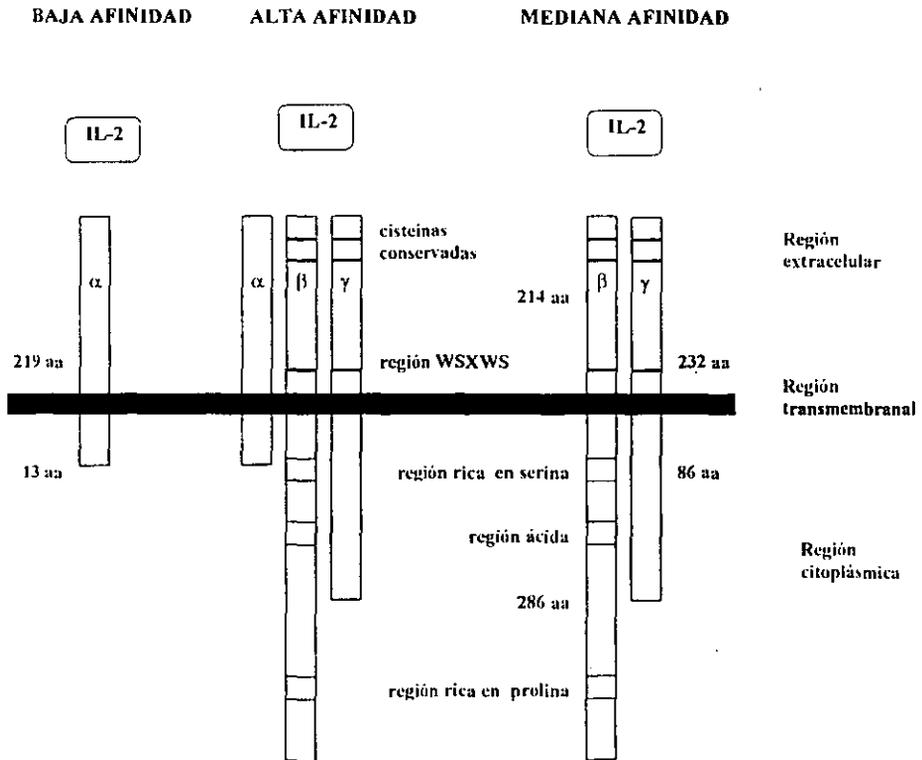


Fig. 1. Esquema de las tres subunidades del receptor para la IL-2. Baja afinidad: formada por la cadena α ; alta afinidad: cadenas α , β y γ ; afinidad intermedia: cadenas β y γ . Las cadenas β y γ son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, con cuatro cisteínas conservadas (dos pares de barras) y una región Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). Los tamaños de los dominios de aminoácidos (aa) citoplásmicos y extracelulares se muestran para cada cadena. En la región citoplásmica de la cadena β se observan las regiones ricas en serina, prolina y la región ácida, involucradas en la transducción de la señal intracelular (Tomado de Warren, 1996).

Asimismo, el RIL-2 se ha detectado en células normales no hematopoyéticas como queratinocitos, células intestinales, oligodendrocitos, células de origen nervioso, células endoteliales de cordón umbilical, fibroblastos de médula ósea, fibroblastos embrionicos humanos y células pituitarias, lo cual habla de la gran importancia de este receptor en la activación y diferenciación celular (Arzt, 1992; Thèze, 1996).

3.3.1. CADENA β DEL RECEPTOR DE LA IL-2 (RIL-2 β)

El RIL-2 β juega un papel importante en la transducción de señales mitóticas inducidas por la IL-2 en líneas celulares hematopoyéticas (Minami, 1993). Es una proteína transmembranal que consiste de 551 aa, presenta una secuencia señal seguida de 525 residuos de aa que forman la proteína madura del RIL-2 β . En esta cadena, las regiones de los aa 214, 25 y 286 constituyen la región de membrana extracelular, transmembranal y citoplásmica respectivamente; esta última región es más grande que la del RIL-2 α y del RIL-2 γ , pero no contiene ninguna región de cinasas aparente (Hanks, 1988; Thèze, 1996). Esta región es rica en prolina (24/286) y residuos de serina (30/286), y está notablemente inclinada o torcida por los aminoácidos cargados negativamente (40 aa constituidos por ácido glutámico y aspártico), y sólo 18 aa cargados positivamente (lisina y arginina). Esta inclinación es particularmente evidente en la porción media de esta región (345-390 residuos de aa) (Caligiuri, 1990). La región citoplásmica del RIL-2 β puede ser dividida en tres subregiones en función de la composición de aa. Estas subregiones han sido designadas como la "región rica en serina (S)", la "región ácida (A)" y la "región rica en prolina (P)" (Hatakeyama, 1991). La región ácida es responsable de la asociación física con la p56^{lck} y conduce a la inducción de los genes *c-fos* y *c-jun* (Shibuya, 1992). La región S se asocia con la proteína tirosina cinasa de la familia Janus (PTK) JAK-1 y ésta a su vez a la JAK-3; aunque

la regulación de los genes *bag-1* y *bcl-2* que contribuye a la supresión de la apoptosis, inducidos por la IL-2 es mediada por una vía de señalamiento independiente de la JAK. Sin embargo, la inducción de ambos genes requiere de la región S de la cadena del RIL-2 β (Kawahara, 1995; Adachi, 1996).

El gene del RIL-2 β consta de 10 exones y 9 intrones empalmados en 24 kb en el cromosoma 22q. La forma madura del RIL-2 β , de acuerdo a la secuencia de nucleótidos consiste de 525 residuos de aa, pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas en la que se encuentra el receptor de eritropoyetina (REpO) con un factor común de dos pares de residuos de cisteína conservados cerca de la región amino terminal y una región conocida como WSXWS que consiste de los aa triptófano-serina-X-triptófano-serina, en donde X corresponde a cualesquiera aa en el dominio extracelular (Bazan 1990a). La región WS es importante para la unión al ligando y la transducción de la señal, que a su vez son factores para la formación del RIL-2 funcional. Ya que se ha reportado que mutaciones puntuales en el sitio de la región WS del RIL-2 β disminuye su capacidad de unión a la IL-2 (Miyazaki, 1991). El dominio citoplásmico que consiste de 286 residuos de aa, es suficientemente largo para contribuir a la transducción de la señal intracelular. Este dominio contiene una región que está involucrada en la transducción de la señal, y las regiones Box1 y Box2 ricas en treoninas y serinas. Además se ha demostrado que la transfección de la cadena β en células linfoides induce la expresión de un receptor funcional de afinidad intermedia y con actividad transduccional (Bazan, 1990b; Fung, 1991). Los residuos de aa que rodean a la leucina se encuentran conservados en la cadena β del RIL-2 de humano, ratón y del receptor para Eritropoyetina (REpO) (Dändrea, 1989; Hatakeyama, 1992). Por lo que la cadena β muestra gran homología con la correspondiente región del REpO (Miura, 1991).

3.4. LA IL-2 y EL RIL-2 EN CÉLULAS TUMORALES

Recientemente se ha reportado que el RIL-2 no es exclusivo de células hematopoyéticas o células normales no hematopoyéticas, como las del páncreas y fibroblastos de pulmón. Existen reportes de la presencia del RIL-2 en células neoplásicas tanto en líneas linfoides como en tumores sólidos humanos. La expresión de las cadenas α y β del RIL-2 han sido reportadas *in vitro* en fibrosarcomas humanos, fibroblastos de médula ósea, piel, carcinoma de pulmón, cáncer de mama, melanomas y carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Han, 1996).

En el caso de las células tumorales se ha observado una abundante expresión de la cadena β del RIL-2 y muy baja de la cadena α (Yasumura, 1994). Por su parte, la cadena γ ha sido detectada en algunas líneas celulares de melanoma, carcinoma escamoso de cabeza, cuello (Weidmann, 1992; Plaisance, 1993) y en células epiteliales intestinales (Dignass, 1996). Recientemente nuestro grupo de trabajo ha detectado la presencia de las cadenas α , β y γ en líneas celulares de carcinoma de cérvix en estadios avanzados (Alvarado, 1997; Rangel-Corona, 1998; Soto-Cruz, 1998).

La expresión de las cadenas β y γ del RIL-2 en las células tumorales de carcinoma de mama, pulmón, colorectal y melanoma, sugieren que éstas son capaces de producir la IL-2, y que por medio de ésta se lleve a cabo un mecanismo autócrino de su proliferación (McMillan, 1995). Asimismo, se ha observado que al dirigir un anticuerpo específico contra la cadena β del RIL-2, las células tumorales disminuyen su tasa de proliferación como lo observado en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL (Alvarado, 1997). Debido a esto se sugiere que la expresión de la cadena β es necesaria para el crecimiento celular del tumor, y que la IL-2 endógena puede estar involucrada en esta

proliferación, ya que se ha demostrado que es biológicamente activa (Alilèche, 1993)

Se ha observado que la IL-2 y otras citocinas como la IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9 e IL-15, requieren de la cadena β del RIL-2 que se expresa en células tumorales para inducir su proliferación (Johnston, 1994). La importancia biológica de la presencia del RIL-2 en células no hematopoyéticas aún no se esclarece, no obstante, algunos estudios indican que la IL-2 exógena puede inhibir parcialmente el crecimiento de líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello (Weidmann 1992) y cervix (Alvarado, 1997) lo cual sugiere una saturación de los receptores, y una acelerada inducción de la muerte celular programada (apoptosis). Por lo tanto, el mecanismo del efecto antiproliferativo mediado por la IL-2 en células tumorales que presentan el RIL-2 no está totalmente claro (Lin, 1995). Sin embargo, esto podría estar relacionado con la cascada de señalización intracelular.

3.5. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDA POR LA IL-2 EN LINFOCITOS T

La heterodimerización de las subunidades β y γ del RIL-2 induce eventos de señalización que involucran la fosforilación de tirosinas de un amplio grupo de proteínas celulares. El complejo del RIL-2 no expresa actividad de proteína tirosina cinasa (PTK), no obstante se une a proteínas citoplásmicas con actividad de tirosina cinasa. Estas diferentes cinasas (p56^{lck}, Syk o JAK) específicas de substratos fosforilados inducen una cascada de eventos intracelulares en el que participan las vías de Ras, PI3 K y la de JAK-STAT (Miyazaki, 1995).

3.5.1. ACTIVACIÓN DE Shc E INDUCCIÓN DE LA VÍA DE RAS

La activación de Ras depende del dominio ácido de la cadena β del RIL-2, una región que también es esencial para la proliferación celular, la asociación

física con la familia de proteínas tirosinas cinasas tales como las p56^{lck} p59^{lyn} o p56^{lyn}, que son requeridas para la inducción y la expresión de los oncogenes *fos* y *jun*. Este dominio ácido contiene residuos de tirosinas, que se unen al dominio SH2 de proteínas adaptadoras como Shc. Se propone que la cadena β del RIL-2 fosforilada recluta la Shc y junto con el complejo Grb2-SOS (SOS, molécula intercambiadora de GDP de Ras), inducen la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), la cual está correlacionada con proliferación celular (Adachi, 1995; Rebollo, 1996).

3.5.2. LA VÍA DE LA FOSFATIDIL INOSITOL-3 CINASA (PI3-K)

El control de la organización del citoesqueleto es esencial durante la división celular. La fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3-K) puede jugar un papel importante a este nivel, probablemente en conjunto con miembros de la familia Rho de proteínas GTPasas pequeñas relacionadas con Ras (Karnitz, 1995). La PI3-K es reclutada por el receptor, de tal manera que ésta puede ser co-precipitada con la cadena β después de la estimulación con la IL-2. Además, células estimuladas con IL-2 incrementan la actividad de la PI3-K co-precipitando con proteínas que contienen fosfotirosina y la p56^{lck} (Bolen, 1995). En este caso es posible que p56^{lck} sirva como proteína adaptadora ya que contiene dos regiones YXXM, las cuales representan un sitio primario reconocido por los dos dominios SH2 de la PI3-K. También p56^{lck} puede interactuar con la PI3-K a través de su dominio SH3. La PI3-K probablemente está involucrada en el control de la proliferación a través de la cinasa S6 o a través de una regulación independiente de Ras, MEK y MAPK (Robey, 1996).

3.5.3. LA VÍA JAK-STAT

La región 1 y 2 (Box 1 y 2) rica en serina de la cadena β del RIL-2 es responsable de la unión constitutiva de la cinasa Janus JAK1, mientras la región equivalente en el RIL-2 γ une a la JAK3. La importancia funcional de la JAK3 ha sido claramente establecida por estudios de la inmunodeficiencia severa combinada asociada al cromosoma X (SCID), en pacientes que expresan una cadena γ mutada, y más recientemente por la descripción de pacientes con SCID con γ normal pero con mutaciones en el gene *jak3* que dan como resultado niveles reducidos de su producto. Los substratos primarios para la cinasa JAK son factores de transcripción de la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STATs) (Johnston, 1995). La IL-2 induce la fosforilación y subsecuente dimerización, translocación nuclear, y activación transcripcional de las STAT3 y STAT5. Esta no es una evidencia directa de que los STATs están involucrados en la proliferación celular, sin embargo, se sugiere que controlan algunos aspectos de la diferenciación celular (Liu, 1994). Por otro lado, existen receptores transmembranales para factores de crecimiento, como el Factor Steel (SF) con actividad tirosina cinasa, los cuales llevan a cabo la transducción de la señal intracelular, como es el caso del receptor c-Kit.

3.6. EL RECEPTOR c-Kit

El receptor c-Kit es un miembro de la familia de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa tipo III (RTK III), así como los receptores transmembranales para factores estimulantes de colonias tipo 1 (CSF-1R), y receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- α y - β) (Fig. 2). El gene que codifica al c-Kit tiene 21 exones y se localiza en el cromosoma 4 (aq11-12). El ARNm codifica para una proteína de aproximadamente 976 aa, la cual tiene un peso aproximado de 145 kDa y que también se le conoce como

CD117; la región extracelular de 500 aa que incluye un péptido señal y cinco regiones de unión al ligando similares a inmunoglobulinas (Ig), las cuales contienen importantes uniones disulfuro intramolecular y potentes sitios de N glucosilación. Un dominio transmembranal hidrofóbico de 23 aa y un dominio citoplásmico comprendido de 433 aa que contiene las regiones de cinasas en los residuos 575-915, un sitio de unión a adenosina trifosfato (ATP) residuo 622, un sitio de auto fosforilación (residuo 821) y un dominio débilmente conservado no catalítico, estrecho hidrofílico de 77 aa conocido como KI, que divide el dominio de cinasas en el centro (Brisa, 1991), involucrado en la unión de los dominios SH2 de las proteínas de transducción de señales intracelulares. El dominio está interrumpido por una secuencia de unión de cinasas que divide el dominio en una región de unión a ATP y una región fosfotransferasa. La unión del Factor Steel (SF) (una molécula que circula como un dímero asociado no covalentemente), induce la homodimerización del receptor c-Kit y la fosforilación de tirosinas intramoleculares del receptor, creando sitios de unión para varias moléculas de transducción de señales que contienen el dominio SH2- (Broudy, 1997; Heldin, 1995).

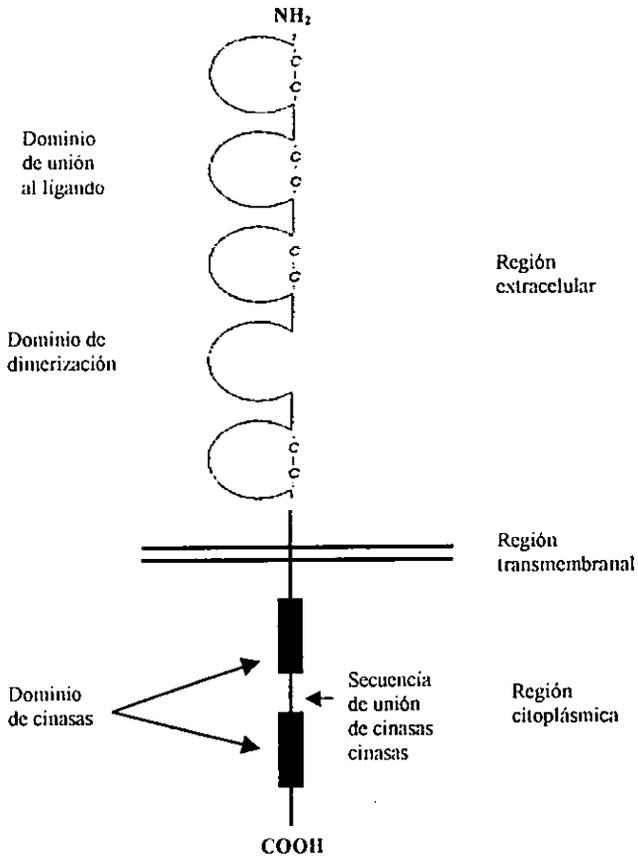


Fig. 2. El receptor c-Kit. El sitio de unión al ATP se encuentra en el dominio de cinasas cercano a la membrana celular. La región fosfotransferasa se encuentra en el dominio de cinasas alejado de la membrana (Tomado de Broudy, 1997).

3.7. EL FACTOR STEEL (SF)

El factor de células Stem (SCF), también conocido como ligando de Kit (KL), factor de crecimiento de células mast (MGF) o factor steel (SF) es una citocina que induce su efecto biológico como la diferenciación e inhibición de la apoptosis, por la unión a su receptor c-Kit (Williams, 1990, Zsebo, 1990, Huang, 1990). Es codificado por el locus *Sl* en el cromosoma 12 (q2212q24) en el humano. El gene consiste de 8 exones los cuales codifican un ARNm de aproximadamente 6.5 kb. El SF es producido constitutivamente en forma soluble y membranal por un corte y empalme alternativo que incluye o excluye un sitio de corte proteolítico (Anderson, 1991) (Fig. 3). La proteína de 248 aa consiste de un dominio extracelular de 189 aa, un dominio transmembranal hidrofóbico de 23 aa y un dominio intracelular de 36 aa, incluye el exón 6 el cual codifica un sitio de corte proteolítico después del aa Ala 165 que da como resultado la producción del SF soluble de 165 aa, que circula como un dímero unido no covalentemente (Lu, 1991), con un peso molecular aproximado de 18.5 kDa (Qiu, 1988; Pandit, 1992). La falta del exón 6 en la molécula de 220 aa da origen a la producción de la forma transmembranal de SF; los aa 149-177 son reemplazados por residuos de Gly. El radio del ARNm de SF de 248 aa y del ARNm de SF de 220 aa varía considerablemente en diferentes tejidos; en el cerebro es de 10:1, en células de médula ósea es de 4:1 y en testículos de 0.4:1. Estudios de fibroblastos de médula ósea han confirmado que estas células estromales de médula ósea contienen predominantemente el ARNm de la forma de SF de 248 aa (Huang, 1992; Marziali, 1993). Existe otro sitio alternativo en el exón 7, únicamente en ratón, en donde se demostró que la delección de 12 nucleótidos codificados para lys 178-181 evita la producción de SF soluble, sugiriendo un segundo sitio de anclaje proteolítico (Majumdar, 1994).

Tanto la forma soluble como la membranal son biológicamente activas; sin embargo, los mecanismos que las regulan en los diferentes tejidos no están claros, ya que se ha demostrado que el corte de SF de la superficie celular puede ser inducida por la activación de la proteína cinasa C (PKC) o por agentes que

3.7.1. DISTRIBUCIÓN CELULAR DEL RECEPTOR c-Kit

El receptor c-Kit está distribuido en poblaciones de células hematopoyéticas CD34⁺, células pre-B (Faust, 1993), timocitos CD4⁺, CD8⁻ y CD3⁻ (deCastro, 1994), en células madre (Yee, 1993), células progenitoras de linfocitos T, B y plaquetas activadas (Palacios, 1992).

Las células progenitoras hematopoyéticas también lo expresan, pudiendo estar asociado físicamente con el dominio citoplásmico del REpO en las células que responden a la EpO y al SF. Esto sugiere un efecto sinérgico de SF y la EpO en la eritropoyesis, ya que se ha demostrado que en células dependientes de estos factores, el SF puede reemplazar a la EpO y mantener la proliferación expresando altos niveles de c-Kit en la membrana, asociándose físicamente con la región citoplásmica (Box 2) del RepO e induciendo rápidamente la fosforilación de tirosinas (Wu, 1995; Sui, 1996).

El c-Kit es comúnmente detectado en líneas celulares hematopoyéticas humanas de fenotipos megacariocitos y eritroides, así como en algunas líneas celulares mieloides y linfoideas (Hu, 1994).

3.8. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL c-Kit/SF

Algunos datos sobre el señalamiento de SF y de c-Kit se han obtenido a partir de las células COS transfectadas con quimeras o del tipo silvestre de c-Kit. En células madre se ha reportado que la unión normal, de la forma dimerica de SF rápidamente induce la dimerización de c-Kit; sin embargo, el análisis de células que coexpresan formas mutantes de ratón y humano indican que la dimerización del receptor puede ser inducida por unión monovalente del ligando (Lev, 1992). El SF induce la autofosforilación en tirosinas de c-Kit, la autofosforilación produce cambios conformacionales que expone los dominios aceptores SH2, los cuales permiten a c-Kit interactuar con las proteínas con actividad de tipo tirosina cinasa entre las que se encuentra la fosfatidil inositol 3 cinasa (IP3-K) y las proteínas

fosfolipasa C γ -1 (PLC γ -1), la cinasa raf-1, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP), las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) (Miyazawa, 1991; Mui, 1991; Green, 1991; Ratajczak, 1992). Por otra parte, la estimulación de líneas celulares tallo o hematopoyéticas de ratón con el SF *in vitro* también activan a la p21 Ras (Galli, 1994).

Los dominios de c-Kit regulan diferentes componentes de la vía de transducción de señales, mostrando que la secuencia de unión de los dominios de cinasa regula la unión con la PI3-K y que la activación de la Raf-1 requiere un COOH terminal intacto. Sin embargo, una cinasa recombinante insertada en el c-Kit no puede unir a la PI3-K a menos que haya sido fosforilado en tirosina, indicando que la fosforilación de tirosina del dominio de unión de cinasa es importante para éste elemento del proceso de transducción de la señal (Broudy, 1997).

3.9. EL RECEPTOR c-Kit EN CÉLULAS TUMORALES

Las células hematopoyéticas neoplásicas también pueden expresar el receptor c-Kit. Los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) presentan c-Kit+, y el SF puede estimular su supervivencia y proliferación (Broudy, 1992). No obstante, los blastos leucémicos de pacientes con leucemia linfocítica aguda raramente expresan el c-Kit y algunos linfomas no-Hodgkin's carecen de éste (Tomeczkowski, 1995), con excepción de las leucemias de células grandes anaplásicas y pacientes con enfermedad de Hodgkin's si lo pueden expresar (Pinto, 1994).

En líneas celulares de eritroleucemia se ha detectado una alta densidad de receptores c-Kit, las cuales pueden expresar de 50,000 a 100,000 receptores por célula (Turner, 1995). Asimismo, diferentes líneas celulares de tumores sólidos humanos en las que se incluyen las células pequeñas de cáncer de pulmón, y neuroblastoma, así como en tejidos de tumores frescos humanos como las células pequeñas de cáncer de pulmón, seminoma testicular, glioblastoma y

cáncer de mama expresan el c-Kit con un peso molecular similar al de c-Kit en células madre hematopoyéticas humanas normales (Cohen, 1994).

El receptor c-Kit y el SF pueden jugar un papel importante en la inmortalización de las líneas celulares tumorales, esto debido a que se ha demostrado que un anticuerpo monoclonal contra el receptor de éste bloquea la unión en la superficie celular pero no inhibe su proliferación, a diferencia de las células de médula ósea humana normal, en donde se ha determinado que el mismo anticuerpo, a las mismas concentraciones y en presencia de SF, se bloquea su proliferación hasta un 90%, lo que sugiere que el SF pudiera unirse a c-Kit de forma intracelular (Turner, 1992).

3.9.1. ALTERACIONES DEL RECEPTOR c-Kit

En modelos de ratón se ha demostrado que la ausencia de SF (Mutación *Sf*) o del receptor c-Kit en la membrana (mutación *W*), provoca muerte en el útero o en período perinatal con anemia macrocítica severa. La ausencia de la actividad de cinasa del receptor c-Kit (mutación *W⁴²*), también causa muerte perinatal con anemia macrocítica severa, lo que sugiere que el SF juega un papel importante durante el desarrollo en el útero (Tan, 1990). Mutaciones puntuales en el receptor c-Kit disminuyen su actividad de tirosina cinasa o mutaciones que alteran la producción de SF están asociados con un espectro de anormalidades fenotípicas incluyendo diferentes grados de anemia macrocítica, disminución en el número de células madre, disminución de la fertilidad y de la pigmentación (Blouin, 1993). Estas observaciones demuestran que el SF y el receptor c-Kit juegan un papel importante en la hematopoyesis y en el desarrollo de células germinales y melanocitos. En general, los defectos en la actividad cinasa de c-Kit, dan como resultado, importantes anormalidades fenotípicas (Reith, 1990).

Los tres aa terminales de los dominios de unión a la Ig del receptor c-Kit contienen el sitio de unión al SF y los 4 dominios de unión a la Ig pueden contener el sitio requerido para la dimerización de c-Kit (Blechman, 1995). Mutaciones del

Asp^{B14} en el dominio de cinasa en una línea de células tallo de ratón y una mutación correspondiente al Asp^{B16} en una línea celular tallo humana confiere un crecimiento independiente del factor, una fosforilación constitutiva de tirosinas del receptor c-Kit, diferenciación de células tallo y tumorigenicidad *in vivo*, en células mononucleadas de sangre periférica de pacientes con mastocitosis y desorden mielodisplásico asociado y en células madre de pacientes con urticaria pigmentosa (Kitayama, 1996; Longley, 1996). La mutación del Asp^{B14} altera el substrato específico de los receptores c-Kit y origina una ubiquitinización y degradación acelerada de la SHP1 (Piao, 1996); la proteína tirosina fosfatasa que normalmente atenúa la transducción de señales de c-Kit. Una mutación del aa Val⁵⁵⁹ en la región cercana a la membrana de c-Kit, que ha sido identificada en una línea celular madre humana, ocasiona una dimerización independiente del ligando y una activación constitutiva de c-Kit. La caracterización estructural y funcional de c-Kit en las células madre en pacientes con mastocitosis indican que una mutación del aa y una delección en el dominio citoplásmico de c-Kit puede estar asociado con una transformación neoplásica de las células tallo (Kitayama, 1995).

3.9.2. EXPRESIÓN DE c-Kit Y SF DURANTE EL DESARROLLO

Durante la vida embrionaria, el ARN de SF y el c-Kit son expresados a lo largo de las vías migratorias y destinos de células germinales primordiales y melanocitos, en sitios de hematopoyesis (incluyendo el saco embrionario, hígado fetal y médula ósea), en el intestino y en el sistema nervioso central (Orr-Urtreger, 1990, Keshet, 1991). Este patrón de expresión sugiere que el SF puede influenciar la migración de células germinales, melanocitos y células hematopoyéticas para su último destino durante el desarrollo. La expresión del receptor c-Kit se ha detectado en el octavo día de gestación en el saco embrionario y en el décimo día en hígado fetal, éstos se incrementan progresivamente hasta el día 15 y luego disminuyen paralelamente a la transición del saco embrionario, el hígado fetal y la

hematopoyesis de la médula ósea (Palacios, 1992). El SF es también importante durante la vida adulta, ya que al realizar estudios en ratones adultos en los cuales se les aplicó un anticuerpo monoclonal anti-c-Kit provocó una pancitopenia y una marcada disminución de la celularidad de la médula ósea, sugiriendo que la producción constitutiva de SF por células endoteliales de médula ósea y fibroblastos pueden ser requeridos para el mantenimiento de la hematopoyesis normal. La espermatogénesis, el desarrollo, la motilidad de melanocitos y la respuesta a infecciones intestinales se ven dañados por el tratamiento con anticuerpos anti-c-Kit (Anderson, 1990, Toksoz, 1992).

Por lo anterior son de gran relevancia para el organismo, las consecuencias biológicas de la interacción de SF y el c-Kit como la adhesión, quimiotáxis/haptotáxis, supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración celular (Galli, 1994).

3.10. APOPTOSIS

La apoptosis ha llegado a ser una de las principales áreas de investigación de la biología celular, ya que la muerte celular es un proceso regulado bioquímicamente que puede ser tan complejo como otros procesos biológicos fundamentales. En 1970, se formalizó la existencia de una forma de muerte celular distinta de la necrosis (McConkey, 1998) que recibió el término de apoptosis (Kerr, 1972).

La muerte celular fisiológica es esencial para el desarrollo y funciones apropiadas de organismos multicelulares. Las células nocivas y dañadas necesariamente deben ser eliminadas del microambiente de las células sanas para asegurar la homeostasis estructural y funcional del tejido (Clarke, 1996). Ejemplos de muerte celular fisiológica han sido observados en diferentes tipos de tejidos de organismos vertebrados e invertebrados a través del desarrollo y la maduración. Durante el desarrollo embrionario un programa temporal

genéticamente definido de la proliferación y muerte celular conocida como muerte celular programada asegura un patrón celular apropiado y organogénesis. En tejidos adultos, la muerte celular fisiológica también figura en tejidos dependientes de hormonas y estimulados cíclicamente, tales como el endometrio, próstata, glándulas suprarrenales y mamas. También es fundamental en el desarrollo, función y regulación del sistema inmune. Se ha detectado en botánica, la cual ha sido designada como senescencia, y durante la metamorfosis de anfibios (Jacobson, 1997; Lenardo, 1999). El concepto unificado de todas estas diversas circunstancias es que el proceso de muerte celular programada es mediado por un conjunto de eventos y efectos por vías bioquímicas similares, que dan como resultado un rearrreglo de cambios estructurales (Kerr, 1972).

La apoptosis es un proceso innato evolutivamente conservado por el cual, las células sistemáticamente inactivas desensamblan y degradan sus mismos componentes estructurales y funcionales para completar su propia muerte (Porter, 1999). Esto puede ser activado de forma intracelular a través de un programa genético o extracelular definido por: 1) las proteínas endógenas conocidas como caspasas (Earnshaw, 1999); 2) las citocinas citotóxicas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y ligando FAS (Lenardo, 1999); 3) las hormonas como los glucocorticoides (Schwartzman, 1993); 4) compuestos xenobióticos; 5) el estrés; 6) la radiación; 7) el estrés oxidativo; y 8) la respuesta inmune (Bortner, 1995; Hannun, 1999). La capacidad de una célula de sufrir apoptosis en respuesta a una señal de muerte está relacionada con el estado proliferativo, etapa del ciclo celular y la expresión controlada de genes que promueven, inhiben y afectan el programa de muerte celular tal como las p53, Rb (Earnshaw, 1999) y miembros de la familia antiapoptótica Bcl-2 o proapoptótica como Bax (Reed, 1997). El defecto en algún punto en la vía de muerte puede ocasionar una apoptosis inapropiada, conduciendo potencialmente a condiciones patofisiológicas, ya que la apoptosis desregulada puede traer como consecuencia una excesiva muerte celular o insuficiente, la cual es fundamental para la iniciación y progresión de alguna enfermedad humana (Stambolic, 1999).

La apoptosis puede ser dividida en tres etapas distintas: 1) Fase obligada o comprometida, en la cual la célula ha recibido un estímulo potencialmente apoptótico y letal, que generalmente llega a ser irreversible conduciendo a la muerte; 2) ejecución, durante el cual ocurren los principales cambios estructurales y 3) eliminación, cuando los remanentes celulares son removidos y eliminados por fagocitosis (Nagata, 1997; Jacobson, 1997).

Durante la fase de ejecución ocurren cambios bioquímicos y morfológicos coordinados en el citoplasma, membrana plasmática, núcleo y organelos. Algunos de estos eventos fácilmente reconocibles son los cambios que ocurren en el núcleo. La cromatina se condensa y se agrega a lo largo de la periferia nuclear. La caracterización molecular de la cromatina revela que una degradación ordenada del ADN por nucleasas endógenas, primero en fragmentos grandes de 30-50 kb y finalmente en fragmentos nucleosomales de 180-200 pares de bases (Cain, 1994; Torriglia, 1999). Simultáneamente con la condensación de la cromatina, se altera la estructura nuclear, la lámina nuclear y la red de filamentos intermedios que mantienen la integridad de la envoltura nuclear y la distribución de los poros nucleares que son degradados proteolíticamente. El rompimiento del esqueleto estructural nuclear puede permitir la agrupación del poro nuclear y a la fragmentación del núcleo en fragmentos que contienen cromatina, algunos de los cuales retienen vestigios de la membrana nuclear. Otros organelos citoplásmicos permanecen estructuralmente intactos, aunque la disfunción de la mitocondria está asociada con apoptosis, la reducción en el potencial de membrana mitocondrial, un desacoplamiento del transporte de síntesis de ATP y un incremento en la generación de especies reactivas a oxígeno preceden a los cambios nucleares (Shimizu, 1999). En el citoplasma ocurren uniones de proteínas a través de la acción de la transglutaminasa, los filamentos del citoesqueleto se agregan en forma paralela, y el retículo endoplásmico se dilata y se fusiona con la membrana plasmática creando burbujas en el punto de unión. La integridad estructural de la membrana plasmática es además comprometida por una disminución en la simetría de los fosfolípidos de membrana como la fosfatidilserina y las interacciones célula-célula. La morfología celular, se disocia asimismo de las

demás y se contrae dramáticamente formando protuberancias que se separan en "cuerpos apoptóticos " unidos a la membrana (Mills, 1998). En los tejidos, las células apoptóticas y los cuerpos apoptóticos son reconocidas y rápidamente fagocitados por células cercanas y macrófagos. Cuando la fase de ejecución de la apoptosis es activada, rápidamente procede el proceso de entrada y éste es completado en pocas horas. La duración de esta fase es relativamente invariante con respecto al tipo celular y al estímulo apoptótico, lo cual sugiere que la etapa final de la apoptosis procede a través de una vía común.

Sin embargo, en la fase de compromiso, el tiempo de la recepción del estímulo apoptótico hasta el inicio irreversible de la fase de ejecución, es extremadamente variable, y depende del tipo celular, del estímulo apoptótico, de la fase del ciclo celular y de la expresión de varios factores moduladores de muerte (Bortner, 1995; Jacobson, 1997).

Algunos de los factores que influyen en el compromiso, o susceptibilidad a la apoptosis, están involucrados directamente en la recepción y transducción de la señal apoptótica. Estos factores reguladores son frecuentemente seleccionados durante el curso de la transformación neoplásica, o del desarrollo de resistencia a drogas y están sujetas a modificaciones virales. Algunos de los genes involucrados en la regulación de la apoptosis que han sido identificados recientemente son importantes en la carcinogénesis (Williams, 1991; Kokawa, 1999).

Sin embargo, otros estudios han demostrado, que la presencia de algunos factores de crecimiento hematopoyético como el GM-CSF, la IL-3, el G-CSF, la EpO y el SF mantienen la supervivencia celular a través de un retraso en la degradación del ADN, los cuales requieren de la proteína cinasa C y el antiporte funcional de Na^+/H^+ , el cual es fosforilado en residuos de serina, dando como resultado un incremento del pH intracelular (Rodríguez-Tarduchy, 1990; Rajotte, 1992; Cáceres-Cortés, 1994).

4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el cáncer cérvico-uterino es un problema de salud pública de gran relevancia. Sin embargo, no se tiene información clara acerca de los mecanismos de escape inmunológico que presentan este tipo de células. Se plantea que puedan secretar factores inhibidores de la proliferación y activación de linfocitos de sangre periférica (LSP), e incluso que puedan competir por factores de crecimiento, específicos para linfocitos, como la IL-2, entre otros. Ahora bien, se cuenta con diferentes estudios los cuales indican que las células de tumores sólidos de diferentes tipos histológicos expresan el receptor para dicha citocina; en particular, nuestro grupo de trabajo estableció dos líneas celulares obtenidas de cáncer cérvico-uterino en estadios avanzados denominadas CALO (IIB) e INBL (IVB), en las que se detectó la presencia del RIL-2 α , β y γ . Otros ensayos nos han permitido determinar que la IL-2 exógena induce actividad proliferadora o inhibidora sobre estas células, dependiendo de la concentración de la IL-2 utilizada, además de regular positivamente la expresión del receptor para dicha citocina, que se consideraba un factor de crecimiento exclusivo de células hematopoyéticas. Así como se ha demostrado la expresión del RIL-2 en células tumorales, también se ha detectado la expresión de c-Kit, receptor de un factor de la sobrevivencia de células precursoras de linaje hematopoyético, en células neoplásicas tanto de linaje hematopoyético como en células de tumores sólidos humanos que responden al SF. También existen estudios que indican que c-Kit puede activar directamente la cadena β del receptor para Eritropoyetina (REpO). Este descubrimiento es de gran importancia ya que la cadena β del REpO es compartida por receptores de otras citocinas con los que podría interactuar de la misma manera como lo hace con el REpO. Por ésta razón en el presente trabajo se pretende determinar si c-Kit está presente en las líneas celulares CALO e INBL y el papel que éste puede jugar en la immortalización de las células tumorales utilizando como modelo de trabajo el carcinoma cérvico-uterino. Los resultados que se obtengan en este estudio aportarán datos interesantes que nos

ayudarán a conocer más sobre la biología de este tipo de tumor. Asimismo, nos permitirán proponer un modelo sobre los mecanismos de interacción de receptores en el interior de dichas células tumorales, en el cual se encuentren involucrados receptores para factores de crecimiento hematopoyéticos.

5. HIPÓTESIS

Se sabe que la cadena β del receptor para la IL-2 (RIL-2 β) presenta gran homología con el receptor para Eritropoyetina (REpO), constituido también por una cadena β , la cual puede ser fosforilada directamente por el receptor c-Kit en ausencia de EpO e inducir sobrevivencia. Asimismo, recientes evidencias indican que c-Kit no es exclusivo de células hematopoyéticas precursoras, ya que se ha detectado en líneas celulares de tumores sólidos humanos, en las que podría jugar un papel importante como factor de sobrevivencia, por lo que al utilizar un anticuerpo dirigido contra c-Kit se esperaría determinar su presencia en las células de carcinoma de cérvix. Por otra parte, recientemente demostramos que dos líneas celulares de carcinoma de cérvix expresan las cadenas α , β y γ del RIL-2 (RIL-2 $\alpha\beta\gamma$) a través de las cuales se induce su proliferación en presencia de la Interleucina-2 exógena.

Si confirmamos la presencia de c-Kit en las líneas celulares de carcinoma de cérvix, podríamos sugerir que las células lo utilizan como un mecanismo de sobrevivencia manteniendo la proliferación celular *in vivo*. Además, si definimos el estado de fosforilación de c-Kit y de la cadena β del RIL-2 en ausencia y presencia de IL-2, estaríamos en condiciones de proponer un mecanismo alternativo de activación del RIL-2 en éste modelo de trabajo, semejante al que se presenta para el receptor de EpO.

ayudarán a conocer más sobre la biología de este tipo de tumor. Asimismo, nos permitirán proponer un modelo sobre los mecanismos de interacción de receptores en el interior de dichas células tumorales, en el cual se encuentren involucrados receptores para factores de crecimiento hematopoyéticos.

5. HIPÓTESIS

Se sabe que la cadena β del receptor para la IL-2 (RIL-2 β) presenta gran homología con el receptor para Eritropoyetina (REpO), constituido también por una cadena β , la cual puede ser fosforilada directamente por el receptor c-Kit en ausencia de EpO e inducir sobrevivencia. Asimismo, recientes evidencias indican que c-Kit no es exclusivo de células hematopoyéticas precursoras, ya que se ha detectado en líneas celulares de tumores sólidos humanos, en las que podría jugar un papel importante como factor de sobrevivencia, por lo que al utilizar un anticuerpo dirigido contra c-Kit se esperaría determinar su presencia en las células de carcinoma de cérvix. Por otra parte, recientemente demostramos que dos líneas celulares de carcinoma de cérvix expresan las cadenas α , β y γ del RIL-2 (RIL-2 $\alpha\beta\gamma$) a través de las cuales se induce su proliferación en presencia de la Interleucina-2 exógena.

Si confirmamos la presencia de c-Kit en las líneas celulares de carcinoma de cérvix, podríamos sugerir que las células lo utilizan como un mecanismo de sobrevivencia manteniendo la proliferación celular *in vivo*. Además, si definimos el estado de fosforilación de c-Kit y de la cadena β del RIL-2 en ausencia y presencia de IL-2, estaríamos en condiciones de proponer un mecanismo alternativo de activación del RIL-2 en este modelo de trabajo, semejante al que se presenta para el receptor de EpO.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del complejo c-Kit/SF en líneas celulares de carcinoma de cérvix y demostrar si éste juega un papel en la activación del RIL-2 β en las células de cáncer cérvico-uterino.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la presencia de c-Kit y el SF en las líneas celulares CALO e INBL.

Evaluar el efecto de SF en la proliferación de las líneas CALO e INBL.

Demostrar el perfil de fosforilación de las líneas CALO e INBL en ausencia y presencia de la IL-2 y el SF.

Determinar el efecto de inhibidores de proteínas tirosina cinasa (Tirfostinas) en la proliferación así como la fosforilación de c-Kit y el RIL-2 β de células CALO e INBL.

Evaluar la apoptosis de las líneas CALO e INBL en presencia de oligonucleótidos antisentido de SF.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (estadio clínico IIB) e INBL (estadio clínico IVB), establecidas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM y la línea celular HELA. Asimismo, se utilizaron biopsias de piezas quirúrgicas de cérvix normal provenientes de donadoras sanas sin lesión por carcinoma de cérvix, proporcionadas por el servicio de ginecología del Hospital General de Zona Troncoso, IMSS. De la misma manera, se utilizó la línea celular TF-1 eritroleucémica (control positivo del c-Kit), la p220 (línea celular 3T3 positiva para el SFm) y linfocitos de sangre periférica normal (LSP) de donadores normales.

Las muestras de tejido normal fueron trasladadas al laboratorio en tubos de plástico de 50 ml de capacidad (Falcon, USA) conteniendo Medio IMDM (Iscovés Modified Dulbecco's Medium) (Gibco, USA), en una proporción del 90% más 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Gibco, USA), el transporte se hizo en un recipiente con hielo.

7.2. CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares CALO, INBL, TF-1 y las células epiteliales normales, fueron cultivadas en Medio IMDM (Gibco, USA), suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA).

La línea celular TF-1 además de SFB fue mantenida con 10 ng/ml de GM-CSF (Genzyme, MA). Por su parte, los LSP en medio IMDM suplementado al 20% con

SFB y 1µg/ml de fitohemaglutinina (PHA), (Sigma, USA) o 100 UI/ml de hrIL-2 (R&D Systems, MA).

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora (Form Scientific, Division of Mallincrodt, Inc. USA), a una atmósfera de 5% de CO₂, temperatura de 37° C y un ambiente saturado de humedad.

Para eliminar de factores de crecimiento en el medio de cultivo y obtener el mayor porcentaje de células sincrónicas en fase Go del ciclo celular, las células CALO e INBL en fase de proliferación exponencial fueron incubadas sin SFB, y se incubaron sólo con medio Opti Mem (Gibco, MD) conteniendo 1% de BSA (Albumina serica bovina) (Gibco, USA) por 24 hrs a 37°C, posteriormente fueron removidas del sustrato con una solución de tripsina (Sigma USA) al 0.1% en verseno (**Apéndice 13.1.**) centrifugadas a 500 g durante 5 min, el botón celular fue resuspendido en medio apropiado y fueron utilizadas para los ensayos posteriores.

La densidad y viabilidad de las líneas celulares CALO e INBL en cultivos confluentes, así como la línea TF-1 y los LSP en cultivo fueron contados en cámara de Neubauer (American Optical, USA) y evaluadas por exclusión de azul de tripano (**Apéndice 13.2.**).

7.3. DISGREGACIÓN MECÁNICA Y ENZIMÁTICA

Antes de procesar las muestras de epitelio normal, éstas fueron lavadas bajo condiciones de esterilidad con una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (**Apéndice 13.3.**), durante 15 min en un baño de agua a 37°C, inmediatamente después el tejido fue cortado con tijeras en pequeños trozos de aproximadamente 1-2 mm³. Los fragmentos de tejido fueron colocados en un matraz Erlenmeyer conteniendo un agitador magnético en el que se adicionó tripsina Tipo II (Sigma, USA), (**Apéndice 13.4.**) al 0.025%, la disgregación se realizó a una temperatura de 37°C durante 45 min con una agitación constante. Después de este tiempo las células en suspensión fueron aisladas mediante pipeteo y se lavaron 3 veces con

SAF mediante centrifugación a 600g durante 5 min. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio IMDM al 10% de SFB distribuidas en cajas de petri con un volumen total de 5 ml para su posterior incubación.

7.4. CONCENTRACIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO

Para obtener el medio condicionado de las líneas celulares CALO, INBL y epitelios normales, las células fueron cultivadas hasta llegar a la fase de confluencia en Medio IMDM suplementado con 10% SFB. Posteriormente, el sobrenadante fue colectado y centrifugado a 1000 g para eliminar detritus celular y concentrado hasta 80 veces el volumen inicial en membrana con poro de 30 kDa en un vaso concentrador Amicon. Asimismo, el medio fue concentrado en un aparato speed vac (Savant, USA) hasta llegar a sequedad, y el producto final fue resuspendido en SAF para ser dializado en membrana de diálisis con poro de 5 kDa (Spectrum Medical, USA) en SAF durante tres días, con cambios cada 24 hrs. El medio condicionado dializado fue esterilizado con membrana de 0.22 μ (Millipore, USA).

7.5. ENSAYO DE ELISA PARA DETERMINAR EL SF SOLUBLE

Los antígenos (500 μ g de proteínas de medio condicionado) de CALO, INBL y epitelios normales fueron resuspendidos en 100 μ l/pozo (placas de 96 pozos) de amortiguador de carbonatos (**Apéndice 13.5.**) e incubados toda la noche a 4°C en refrigerador. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con SAF-Tween al 0.1% y posteriormente se bloqueó la placa con albúmina al 0.2% durante 30 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo se procedió a lavar nuevamente como en el paso anterior. Se adicionó el anticuerpo anti SF (R&D Systems, MA) a una concentración de 10 μ g/ml en SAF-albúmina al 2% (100 μ l/pozo) y la placa fue incubada 1:30 hrs a 37 °C; posteriormente se realizaron los lavados correspondientes y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Sigma, USA), a una concentración de 5 μ g/ml en SAF-albúmina e

incubada 1:30 hrs a 37°C. Pasado este tiempo, se realizaron los lavados y se adicionó el sustrato OPD (O-fenil-diamina) (GIBCO, USA) a una concentración de 6 mg en 12 ml de amortiguador de citratos (**Apéndice 13.5.1.**) y 100 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (el cual previamente fue preparado y mantenido en oscuridad), la reacción fue detenida después de 10 min aproximadamente con H₂SO₄ 2.5 N y se procedió a leer en lector de ELISA (BIOTEC ELx800) a una absorbencia de 490 nm.

7.6. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS

En condiciones de esterilidad fueron obtenidos de 10-20 ml de sangre periférica de donadores normales, mediante jeringa 1000 X 16 mm (Becton Dickinson, Co. USA) conteniendo heparina 1000 UI/ml en 0.1 ml (Rickercab/NCB, USA). Después la sangre fue centrifugada durante 10 min a 500 g, para luego separar el plasma del paquete celular mediante pipeteo suave. El paquete celular fue lavado con medio IMDM, se adicionó un volumen de medio igual al del paquete celular, el lavado se realizó mediante centrifugación a 500 g durante 10 min para después desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular nuevamente en medio IMDM para obtener una mezcla homogénea; después de esto se vertieron alicuotas de 5 ml de la mezcla en tubos conteniendo 2.5 ml de Ficoll Hypaque (GIBCO, USA), de 1.077 de densidad, los cuales fueron centrifugados durante 30 min a 1000 g. Transcurrido este tiempo, fueron separadas las bandas de células mononucleadas situadas en la interfase entre el paquete de eritrocitos y el medio IMDM, mediante pipeteo suave. Los linfocitos se lavaron tres veces con medio IMDM mediante centrifugación a 60 g durante 10 min. Posteriormente éstos fueron cultivados con medio IMDM suplementado con 20% de SFB y 100 UI/ml de hrIL-2 (R&D Systems, MA), en cajas de petri con capacidad de 3 ml.

7.7. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE c-Kit Y SF MEMBRANAL

Las células CALO e INBL en fase de confluencia fueron colectadas con una solución de tripsina al 0.1% en verseno, resuspendidas en medio IMDM y contadas. Se colocaron 1×10^6 células por pozo en placas de 96 pozos con una solución de SAF al 2% de SFB. Posteriormente fueron centrifugadas a 500 g y el sobrenadante fue eliminado; las células fueron incubadas con 15 μ l de los anticuerpos monoclonales a una concentración de: 10 μ g/ml de anti-c-Kit (Boehringer, Germany), 10 μ g/ml de anti-SF (Genzyme, MA) y 10 μ g/ml de anti-IgG1 (control negativo) (R&D Systems Inc. USA) más 85 μ l de la solución SAF-SFB a 4°C por 30 min. Después de este tiempo, fueron centrifugados 5 min a 500 g y se eliminó el sobrenadante. Se colocaron 0.4 μ g/100 μ l del anticuerpo secundario conjugado con FITC (Boehringer, Germany) en la solución SAF-SFB y se incubaron durante 1 hr a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces con solución SAF-SFB, resuspendidas y transferidas a tubos, finalmente se adicionó 1 μ g/ml de Yoduro de propidio y fueron evaluadas en un Citómetro de Flujo (FACScan) (Becton Dickinson, Co. USA).

7.8. INDUCCIÓN DEL RECEPTOR c-Kit POR LA IL-2

Las células CALO e INBL deprivadas de suero fueron estimuladas con 10 UI/ml de la rhIL-2, durante 12, 24 y 48 hrs. Posteriormente fueron colectadas como se mencionó antes a los tiempos indicados y se adicionó el anticuerpo anti c-Kit y anti IgG1 (control negativo); se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con FITC y se procedió a evaluar en el Citómetro de Flujo (FACScan) (Becton Dickinson, Co. USA).

7.9. PROLIFERACIÓN DE CALO e INBL EN PRESENCIA DE LA IL-2, SF E INHIBIDORES DE CINASAS

Las células sin suero (1×10^4 cél/ml) fueron sembradas en placas de 96 pozos en presencia de 10 UI/ml de la hrIL-2 (R&D Systems, MA), y/o 10 ng/ml de SF (Genzyme, MA). Después de 2 días de cultivo se adicionó, $1 \mu\text{Ci/ml}$ de 3H-timidina (Sigma, USA). Para el caso de la inhibición con Tirfostinas (Tir) (Calbiochem, Ca) (Apéndice 13.6.) las células fueron incubadas en las condiciones similares a las anteriores y en presencia de $10 \mu\text{M}$ de Tir 1 (Control), Tir B42 y Tir B48. Después de 3 días de cultivo las células fueron lavadas con SAF, se adicionó metanol (Sigma, USA) al 95% en SAF, durante 20 min, posteriormente fueron lavadas con SAF. Después se agregó a cada cultivo $50 \mu\text{l}$ /pozo de una solución 400 mM de NaOH (Sigma, USA) para lisar las células y liberar al ADN marcado, el cual fue colectado utilizando una cosechadora (BRANDEL, USA), lo cual permitió eliminar el exceso de timidina no incorporado por las células. Los filtros que contenían el ADN de las células que incorporaron el isótopo fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente colocados en viales para centelleo a los cuales se les adicionó 5 ml líquido de centelleo (Sigma, USA), con la finalidad de amplificar las lecturas del material incorporado. Los viales fueron evaluados en un contador de centelleo de emisión Beta (Beckman, USA).

7.10. INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR ANTICUERPOS

Las células en confluencia de las líneas CALO e INBL fueron separadas del sustrato con verseno-tripsina, y 1×10^4 cél/ml fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas con: IL-2 a una concentración de 10 UI/ml, SF a una concentración de 10 ng/ml, al igual que los anticuerpos anti-cKit a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$, anti- β (anti p-75), a $3 \mu\text{g/ml}$, anti-IL-2 a $5 \mu\text{g/ml}$ y anti SF a una concentración de $3 \mu\text{g/ml}$. La proliferación celular fue realizada después

de tres días de cultivo. Se desechó el sobrenadante y las células se incubaron durante 3 hrs con 50 μ l de Bromuro de 3-(4,5-dimetil tioazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Sigma USA) a una concentración de 0.5 mg/ml. El reactivo MTT enzimáticamente reducido a formazán (color azul) por las células vivas fue extraído con 200 μ l de isopropanol (Sigma. USA) para disolver los cristales de formazán. Las placas fueron agitadas ligeramente durante 5 minutos, posteriormente se procedió a leer la solución obtenida a una absorbencia de 570 nm en lector de ELISA (BIOTEC ELx800).

7.11. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA INDUCIDAS POR LA IL-2 y SF.

Las células CALO e INBL fueron estimuladas 1, 2 y 3 min con 100 UI/ml de rhIL-2 y 10 ng/ml de SF. Posteriormente fueron lisadas con amortiguador de lisis (**Apéndice 13.7.**) e inhibidores de proteasas (**Apéndice 13.7.1.**), la cuantificación de las proteínas fue evaluada por el método de Bradford (Bio-RAD, USA), (**Apéndice 13.7.2.**). Los extractos celulares fueron precipitados con acetona a 4°C durante toda la noche. Las proteínas precipitadas fueron lavadas 5 veces con acetona a 4°C, posteriormente se les adicionó amortiguador de Laemmli (**Apéndice 13.7.3.**) y 2 μ l de Ditiotretiol (DTT) (Sigma, USA) a una concentración 1 M por 20 μ l de la muestra y se procedió a hervir durante 5 min. Las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE al 12.5%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, y se realizó un blot anti-PY contra humano para determinar el patrón de proteínas fosforiladas en tirosinas; como se muestra adelante.

7.12. INMUNOPRECIPITACIÓN DEL RIL-2 β Y c-Kit EN PRESENCIA DE LA IL-2 Y SF

Las células CALO e INBL previamente tratadas y las células TF-1 deprivadas de GM-CSF por 6 hrs fueron incubadas con inhibidores de cinasas (Tirfostinas) por 5 min a 37°C en presencia de 10 μ M de Tirfostina 1 (control), Tirfostina B42 (específica de cinasa c-Kit) y Tirfostina B48 (de amplio espectro de cinasas) (Calbiochem, Ca). Posteriormente, las células fueron estimuladas durante 3 min con 10 UI/ml de la hrIL-2 y/o 10 ng/ml de SF. La reacción se detuvo a 4°C y rápidamente fueron centrifugadas a 500 g por 5 min en centrífuga (Eppendorf, USA). Posteriormente el botón celular fue resuspendido e incubado en solución de lisis por 15 min a 4°C. Los extractos celulares fueron centrifugados a 1300 g a 4°C por 15 min.

El contenido de las proteínas totales fueron determinadas por el método de Bradford (Bio-RAD, USA), y 100 μ g de proteínas fueron incubados con proteína A-sefarosa (Gibco, MD) previamente acoplada con 3 μ g/ml del anticuerpo anti c-Kit (Boehringer, Germany) 3 μ g/ml de anti- β (R&D Systems Inc. USA) y 3 μ g/ml de anti-PY (Boehringer, Germany) por 2 hrs a 4°C (**Apéndice 13.7.4. y 13.7.5.**). Los inmunoprecipitados fueron lavados 5 veces con Amortiguador de lavado (**Apéndice 13.7.6.**) a 500 g a 4°C. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE.

7.13. ELECTROFORÉSIS (SDS-PAGE)

El SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método de Leammli (Coligan, 1992) excepto que la concentración del gel concentrador utilizada fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (Sigma, USA) (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS (Dodecil Sulfato Sódico) (Sigma, USA) y las concentraciones de acrilamida usadas fueron 7.5% y 12.5% p/v). Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma, USA) y

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina) (TEMED), (Sigma, USA) para el gel de resolución ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. La solución del tanque (pH 8.3) contenía 0.025 M Tris, 0.192 M de glicina (Sigma, USA). Se tomaron 20 μ l de cada uno de los extractos celulares de las líneas CALO e INBL y fueron resuspendidos en amortiguador de Laemmli, las muestras fueron hervidas por 5 min. Se utilizaron marcadores preteñidos (Gibco, MD) que consisten de 12 bandas de 10 a 120 kDa en incrementos de 10 kDa y una banda de 200 kDa. La electroforesis se realizó con voltaje constante de 100 V por 2 hrs en una cámara de electroforesis vertical (Gibco, MD).

7.14. WESTERN- BLOT

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse-Andersen (Coligan, 1992) en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 100 mA durante 2 hrs. El amortiguador de transferencia contenía 25 mM Tris (Sigma, USA), 192 mM de Glicina (Sigma, USA), 20 % (v/v) metanol y 0.05% SDS a pH 8.3 (Sigma, USA). La eficiencia de la transferencia se determinó mediante tinción de la membrana de nitrocelulosa con solución de Ponceau S (Sigma, USA) y desteñida con agua destilada. La nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas fue bloqueada con 5% (p/v) de leche semi-descremada en polvo en amortiguador TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5) (Sigma, USA), durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos: 1 μ g/ml de anti-c-Kit (Boehringer, Germany), por 2 hrs en TBS-5% leche a temperatura ambiente; 2 μ g/ml de anti RIL-2 β (anti-p75), (R&D Systems Inc. USA) en TBS-5% leche incubado por 2 hrs a temperatura ambiente; 1 μ g/ml de anti-PY (Boehringer, Germany) en TBS por 1 hr. Las membranas se lavaron cinco veces con TBS al 0.1% de Tween (Sigma, USA) durante 5 min. Se utilizó un anticuerpo secundario conejo anti-ratón (Sigma, USA) 1:16,000 μ l de TBS-5% leche incubado por 1 hr. Se procedió a lavar como se realizó antes y se incubó con anticuerpo terciario

cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, USA) 1:30,000 μ l de TBS-5% leche por 1 hr. Las membranas fueron lavadas 5 veces como se indicó anteriormente. Finalmente se lavó dos veces por 5 min con TBS solo. Las membranas se revelaron en 5 ml de amortiguador de fosfatasa alcalina (Apéndice 13.7.7.) (Sigma USA), conteniendo 0.82 mg de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) y 1.65 mg de azul de tetrazolio (NBT) (Sigma, USA) (Apéndice 13.7.8. y 13.7.9.). La reacción se detuvo después de 15 min lavando con agua destilada.

7.15. REACCIÓN TUNEL.

Se tomaron 1.5×10^6 células CALO e INBL previamente tratadas, fueron sembradas en platos de 5 ml en presencia de 20 μ M/ml de oligonucleótido antisentido de SF (AS-SF), el cual tiene una longitud de 20 pares de bases que inicia en el codón inicial de transcripción. Los oligonucleótidos antisentido diseñados en base a un ARN específico han sido modificados para mejorar su estabilidad, en ellos los átomos de oxígeno han sido reemplazados por átomos de sulfuro (Cáceres-Cortés, en revisión). Los oligonucleótidos AS-SF y PAKL fueron proporcionados por la Dra T. Hoang, Lab. Hematopoyesis y Leucemia IRCM, Montreal, Québec, Canada.

AS-SF (Antisentido SF) 5' CAA GTT TGT GTC TTC TTC AT 3'
PAKL (Control) 5' TTG TTT ACT GCG TCT ACT AT 3'

Las células CALO e INBL fueron incubadas durante 3 días y posteriormente removidas del sustrato con una solución de tripsina (Sigma USA) al 0.1% en verseno, se lavaron con SAF al 1% de BSA. Las células fueron permeabilizadas con 150 μ l de Tritón X-100 (Sigma, USA) al 0.1% en citrato de sodio al 0.1% por 2 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con SAF al 1% de BSA a 4 °C. Se adicionaron 36.7 μ l de H₂O MilliQ, 10 μ l de TdT (Terminal deoxynucleotidyl tranferase) amortiguador 5X (Gibco, MD), 1.2 μ l (3nmol/ μ l) de dUTP (5-[N-(N-Biotinil)-E-aminoocaproil- γ -amino butiril]-3-aminoalil]-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato) (Sigma,

USA) diluido 1:4 de H₂O MilliQ (5 µl del stock en 15 µl de H₂O MilliQ), 1 µl (3nmol/µl) de dATP (Gibco, USA) a -20°C, 0.8 µl (24UI/µl) de TdT (Pharmacia Biotech), se incubó por 1 hr a 37°C en baño maría, posteriormente se agitó 20-30 min. La reacción fue detenida con 2 µl del ácido EDTA (Etilen-diamin-tetra-acético) al 0.5 M. Las células fueron lavadas con SAF al 1% de BSA. Se adicionó 1 µg de Estreptavidina-FITC más 99 µl de SAF al 1% BSA y se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad total. Posteriormente fueron agitadas 15 min. Las células fueron lavadas con SAF al 1% de BSA y resuspendidas en 50 µl SAF al 1%. Las células fueron colocadas en porta-objetos y fueron centrifugadas por 5 min y se adicionó SAF-glicerol 9:1, se colocó un cubre-objetos y se procedió a hacer las observaciones en el microscopio óptico (Olympus, USA).

7.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo fueron sometidos a un análisis estadístico de prueba de t suponiendo varianzas iguales o análisis de varianza de un solo factor, mediante los paquetes estadísticos del programa Excel.

8. RESULTADOS

8.1. Detección del receptor c-Kit y SF membranal.

Se ha demostrado que diferentes líneas celulares de tumores sólidos humanos como el carcinoma de mama, colón y testículo co-expresan el receptor c-Kit y su ligando SF, lo cual sugiere que este sistema no es exclusivo de células hematopoyéticas. Por lo que en el presente trabajo se procedió a detectar la presencia de c-Kit y SF membranal (SFm) en las líneas celulares tumorales de carcinoma cervical CALO e INBL las cuales fueron incubadas con el anticuerpo anti c-Kit o anti SF humanos; posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con FITC; la evaluación se realizó mediante citometría de flujo. Los resultados confirman, la presencia del receptor c-Kit y SFm en las células CALO (Fig. 4a) así como en las INBL (Fig. 4b); es importante hacer notar que la mayor expresión de SFm se detecta en las INBL con un porcentaje del 25%, mientras que en las CALO se observa aproximadamente el 12%. Asimismo, se determinó la presencia de SF soluble, por lo que se procedió a colectar el medio condicionado de ambas líneas celulares en fase de proliferación exponencial, el cual fue concentrado con membrana de AMICON con un poro de 30 kDa y posteriormente llevado a sequedad en un Speed Vac. Se realizaron ensayos de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal anti SF humano, la reacción fue evaluada utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Los resultados muestran evidencias de la presencia de SF soluble en los medios condicionados de las dos líneas celulares CALO e INBL (Fig. 5); no obstante, la mayor expresión fue detectada en el medio de las células CALO. Esto sugiere un mecanismo de autorregulación en las células de carcinoma de cérvix.

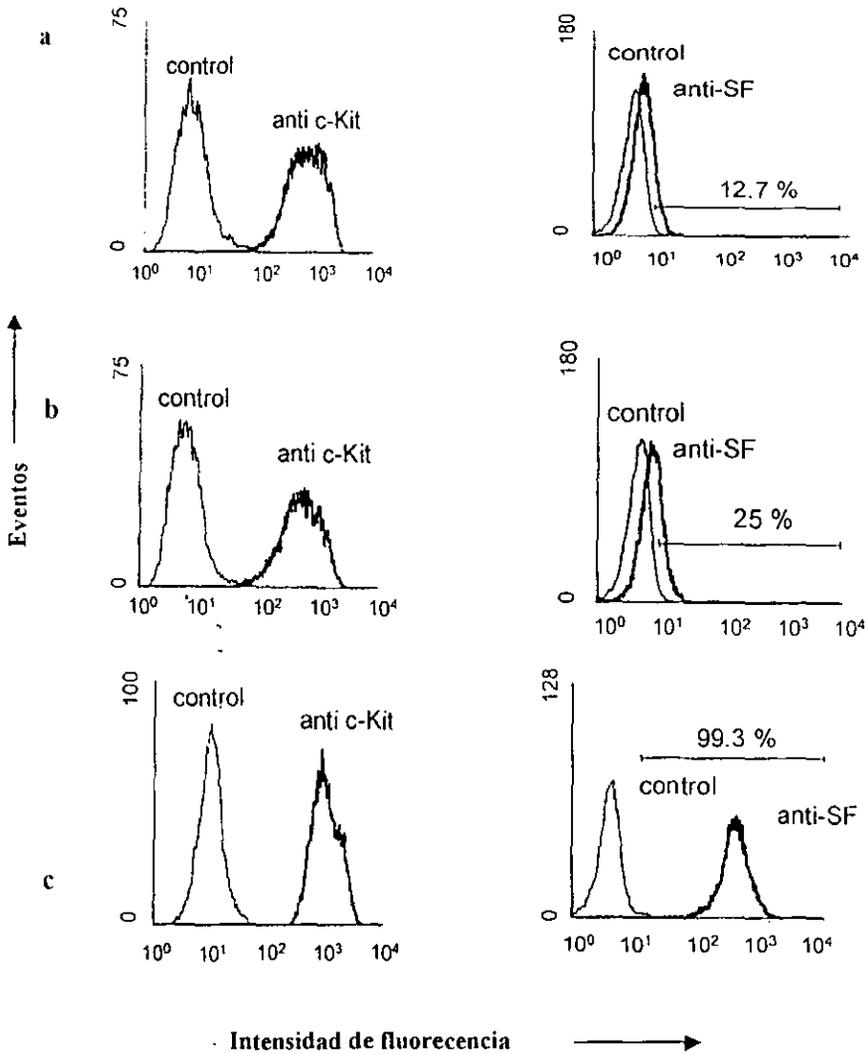


Fig. 4. Coexpresión del c-Kit y el SFm en las líneas celulares de carcinoma cérvico uterino. Las células CALO (a) e INBL (b) fueron analizadas para determinar la expresión de c-Kit y SFm con anticuerpos anti-c-Kit y anti SF mediante citometría de flujo. Las células fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal irrelevante IgG1 como control negativo. Las células TF-1 fueron usadas como control positivo de c-Kit y las p220, la línea celular 3T3 que expresa el SFm humano (c). Los resultados muestran uno de tres experimentos representativos.

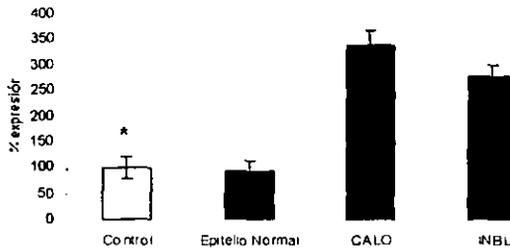


Fig. 5. Expresión de SF soluble. El medio condicionado de las células CALO e INBL colectado y concentrado hasta sequedad, y la determinación de la expresión de SF fue evaluada mediante ensayos de ELISA, utilizando un anticuerpo anti SF y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes, * estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto al medio de CALO e INBL. El % se obtuvo tomando el valor de la absorbencia del control como el 100% de expresión.

8.2. Respuesta biológica al SF.

En trabajos anteriores se determinó la influencia de la IL-2 exógena en la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL, que expresan el RIL-2, y se detectó que a 10 UI/ml se obtiene una mayor respuesta en su proliferación (Alvarado, 1997). Por otro lado, al determinar la presencia del receptor c-Kit en las dos líneas celulares y al conocer que SF es un potente estimulador de la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*, y que combinaciones con citocinas que incluyen a SF pueden mantener la expansión de unidades eritroides formadoras de colonias; se decidió determinar si SF induce el mismo efecto biológico en nuestro modelo de trabajo. Por lo que se realizaron ensayos dosis respuesta de SF evaluados mediante la incorporación de timidina tritiada después de 5 días de cultivo. Se detectó que a altas concentraciones (50 ng/ml) SF inhibe la proliferación. Sin embargo, utilizando una concentración de 10

ng/ml con respecto al control, las células CALO (Fig. 6) e INBL (Fig. 7) muestran una respuesta favorable en su proliferación, asimismo, se pudo comprobar que esta proliferación es mayor en células CALO estimuladas con SF que la obtenida con la IL-2. Sin embargo, este efecto es contrario a lo observado en las células INBL, ya que al estimular con la IL-2 o SF no existen grandes diferencias al utilizar cualesquiera de los dos factores. La co-estimulación de las dos líneas celulares con la IL-2 y SF no produce efecto sinérgico; ya que al parecer se presentan eventos independientes. No obstante, en las células CALO se observa un efecto parcialmente aditivo. En el caso de las células INBL, la sola presencia de SF y la co-estimulación producen el mismo efecto biológico. Estos resultados sugieren una interacción de SF exógeno con su receptor.

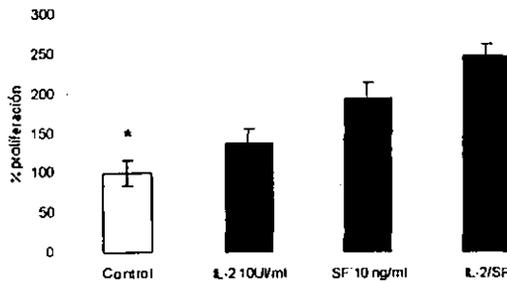


Fig. 6. Efecto de la IL-2 y SF en la proliferación de las células CALO. 1×10^4 células/ml se cultivaron en presencia de la IL-2 y SF. La proliferación celular fue evaluada después de 5 días mediante la incorporación de 3H-Timidina. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes, * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo. El % de proliferación se obtuvo tomando la incorporación de la 3H timidina del control como el 100%.

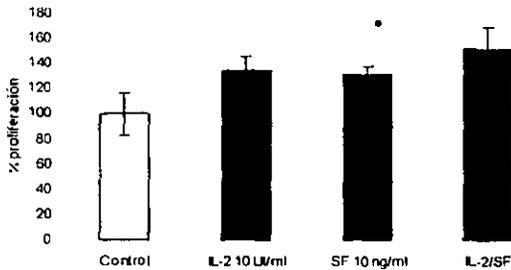


Fig. 7. Efecto de la IL-2 y SF en la proliferación de las células INBL. 1×10^4 células/ml se cultivaron en presencia de la IL-2 y SF. La proliferación celular fue evaluada después de 5 días mediante la incorporación de 3H-Timidina. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes. * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo. • No son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) entre sí. El % de proliferación de obtuvo tomando la incorporación de la 3H timidina del control como el 100%.

8.3. Inducción de la expresión de receptor c-Kit por la IL-2.

Welham (1991) ha sugerido que la IL-3 puede modular la expresión del receptor c-Kit en líneas celulares dependientes de SF y en células de médula ósea normales. En nuestro modelo de trabajo, después de haber observado el efecto de la IL-2 en la proliferación de las células CALO e INBL, las cuales expresan el receptor c-Kit, se decidió evaluar si la IL-2 exógena podría tener alguna relación con c-Kit induciendo su expresión. Por lo que se procedió a incubar a las células en presencia de 10 U/ml de IL-2 a diferentes tiempos; la evaluación se realizó por citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti c-Kit y un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Los resultados muestran que en las células CALO, a las 24 hrs existe una disminución de la expresión de c-Kit con respecto al control; sin embargo, a las 48 hrs se detecta un incremento en la expresión, el cual disminuye a las 72 hr (Fig. 8). Por otro lado, en el caso de las células INBL c-Kit se detecta desde las 24 hrs, dicho incremento se mantiene hasta las 72 hrs con respecto al control; no obstante, a 48 hrs se detecta una ligera disminución (Fig. 9). Esto indica que IL-2 influye en la expresión del receptor c-Kit.

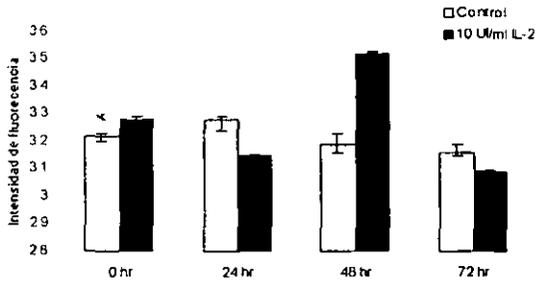


Fig. 8. Inducción del receptor c-Kit por la IL-2 en las células CALO. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos en presencia de la IL-2. EL análisis de la expresión de c-Kit se determinó con anticuerpo anti c-Kit mediante citometría de flujo. Las células fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal irrelevante IgG1 como control negativo. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes, * estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto a las células estimuladas con la IL-2.

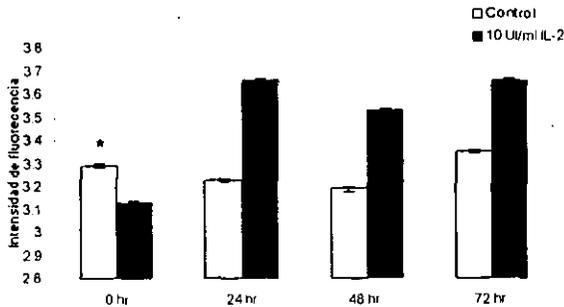


Fig. 9. Inducción del receptor c-Kit por la IL-2 en las células INBL. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos en presencia de la IL-2. EL análisis de la expresión de c-Kit se determinó con anticuerpo anti c-Kit mediante citometría de flujo. Las células fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal irrelevante IgG1 como control negativo. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes, * estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto a las células estimuladas con la IL-2.

8.4. Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos.

Grabstein (1994) demostró que la proliferación celular inducida por la IL-2 puede ser bloqueada por el anticuerpo anti RIL-2 α , sin embargo, el anticuerpo anti RIL- β no produce este efecto inhibitorio. Para demostrar la funcionalidad del RIL-2 β y de c-Kit en la proliferación de las células tumorales CALO e INBL se realizaron cinéticas de proliferación en presencia y ausencia de la IL-2 y del SF exógenos, incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para RIL-2 β , c-Kit así como para la IL-2 y SF. La evaluación se realizó después de tres días mediante la técnica colorimétrica de MTT. Los resultados obtenidos muestran que las células CALO (Fig. 10), como las INBL (Fig. 11), incubadas con anticuerpos monoclonales anti RIL-2 β reducen su tasa de proliferación hasta en un 60% con respecto al control. Estos resultados coinciden con los obtenidos para las células incubadas con anti c-Kit, hecho que sugiere la participación de ambos receptores en la señalización intracelular inducida por la IL-2 y SF endógenos.

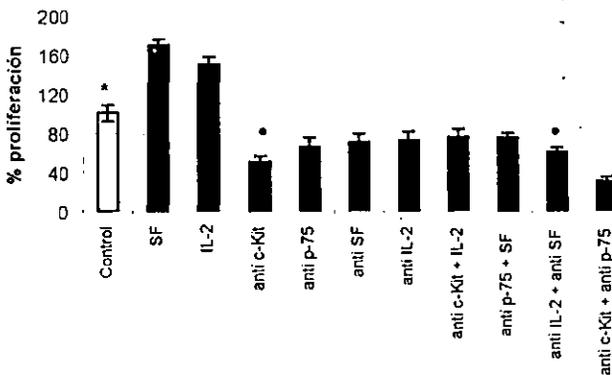


Fig. 10. Inhibición de la proliferación de las células CALO por anticuerpos neutralizantes. 1×10^4 células/ml fueron incubadas en ausencia y presencia de 10 UI/ml de la IL-2 y 10 ng/ml de SF. Asimismo, se utilizaron anticuerpos anti c-Kit, anti p75, anti IL-2, y anti SF. Después de tres días de cultivo se evaluó la proliferación celular mediante la técnica colorimétrica de MTT a 570 nm. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes. * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo. • estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones. El % de proliferación de obtuvo tomando la absorbencia del control como el 100%.

Asimismo, al utilizar anti IL-2 y anti SF, también se bloquean los dos factores endógenos, ya que se observa una disminución del 30% para las células CALO al utilizar anti IL-2 y anti c-Kit, mientras que para las INBL ésta se reduce hasta en un 40%. Por otra parte, se detectó que a pesar de la presencia de la IL-2 o SF exógenos, cuando se utilizan los anticuerpos anti RIL-2 β y anti c-Kit, también se reduce la proliferación de las dos líneas, no obstante, esta reducción es menor a la observada cuando únicamente se utilizan los anticuerpos en ausencia de los factores de crecimiento. De igual manera se detectó una disminución en la proliferación celular al utilizar los anticuerpos anti IL-2 y anti SF.

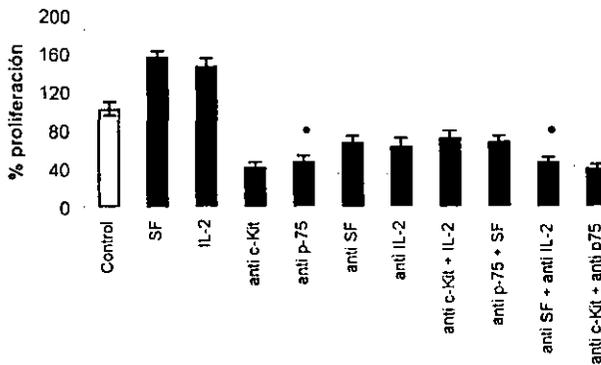


Fig. 11. Inhibición de la proliferación de las células INBL por anticuerpos neutralizantes. 1×10^4 células/ml fueron incubadas en ausencia y presencia de 10 UI/ml de la IL-2 y 10 ng/ml de SF. Asimismo, se utilizaron anticuerpos anti c-Kit, anti p75, anti IL-2, y anti SF. Después de tres días de cultivo se evaluó la proliferación celular mediante la técnica colorimétrica de MTT a 570 nm. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes. * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo. • estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones. El % de proliferación se obtuvo tomando la absorbencia del control como el 100%.

8.5. Inhibición de la proliferación celular por tirfostinas.

Después de haber observado la disminución de la proliferación celular provocada por el bloqueo del RIL-2 β , c-Kit, IL-2 y SF, se decidió inhibir de forma intracelular a proteínas tirosina cinasas que pueden estar participando en la proliferación celular. Las proteínas tirosina cinasas median la señal metabólica intracelular y proliferativa, la cual puede ser bloqueada por inhibidores competitivos específicos como las tirfostinas. Debido a esto se evaluó la especificidad de dos inhibidores de cinasas utilizadas en células hematopoyéticas (Cáceres-Cortés, 1994): Tirfostina B42 (inhibidor de cinasa específica de c-Kit), Tirfostina B48 (amplio espectro de cinasas) y Tirfostina 1 (control negativo). Se realizaron ensayos dosis respuesta con diferentes concentraciones de tirfostinas B42 y B48 en las células CALO e INBL (Datos no mostrados), y se determinó mediante una evaluación por incorporación de 3H timidina, que la presencia de 10 μ M de las Tirfostinas B42 y B48 en los cultivos de ambas líneas celulares incubadas por 5 min y la subsecuente estimulación con 10 UI/ml de la IL-2 y 10 ng/ml de SF durante 5 días de incubación, inhiben la proliferación dependiente de ambos factores de crecimiento tanto en las células CALO (Fig. 12), como en las INBL (Fig. 13). En las células CALO, con respecto al control, la inhibición de la proliferación inducida por la tirfostina B42 es más efectiva en las células estimuladas con SF que las estimuladas con la IL-2, no así para la tirfostina B48, que inhibe de manera similar la proliferación inducida por la IL-2 y SF; asimismo, la tasa de proliferación es menor con respecto a la B42. Para el caso de las células INBL, la tirfostina B42 inhibe de igual forma la proliferación en presencia de IL-2 y SF, sin embargo, al utilizar la B48 se mantiene la misma tasa de proliferación detectada con la B42, sugiriendo un mismo efecto biológico.

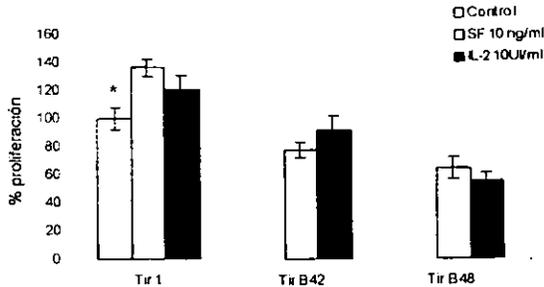


Fig. 12. Efecto de inhibidores de proteínas tirosina cinasas en la proliferación de las células CALO. 1×10^4 células/ml se cultivaron en ausencia (control) y presencia de la IL-2, SF y $10 \mu\text{M}$ de las Tirfostinas 1, B42 y B48. La proliferación celular fue evaluada después de 5 días mediante la incorporación de 3H-Timidina. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes. * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo.

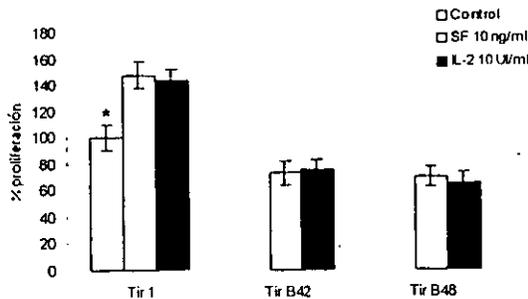
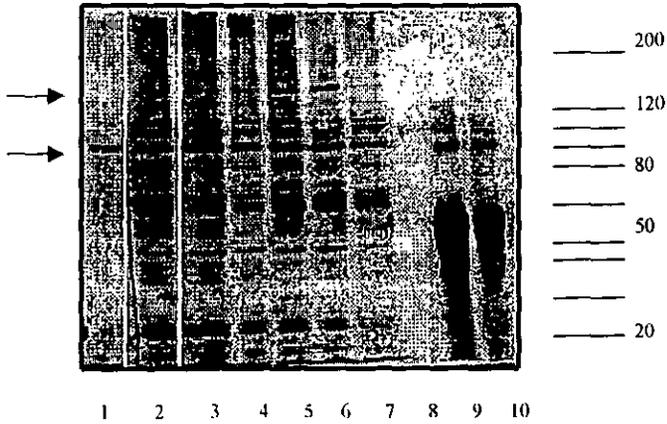


Fig. 13. Efecto de inhibidores de proteínas tirosina cinasas en la proliferación de las células INBL. 1×10^4 células/ml se cultivaron en ausencia (control) y presencia de la IL-2, SF y $10 \mu\text{M}$ de las Tirfostinas 1, B42 y B48. La proliferación celular fue evaluada después de 5 días mediante la incorporación de 3H-Timidina. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes. * estadísticamente diferente ($P < 0.05$) con respecto a las otras condiciones de cultivo.

8.6. Cinética de fosforilación en tirosinas inducidas por la IL-2 y SF.

Para examinar el tiempo de mayor inducción de la fosforilación en tirosinas, las células fueron estimuladas a diferentes tiempos con dosis constantes de IL-2 y SF, los extractos celulares fueron preparados como previamente se describió en "Materiales y Métodos" y se realizó el análisis de los inmunoblots con un anticuerpo anti-fosfotirosina (anti-PY). En las células CALO (Fig. 14) así como en INBL (Fig. 15), en el tiempo cero, se detectó la fosforilación basal en tirosinas, posterior a éste, se observó en ambas líneas celulares un incremento en el patrón de fosforilación a través del tiempo; ya que en el primer minuto aumenta ésta en las dos líneas celulares con la IL-2 y SF. Sin embargo, en términos generales, se puede mencionar de acuerdo a la intensidad de las bandas, que en las células CALO, al minuto 2 se detectó un máximo de la fosforilación en tirosinas dependiente de los factores de crecimiento, mientras que para INBL este efecto se presentó al minuto 3, después del cual la señal disminuye (datos no mostrados). Durante la inducción, es evidente la fosforilación en tirosinas de diferentes sustratos que aumentan o disminuyen con respecto al tiempo de incubación, dando evidencias de la fosforilación de c-Kit a través de SF y de RIL- β por la IL-2.

IP:											α PY		
Tiempo (min.):	0	1	1	2	2	3	3	5		5			
IL-2 (10 UI/ml):	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-			
SF (10 ng/ml):	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+			PM kDa



Blot : α PY

Fig. 14. Comparación del patrón de fosforilación en tirosinas inducida por la IL-2 y SF en las células CALO. Las células fueron incubadas sin suero por 24 hrs, después estimuladas con la IL-2 y SF a diferentes tiempos, lisadas y la cuantificación de las proteínas se realizó por el metodo de Bradford, y 100 μ g de proteína fueron cargadas en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti-PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: CALO sin estímulo; 2-7: CALO con IL-2 y SF; 8: vacio; 9-10: Inmunoprecipiación α PY. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

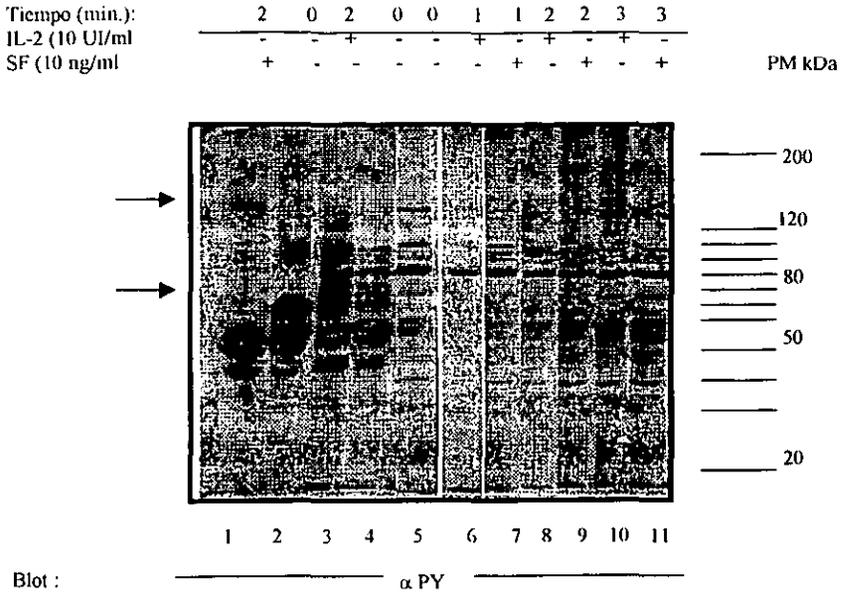


Fig. 15. Comparación del patrón de fosforilación en tirosinas inducida por la IL-2 y SF en las células INBL. Las células fueron incubadas sin suero por 24 hrs, después estimuladas con la IL-2 y SF a diferentes tiempos, lisadas y la cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína fueron cargadas en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1-2: línea celular TF-1; 3-4: linfocitos de sangre periférica; 5: INBL sin estímulo; 6-11 INBL con IL-2 y SF. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

8.7. Identificación de receptor c-Kit y del RIL-2 β .

Para confirmar que las proteínas fosforiladas en tirosina que son de particular interés para nuestro estudio corresponden al RIL-2 β y a c-Kit con un peso molecular aproximado de 75 kDa y 145 kDa, respectivamente y que muestran una mayor fosforilación con respecto al tiempo de inducción con la IL-2 y SF, se realizó la inmunoprecipitación de ambos receptores en las dos líneas celulares con anticuerpos monoclonales anti c-Kit y anti RIL-2 β , y posteriormente un inmunoblot con anti c-Kit y anti RIL-2 β . Las proteínas de las líneas CALO e INBL inmunoprecipitadas con anti RIL-2 β y el inmunoblot anti RIL-2 β (Fig. 16) muestran dos bandas con un peso aproximado que va de 120 a 140 kDa, lo que sugiere la co-precipitación de la cadena γ y del RIL-2, que tiene un peso molecular de 64 kDa como lo reportado para linfocitos T y no la banda que corresponde a 75 kDa, lo que está representado por las dos bandas. Para el caso de la inmunoprecipitación con anti c-Kit y el inmunoblot anti c-Kit (Fig. 17), se detectó una banda que corresponde a un peso entre 140 y 150 kDa, que corresponde a c-Kit, lo que confirma la fosforilación de las bandas que se observan en el perfil de fosforilación total en tirosinas de la figura 14 y 15.

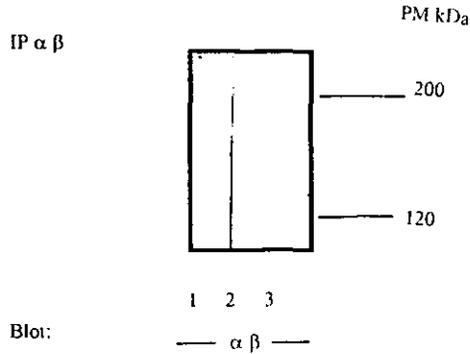


Fig. 16. Detección del RIL-2 β en las células CALO e INBL. Las células fueron incubadas sin suero por 24 hrs, lisadas y la cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína se inmunoprecipitaron con proteína A sefarosa previamente incubada con el anti-RIL-2 β , el inmunoprecipitado fue cargado en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti RIL-2 β fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: Control negativo; 2: CALO; 3: INBL. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

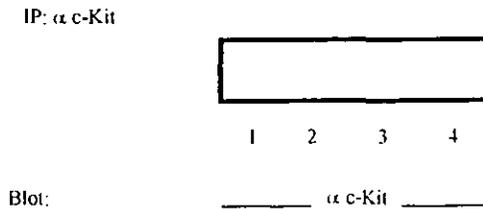
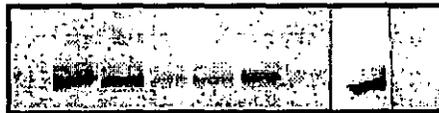


Fig. 17. Detección del receptor c-Kit en las células CALO e INBL. Las células fueron incubadas sin suero por 24 hrs, lisadas y la cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína se inmunoprecipitaron con proteína A sefarosa previamente incubada con el anti-c-Kit, el inmunoprecipitado fue cargado en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti c-Kit fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: HELA (Control negativo de c-Kit); 2: TF-1 (control positivo de c-Kit); 3: CALO; 4: INBL.

8.8. Inhibición de la fosforilación de la cinasa c-Kit por la tirfostina B42.

Una vez determinado el efecto inhibitor de la tirfostina B42 y B48 en la proliferación celular de las dos líneas celulares, se procedió a evaluar si éstos inhibidores bloquean la actividad de tirosina cinasa de c-Kit y evitan que ésta se fosfore. Las células en cultivo fueron incubadas 5 min con Tirfostina 1 y B42 y posteriormente estimuladas 5 min con SF. Se realizó una inmunoprecipitación de c-Kit y el blot anti-PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Las células CALO (Fig. 18) e INBL (Fig. 19) muestran una disminución en la fosforilación de c-Kit en presencia de Tirfostina B42, con respecto al control. Asimismo, este efecto se repite en la línea celular TF-1 (control del ensayo). Esto confirma que en el c-Kit expresado en líneas celulares epiteliales de cáncer de cérvix al igual que el expresado en líneas celulares hematopoyéticas, la tirfostina B42 evita que el dominio de tirosina cinasa sea fosforilado.

IP: α -c-Kit



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Blot:

————— α PY —————

Fig. 18. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Kit por tirfostinas en las células CALO. La células fueron incubadas sin suero 24 hrs, después incubadas 5 min con las tirfostinas 1 y B42 (10 μ M) posteriormente estimuladas con SF por 3 min. Las células fueron lisadas, la cuantificación de la proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína se inmunoprecipitaron con proteína A sefarosa previamente incubada con el anti-c-Kit, el inmunoprecipitado fue cargado en SDS-PAGE a 7.5%. El blot anti PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: Sin estímulo; 2: SF; 3: SF + Tir 1; 4: SF + Tir B42; 5: TF-1 sin estímulo; 6: TF-1 + SF; 7: TF-1+ Tir B42; 8: TF-1 + Tir 1; 9: Control negativo d anticuerpo anti-PY.

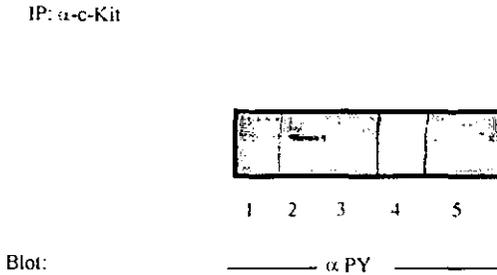


Fig. 19. Inhibición de la fosforilación del receptor c-Kit por tirfostinas en células INBL. Las células fueron incubadas sin suero 24 hrs, después incubadas por 5 min con las tirfostinas 1 y B42 (10 μ M) posteriormente estimuladas con SF por 3 min. Las células fueron lisadas, la cuantificación de la proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína fueron inmunoprecipitadas con proteína A sefarosa previamente incubada con anti-c-Kit, el inmunoprecipitado fue cargado en SDS PAGE al 7.5%, el blot anti PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: Sin estímulo; 2: SF; 3: S + Tir B42; 4: SF + Tir 1; 5: Control negativo de anti-PY.

8.9. Inhibición de la fosforilación del RIL-2 β a través del receptor c-Kit por la tirfostina B42.

Una vez que se determinó que la tirfostina B42 inhibe la actividad de cinasa de c-Kit en nuestro modelo de trabajo, y asimismo, al conocer los estudios en los que se ha observado que c-Kit se asocia físicamente con el REpO de manera intracelular y que en presencia de SF es capaz de fosforilarlo en ausencia de EpO (Wu, 1995), se procedió a confirmar si c-Kit también se asocia con el RIL-2 β . Las líneas celulares CALO e INBL fueron estimuladas con 10 UI/ml de la IL-2 y 10 ng/ml de SF e incubadas por 2 min para las CALO y 3 min para las INBL. Por otro lado, se incubaron las células de ambas líneas con tirfostina 1 y B42 por 5 min y posteriormente estimuladas 2 y 3 min con IL-2 y SF respectivamente. Las células fueron lisadas y los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo monoclonal anti-p75 del RIL-2 (RIL-2 β) y posteriormente un inmunoblot anti PY.

Se detectó la fosforilación del RIL-2 β en las dos líneas celulares CALO (Fig. 20) e INBL (Fig. 21) estimuladas con SF. Asimismo, se demostró con respecto al control, que la presencia de la tirfostina B42 inhibe la fosforilación del RIL-2 β mediada por c-Kit a través de su ligando SF. Es importante señalar que al igual que el inmunoblot anti RIL-2 β de la Fig. 16, también aquí se detectan dos bandas que indican la co-precipitación del RIL-2 γ y el RIL-2 β

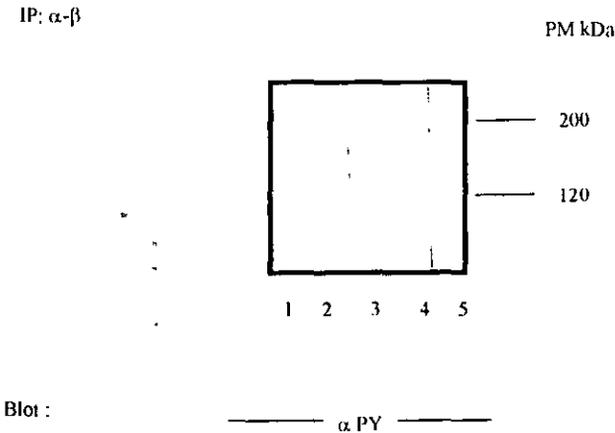


Fig. 20. Inhibición de la fosforilación de RIL-2 β por tirfostinas en células CALO. Las células fueron incubadas sin suero 24 hrs, después incubadas por 5 min con las tirfostinas 1 y B42 (10 μ M), posteriormente estimuladas con la IL-2 y SF por 3 min: Las células fueron lisadas, la cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína fueron inmunoprecipitadas con proteína A sefarosa incubada con el anti-RIL-2 β , el inmunoprecipitado fue cargado en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: Sin estímulo; 2: IL-2; 3: SF; 4: Tir 1 + SF; 5: Tir B42 + SF. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

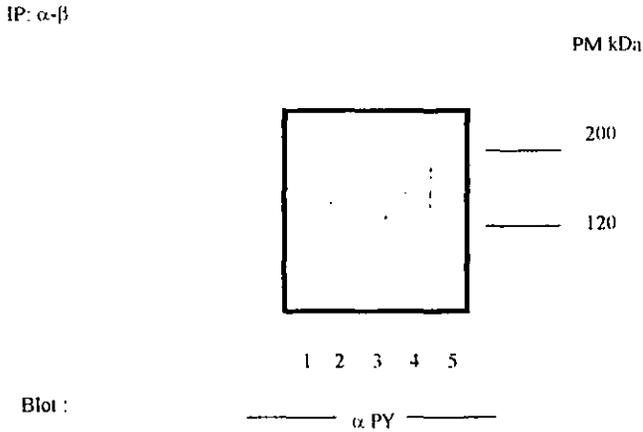


Fig. 21. Inhibición de la fosforilación del RIL-2 β por tirfostinas en células INBL. Las células fueron incubadas sin suero 24 hrs, después incubadas por 5 min con las tirfostinas 1 y B42 (10 μ M), posteriormente estimuladas con la IL-2 y SF por 3 min: Las células fueron lisadas, la cuantificación de las proteínas se realizó por el método de Bradford, y 100 μ g de proteína fueron inmunoprecipitadas con proteína A sefarosa previamente incubada con el anti-RIL-2 β , el inmunoprecipitado fue cargado en SDS-PAGE al 7.5%. El blot anti PY fue revelado con fosfatasa alcalina. Carriles 1: Sin estímulo; 2: IL-2; 3: SF; 4: Tir 1 + SF; 5: Tir B42 + SF. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

8.10. El SF inhibe el proceso de apoptosis.

Las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL producen SF en forma soluble y membranal, por lo que se decidió bloquear esta producción utilizando oligonucleótidos antisentido de SF para evaluar su participación en la regulación de la apoptosis en las células de cáncer cérvico-uterino. Las células CALO e INBL en cultivo, fueron privadas de SFB e incubadas con oligonucleótidos antisentido de SF y después de 3 días se realizó la técnica de la reacción TUNEL. Se observó que las células CALO e INBL muestran un gran porcentaje de mortalidad (Fig. 22), lo que sugiere que el receptor c-Kit y SF endógenos en las células de carcinoma de cérvix realizan un mecanismo autócrino favoreciendo la supervivencia celular.

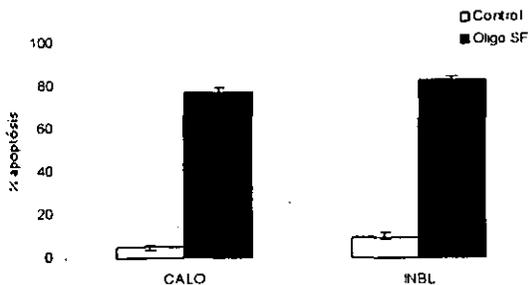


Fig. 22. El oligonucleótido antisentido de SF induce apoptosis en las células CALO e INBL. Las células fueron incubadas con el oligonucleótido de SF y después de tres días se determinó la apoptosis por medio de la reacción TUNEL. El porcentaje de células apoptóticas se determinó calculando el número de células en apoptosis entre el número de células totales por cien. Los resultados muestran la media de tres experimentos diferentes.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los avances en biología molecular han permitido establecer que la carcinogénesis, es el resultado de la acumulación de una serie de alteraciones celulares que involucran, la activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores del tumor (Inoue, 1994). Tal es el caso del receptor c-Kit, el cual está sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer humano como leucemias, cáncer de colon y seminoma (Broudy, 1997). El presente estudio, proporciona evidencias directas de la expresión de c-Kit, y de su ligando SF en dos líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL (Alvarado-Moreno, 1998a) tal como ha sido investigado para otros tumores ginecológicos (Inoue, 1994) y su relación con el receptor para la IL-2.

Por otro lado, datos recientes han identificado diferentes actividades biológicas de las proteínas transmembranales y solubles; y en el caso de SF, se ha detectado un corte y empalme alternativo del ARN mensajero, originando las formas soluble y membranal (SFm) (Ramenghi, 1994; Anderson, 1991). En el sobrenadante de ambas líneas celulares de cáncer de cérvix se detectó SF soluble, siendo mayor la expresión en las células CALO que en las INBL. No obstante la mayor expresión de SFm fue observada en las INBL. Suceso importante, ya que se han detectado funciones específicas de las dos formas de SF para diferentes tipos celulares; la forma soluble principalmente estimula la proliferación celular, y la transmembranal media la adhesión célula-célula; que puede tener un papel importante en asegurar la correcta organización de las vías de migración celular (Flanagan, 1991). Esto se puede correlacionar con la diferencia en el porcentaje de expresión de SF membranal detectado en las células INBL con respecto a las CALO, y esto se puede atribuir al estadio clínico de las biopsias a partir de las cuales se obtuvieron las células, ya que las CALO son de un estadio clínico IIB y las INBL son de uno IVB metastásico; en donde podemos hablar de un mayor grado de transformación celular en el cual se ha logrado invadir y colonizar otros órganos, este comportamiento probablemente

asociado al SFm, ya que la principal actividad biológica se presenta cuando está unido a la membrana (Lev, 1992). Sin embargo, es importante mencionar que hasta el momento este fenómeno se desconoce en nuestro modelo de trabajo. No obstante, esto podría tener relación con una mayor respuesta de las CALO ante la IL-2 y SF exógenos, a diferencia de la respuesta parcial observada en las INBL, ya que posiblemente en la línea celular INBL debido al grado de malignidad, exista un mayor número de receptores mutados que no interaccionen eficientemente con SF, a diferencia de las CALO, en donde al parecer es más sensible al SF exógeno y debido a esto se observe un mayor efecto en su proliferación.

Aunado a esto, ciertos factores de crecimiento, citocinas y hormonas juegan un papel importante en la proliferación de las células malignas, en el caso de las células de cérvix, la presencia de los complejos c-Kit/SF y RIL-2/IL-2 sugiere una activación constitutiva autócrina y parácrina, los cuales podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis (Russell, 1992).

La presencia de SF exógeno induce proliferación de las células CALO e INBL, y una mayor concentración inhibe dicho efecto (datos no mostrados), comportamiento similar a lo observado al estimular a las mismas células con la IL-2 (Alvarado-Moreno, 1997b), o a las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Weidmann, 1992), lo cual sugiere: 1) una saturación de los receptores (Fehniger, 1997), 2) una transducción de la señal aberrante mediada por c-Kit o el RIL-2 a través de las cinasas MAP, las cuales no podrían ser suficientes para conferir la estimulación de la proliferación una de las principales vías de la proliferación celular y 3) a un retraso del ciclo celular en la fase S, que podría inducir una reducción en el número de células en la fase G2/M sugiriendo una prolongada fase S, en la que una gran proporción de las células que entran en ésta tienen dificultad para completar la replicación en presencia de SF (Zakut, 1993) o la IL-2. Esto podría indicar que la IL-2 y SF usadas a altas concentraciones pertenecen a una familia de factores de crecimiento con actividades biológicas opuestas en células malignas, como en el caso de las células de carcinoma hepatocelular, en el que el Factor de crecimiento de hepatocitos tiene efecto opuesto a la proliferación asociada a un cambio en la vía

de señalamiento intracelular (Shiota, 1994). SF induce mayor proliferación que la IL-2 en las células CALO a diferencia de las INBL en la que no existen diferencias significativas con uno u otro factor. En células hematopoyéticas SF es un potente factor sinérgico de la proliferación en asociación con otros factores como el GM-CSF (Broudy, 1997). La vía de señalización intracelular del receptor de tipo tirosina cinasa c-Kit, que aunque también involucra moléculas accesorias, podría ser mucho más rápida que la de IL-2, la cual requiere de otras moléculas accesorias como las cinasas JAK1 y JAK3. Sin embargo, hasta el momento no se tienen evidencias que indiquen que un mayor o menor número de moléculas intermediarias, relacionadas con la transducción de la señal intracelular, den como resultado una activación y proliferación celular en menor o mayor tiempo. Por otra parte, la co-estimulación de la IL-2 y SF no induce un efecto sinérgico en las células CALO como lo observado con diferentes factores de crecimiento hematopoyético, tales como la IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, EpO y GM-CSF en células progenitoras hematopoyéticas (Andrews, 1994, 1995; Fehniger, 1997; Kees, 1999); ya que únicamente se observa un efecto aditivo, lo cual sugiere eventos independientes. Por su parte, la co-estimulación en las INBL no muestra efecto sinérgico ni aditivo, lo que al parecer también sugiere cierta independencia de los dos factores, debido posiblemente al grado de malignidad, que involucren un mayor número de mutaciones en los receptores de c-Kit y del RIL-2 y a una posible activación intracelular (Caruana, 1998; Ferrao, 1997).

Asimismo, en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL se detectó que la IL-2 puede inducir la expresión de c-Kit, sin embargo, esta expresión es diferencial, ya que en el caso de las CALO se da en menor tiempo a diferencia de las INBL. Aunado a esto podemos decir que al igual que otros factores de crecimiento como es el caso de la IL-3, que puede modular la expresión de receptores de c-Kit en líneas celulares dependientes de SF y en células normales (Welham, 1991), la IL-2 induce la activación de genes entre los que podría encontrarse c-kit en células de cáncer cérvico uterino.

Por otro lado, la reducción de la proliferación celular hasta un 50% observada al utilizar el anticuerpo anti c-Kit y anti SF en las líneas celulares CALO e INBL, tal como lo demostrado en líneas celulares hematopoyéticas normales y tumorales (Broudy, 1992), y al igual que al utilizar anticuerpos para el RIL-2 α y β en células de tumores sólidos, sugiere que los complejos RIL-2/IL-2 y c-Kit/SF están involucrados en mecanismos de regulación autócrina (Alvarado-Moreno, 1997a; Weidmann, 1992; Yasumura, 1994).

Sin embargo, la utilización de los anticuerpos anti c-Kit en presencia de la IL-2 o anti RIL-2 en presencia de SF exógenos revelan la importancia de los dos receptores en la regulación de la proliferación celular, además, que así como la IL-2 y SF endógenos, la presencia de SF o la IL-2 exógenos no pueden activar la proliferación, posiblemente debido al bloqueo de sitios específicos de unión en los receptores; asimismo, nos sugiere que probablemente no existe activación de receptores en el interior de la célula. Finalmente, se podría sugerir que la sola presencia de los anticuerpos en los cultivos al interaccionar con los antígenos específicos como el RIL-2 β , c-Kit o con IL-2, SF y SFm, al estar éstos asociados (anticuerpo-receptor o anticuerpo-ligando-receptor) en la superficie celular, pudieran iniciar la activación y la internalización de dichos complejos y que bajo la influencia de tales anticuerpos podría llevarse a cabo el inicio del proceso de apoptosis o muerte celular programada *in vitro* (Lavrovsky, 1999; Wu, 1995; Sasaki 1998). Sin embargo, para descartar la posibilidad de que la sola presencia de los anticuerpos unidos a su antígeno específico en la membrana celular pudieran inducir el proceso de apoptosis, sería necesario en estudios posteriores la evaluación de dichos mecanismos en tales situaciones.

Por otra parte, para demostrar la capacidad de unión de la IL-2 al RIL-2 y de SF al c-Kit, ambos ligandos fueron marcados con un fotorreactivo, el complejo se adicionó a las células en cultivo y se detectó la formación del complejo ligando receptor (datos no mostrados). El evento inicial de la señalización para la proliferación celular mediada por los factores de crecimiento es la unión a sus receptores específicos, que pueden tener actividad intrínseca de cinasas como el receptor c-Kit o sin ella como el RIL-2, que pertenece a la superfamilia de

receptores de citocinas, el cual se asocia con proteínas citosólicas para realizar esta actividad, y que están implicados en la estimulación de la proliferación de diferentes tipos celulares. Sin embargo, estos patrones de señalización no son exclusivos de células hematopoyéticas normales. En nuestro modelo experimental, la presencia de la IL-2 o de SF en las células de CaCu activa diferentes proteínas tirosina cinasas (Alvarado-Moreno, 1998b); no obstante el hecho de haber observado fosforilación en tirosinas sin ningún estímulo nos sugiere que tanto en las células CALO como en las INBL se lleva a cabo el mecanismo autócrino de activación de la cascada de señalización intracelular a través de la IL-2 y SF endógenos, (además de otros mecanismos de señalización que no involucren a tales factores), siendo ésta mayor en las NBL, y esto a su vez pueda estar correlacionado de acuerdo al estadio clínico. No se descarta la posibilidad de la existencia de alteraciones en la secuencia de aa de la proteína de c-Kit o del RIL-2 β , las cuales podrían favorecer la autofosforilación sin la presencia e internalización del receptor inducida por el factor (Ferrao, 1997; Beghini, 1998a; Taniguchi, 1999) o a una activación o estimulación intracelular, que también está involucrada en los mecanismos de transformación y tumorigénesis (Heldin, 1989). No obstante sería importante en estudios posteriores hacer una secuenciación de los aa que forman las proteínas de c-Kit y el RIL-2 en las células de cáncer cérvico uterino para determinar si se presentan dichas situaciones.

Sin embargo, de acuerdo a los eventos de fosforilación en tirosina mediados por la presencia de la IL-2 y SF a través del tiempo, podemos mencionar lo siguiente: el grado de fosforilación aumenta con respecto al tiempo y llega a un punto máximo aproximadamente a los 2 min para el caso de CALO, mientras que para INBL en el min 3 después de la adición de los factores, ya que al minuto 5 se detectó una disminución de ésta (datos no mostrados), como lo observado en células hematopoyéticas (Welham, 1992). El estado en el nivel de fosforilación en tirosinas en alguna proteína es determinado por acciones opuestas a través de proteínas tirosinas cinasas (PTKs) y proteínas fosfatasas (PTPs). Los dos tipos de receptores presentes en las células de CaCu evocan eventos de

fosforilación en tirosinas para transducir la señal generada por sus ligandos específicos, lo cual sugiere que en nuestro sistema este nivel de fosforilación se regula mediante dichas enzimas; sin embargo, es importante mencionar que c-Kit es regulado negativamente a través de la proteína tirosina fosfatasa conocida como SHP-1 (Lorenz, 1996), y en el caso del RIL-2 la estimulación de la IL-2 induce la fosforilación de la proteína tirosina fosfatasa conocida como SHP-2 a través del RIL-2 β (Adachi, 1997; Ellery, 2000), que regula negativamente la fosforilación. En estudios posteriores sería interesante determinar si efectivamente en nuestro modelo de trabajo, tales enzimas son activadas con los ligandos específicos para éstos receptores.

Asimismo, se observan diferencias en los patrones de fosforilación inducidos por la L-2, por ejemplo, una banda que corresponde a la proteína del RIL-2 β de 75 kDa o a c-Kit fosforilada por SF con un peso aproximado de 145 kDa. Sin embargo, algunos de los eventos de fosforilación observados en tirosinas en las células sugieren que la IL-2 y SF siguen algunas vías de fosforilación comunes como la PI3K, raf-1 o las MAP cinasas, ya que a diferencia de los linfocitos de sangre periférica normal que expresan RIL-2 y la línea celular TF-1 que expresa c-Kit, no se observan los mismos patrones de fosforilación como por ejemplo, en la línea TF-1 la fosforilación de c-Kit en presencia de SF, esto podría indicar que en los procesos de transformación celular existe interacción de receptores con sustratos intracelulares diferentes.

En la inmunoprecipitación del RIL2 β se detectaron dos bandas con aparente peso molecular entre 130 y 140 kDa, lo cual sugiere que la cadena β co-precipita con la cadena γ del RIL-2, ya que al ser activadas forman una fuerte interacción, que evita que puedan ser separadas y debido a esto las dos co-precipitan (Voss, 1992; 1993). Para el caso de c-Kit, el resultado de la inmunoprecipitación muestra que éste tiene un peso aproximado entre 140 y 150 kDa, similar al reportado en células hematopoyéticas de médula ósea humanas (Broudy, 1999).

Para determinar la funcionalidad de c-Kit, se decidió bloquear al receptor de manera intracelular a través de los inhibidores competitivos específicos de la

cinasa c-Kit en células hematopoyéticas conocidos como tirfostinas (Cáceres-Cortés, 1994). La tirfostina B42 específica de la cinasa c-Kit disminuyó la tasa de proliferación en las dos líneas celulares estimuladas con SF, presentando un comportamiento similar al observado en una línea celular de leucemia mieloide humana M07-E, con un inhibidor (STI 571) de receptores de tirosina cinasa, del factor de crecimiento derivado de plaquetas al que pertenece c-Kit (Heinrich, 2000). Es interesante mencionar el hecho de que en presencia de la IL-2 las células reprimieron su proliferación, lo cual nos habla de la funcionalidad de la cinasa c-Kit en las células de CaCu; asimismo, sugiere que c-Kit es importante para transmitir la señal mitótica al núcleo e inducir la proliferación a pesar de la presencia de la IL-2. Para el caso de la Tirfostina B48 de un amplio espectro de inhibición de cinasas, la proliferación se reduce aún más que con la tirfostina B42 lo cual era de esperarse ya que la activación inducida por el ligando SF del receptor de tirosina cinasa c-Kit y la IL-2 a través de su receptor, son eventos iniciales de la ruta de señalización que involucran la fosforilación de otras proteínas citosólicas con actividad de cinasas que median la señal mitogénica de la membrana al núcleo y desencadenan los mecanismos de proliferación celular (Ullrich, 1990). Este hecho fue confirmado al incubar a las células CALO e INBL con la tirfostina B-42 e inmunoprecipitar a c-Kit, ya que la banda detectada con un peso molecular aproximado de 145 kDa es una de las más prominentes bandas fosforiladas en presencia de SF, y la presencia de la tirfostina la reduce fuertemente. Aunado a esto, la disminución de la fosforilación de c-Kit en presencia del inhibidor sugiere la funcionalidad de c-Kit en las células de CaCu para activar la vía de señalización intracelular (Miyazawa, 1995).

Asimismo, se encontró que el receptor c-Kit fosforila al RIL-2 β y al utilizar la tirfostina B42, ésta disminuye la fosforilación del RIL-2 β . Nuestros resultados sugieren que c-Kit se asocia e interacciona con otros sustratos como el RIL-2 β para activar la cascada de señalización intracelular mediante la fosforilación en tirosinas (Alvarado-Moreno, 2000). Sin embargo, es de interés particular determinar en que región del dominio citosólico del RIL-2 se lleva a cabo tal interacción, ya que en líneas celulares de progenitores eritroides dependientes de

la EpO se ha demostrado que c-Kit se asocia físicamente con la región box 2 del REpO, en el dominio 339-374 aa, sitios esenciales para la unión a JAK2, la cual es importante para llevar a cabo la mitogénesis (Wu, 1995). En la cascada de señalización intracelular originada por la IL-2 en linfocitos T, segmentos importantes del RIL-2 β , como la región ácida o la región rica en serina, se asocian con la JAK1, la JAK3 y el RIL-2 γ (Kawahara, 1995; Théze, 1996), que son proteínas accesorias importantes para llevar a cabo la transducción de señales inducida por la IL-2. Por lo que en nuestro modelo de estudio, sería importante detectar en que región del RIL-2 β se asocia el receptor c-Kit para determinar que ruta de señalización celular se activa y las moléculas accesorias asociadas a ésta se involucran en las células tumorales.

C-Kit/SF es importante para la supervivencia, proliferación y migración de las células no hematopoyéticas, tales como las células germinales y melanocitos. En las células epiteliales de cáncer cérvico uterino, c-Kit puede fosforilar y activar otro linaje de receptores específicos para inducir la proliferación (Cáceres-Cortés, 1999). Se describe aquí un nuevo sustrato de c-Kit, la cadena β del RIL-2, cuya activación puede afectar la proliferación celular de líneas que expresan ambos receptores tales como el linfoma y carcinoma cervical, en donde la presencia de c-Kit y SF puede conferir sobrevivencia, ya que al utilizar oligonucleótidos antisentido de SF, se induce la muerte celular programada o apoptosis la cual podría estar dada por una disminución del pH intracelular ocasionada una reducción del intercambio Na^+/H^+ (Cáceres-Cortés, 1994) y de ésta manera sostener la proliferación de este linaje celular, lo cual proporciona información valiosa sobre la regulación del microambiente celular en las células de carcinoma cervical. Sin embargo, es importante dilucidar las bases bioquímicas de la interacción observada en nuestro modelo experimental, ya que esto nos proporcionaría datos interesantes sobre los sustratos involucrados en la ruta de señalización intracelular que complementan dicha interacción.

Los resultados obtenidos en el presente estudio podrían tener una implicación clínica de gran trascendencia en el tratamiento de los pacientes que padecen cáncer cervical; sin embargo, es importante mencionar que hasta este

momento los estudios realizados no son suficientes, ya que se habla de resultados en condiciones *in vitro*, por lo que es primordial iniciar protocolos de investigación enfocados al uso de ratones, a los que se les pueda inducir el tumor y posteriormente utilizar los anticuerpos anti c-Kit o anti RIL-2; el oligonucleótido antisentido de SF o la IL-2. Sin embargo, sería de particular interés estudiar los mecanismos necesarios para introducir las moléculas en dichos ratones y determinar la eficiencia de éstas.

Se sabe que el cáncer cérvico uterino es una de las enfermedades más comunes de la mujer (Parkin, 1993) y que en México es considerado como un problema de salud pública (Muñoz, 1997), debido a que las evidencias epidemiológicas reportan que alrededor del 90% de los casos de cáncer cervical están estrechamente relacionados con el papiloma virus humano (HPV); y de los más de 30 tipos de HPV que infectan el cérvix uterino, los de mayor incidencia son el tipo 16 y 18; lo cual sugiere una relación causante entre la infección y la carcinogénesis (Bosch, 1995). En las dos líneas celulares utilizadas en nuestro modelo de trabajo se ha demostrado la presencia del HPV tipo 18. Asimismo, se sabe que los genes E6 y E7 del HPV transforman *in vitro*, líneas celulares de fibroblastos, queratinocitos y células epiteliales (Kondoh, 1991), y en ratones transgénicos el HPV 18, el complejo c-Kit/SF induce la aparición de tumor testicular con una alta incidencia (Kondoh, 1995), lo que sugiere una relación entre el HPV y la expresión del complejo. Sin embargo, la presencia del HPV por sí sólo no puede transformar totalmente las células, o causar desarrollo de tumor en animales inmunodeficientes, no obstante, junto con otros factores y diferentes oncogenes activados pueden provocar tales efectos. Por lo que en estudios posteriores sería interesante evaluar la influencia de la presencia del HPV en la expresión de c-Kit en el proceso de transformación celular.

Finalmente, se puede mencionar que este estudio forma las bases para futuras caracterizaciones moleculares de componentes comunes de la vía de transducción de señales en células de cáncer cérvico uterino que involucran al receptor c-Kit y a la cadena β del RIL-2.

10. CONCLUSIONES

- El receptor c-Kit así como su ligando el SFm son expresados en la membrana citoplásmica de las líneas celulares CALO e INBL.
- El SF y la IL-2 exógenos inducen proliferación en las dos líneas celulares.
- La IL-2 exógena induce la expresión de c-Kit en la membrana celular.
- Los anticuerpos monoclonales anti c-Kit y anti SF reprimen la proliferación celular.
- La co-estimulación de SF y la IL-2 produce un efecto aditivo en CALO y no en INBL.
- Los anticuerpos monoclonales específicos contra c-Kit y SF son neutralizantes y reprimen la proliferación.
- El inhibidor específico de la cinasa de c-Kit (Tir B42) bloquea la fosforilación en tirosinas del receptor c-Kit, y reduce la proliferación en presencia de SF exógeno.
- Se detectó que c-Kit fosforila la cadena β del RIL-2 expresado en las dos líneas celulares y que al utilizar el inhibidor Tir B42 se inhibe la fosforilación de la cadena β del RIL-2.
- El oligonucleótido antisentido de SF induce apoptosis de ambas líneas celulares.

11. PRINCIPALES CONTRIBUCIONES

El complejo SF/c-Kit esta expresado en tumores ginecológicos como las células de carcinoma cervical, y la presencia de SF exógeno induce la proliferación celular. Asimismo, se determinó que los anticuerpos neutralizantes contra c-Kit y SF reducen la tasa de proliferación celular.

El inhibidor específico de la cinasa c-Kit (Tir B42) en células hematopoyéticas bloquea la fosforilación y por lo tanto reduce su proliferación. Por otra parte, se demostró un nuevo sustrato identificado de c-Kit, la cadena β del RIL-2, la cual puede ser fosforilada por éste.

Por otra parte, la presencia del oligonucleótido antisentido de SF induce la apoptosis de las células de cáncer de cérvix CALO e INBL.

12. BIBLIOGRAFIA

Adachi M, Ishino M, Torigoe T, Minami Y, Matozaki T, Miyazaki Tadaaki, Taniguchi T, Hinoda Yuji, Imai Kohzoh. Interleukin-2 induces tyrosine phosphorylation of SHP-2 through IL-2 receptor β chain. 1997. *Oncogene* 14:1629.

Adachi M, Sekiya M, Torigoe T, Takayama S, Reed JC, Miyazaki T, Minami Y, Taniguchi T, Kohzoh I. Interleukin-2 (IL-2) upregulates BAG-1 gene expression through serine-rich within IL-2 receptor β chain. 1996. *Blood* 88:4118.

Adachi M, Torigoe T, Sekiya M, Minami Y, Taniguchi T, Hinoda Y, Yachi A, Reed JC, Imai K. IL-2 induced gene expression of protein-tyrosine phosphatase LC-PTP requires acidic and serine within IL-2 receptor β chain. 1995. *FEBS Lett* 372:113.

Aggarwal BB, Gutterman JU, 1992. Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. Blackwell Scientific Publications. USA. pp. 1-442.

Alilèche A, Plaisance S, Han DS, Rubinstein E, Mingari C, Bellomo R, Jasmin C, Azzarone B. Human melanoma cell line M14 secretes functional interleukin 2. 1993. *Oncogene* 8:1791.

Alvarado-Moreno JA. Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (IL-2) en células tumorales de carcinoma cervico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de licenciatura. 1997a.

Alvarado-Moreno JA, Soto Cruz I, Weiss SB, Rangel CR. Respuesta proliferativa de las líneas celulares de CaCu a bajas concentraciones de IL-2 y su efecto sobre la expresión del receptor. 1997b. Memorias y comentarios de la IV Reunión de cáncer en México. UNAM pp 88.

Alvarado-Moreno JA, Cáceres-Cortés J, Soto-Cruz I, Cerbón-Cervantes MA, Weiss-Steider B, Rangel-Corona R. Evidencia de la presencia del receptor tirosina cinasa c-Kit en células de carcinoma de cérvix. 1998a. XXXIX Jornada anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología. México. Resumen.

Alvarado-Moreno JA, Cáceres-Cortés J, Weiss-Steider B, Rangel-Corona R. Tyrosine phosphorylation on cervical cancer cells by Steel Factor. 17th International Cancer Congress. International Proceedings Division. Monduzi Editore. Rio de Janeiro Brasil. 1998b. Abstract Book 324.

Alvarado-Moreno JA, Cáceres-Cortés JR, Rangel-Corona R. Interacción de receptores de IL-2 y c-Kit. XLI Congreso Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología. 2000. México. Gac Méd Méx, 136 suplemento 2:S-177.

Anderson MD, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S, Eisenman J, Cannizzaro LA, Aronson M, Croce CM, Huenbner K, Cosman D, Lyman SD. Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. 1991. *Cell Growth Differ* 2:373.

Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, Williams DE. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. 1990. *Cell* 63:235.

Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, Opie T, Bronsden M, Myerson D, Appelbaum FR, McNiece IK. In vivo synergy between recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in baboons enhanced circulation of progenitor cells. 1994. *Blood* 84:800.

Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, Rowley SD, Appelbaum FR, McNiece IK. Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates. 1995. *Blood* 85:15.

Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massagué J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. 1996. *J Biol Chem* 271:11376.

Arzt E, Steizer U, Renner M, Lange O, Muller A, Stalla GK. Interleukin 2 and interleukin2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. 1992. *J Clin Invest* 90:1994.

Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. 1990a. *Immunol Today* 11:350.

Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptors superfamily. 1990b. *Proc Nat Acad Sci USA* 87:6934.

Beghini A, Cairoli R, Morra E, Larizza L. In vivo differentiation of mast cells from acute myeloid leukemia blast carrying a novel activating ligand-independent c-kit mutation. 1998a. *Blood Cells Mol Dis* 24:262.

Blechman JM, Lev S, Barg J, Eisentein M, Vaks B, Vogel Z, Givol D, Yarden Y. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. 1995. *Cell* 80:103.

Blouin R, Bernstein A. 1993. The white spotting and steel hereditary anemias of the mouse, in Feig SA, Freedman MH (eds): *Clinical Disorders and Experimental Models of Erythropoietic Failure*. Boca Raton, FL, CRC. pp. 157.

Bolen JB. Protein tyrosine kinases in the initiation of antigen receptor signaling. 1995. *Curr Opin Immunol* 7:306.

Bortner CD, Oldenburg BE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. 1995. *Trends in Cell Biol* 5:21.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. 1995. *J Natl Cancer Inst* 87:796.

Brinton LA. 1992. Epidemiology of cervical cancer-overview. In: N. Muñoz, F.X. Bosch, K. V. Shah, A. Meheus (eds.), *The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*. Oxford University Press, Oxford. pp. 3-22.

Brizzi MF, Avanzi GC, Pegoraro L. Hematopoietic growth factor receptors. 1991. *Int J Cell Cloning* 9:274.

Broudy V, Lin NL, Liles WC, Corey SJ, O'Laughlin B, Mou S, Linnekin D. Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. 1999. *Blood* 94:1979.

Broudy VC, Lin N, Zsebo KM, Birkett NC, Smith KA, Bernstein ID, Papayannopoulou TH. Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. 1992. *Blood* 79:338.

Broudy VC, Smith FO, Lin N, Zsebo KM, Egrie J, Bernstein ID. Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. 1992. *Blood* 80:60.

Broudy, VC. Stem cell factor and hematopoiesis. 1997. *Blood* 90:1345.

Cáceres-Cortés J, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hematopoietic cells. 1994. *J Biol Chem* 269:12084.

Cáceres-Cortés J, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-García A, Rocha-Zavaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. Implication of c-Kit and steel factor in cell-density dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res* (En revisión).

Cáceres-Cortés JR, Alvarado-Moreno JA, Rangel-Corona R, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. Implication of c-Kit and Steel Factor in cell-density dependent growth in hematological and non-hematological tumors.

1999. 41st Reunión Anual de la Sociedad Americana de Hematología, Nueva Orleans, USA. Blood 94 supplement 1:74a abstract 319.

Cain K, Inayat-Hussain SH, Wolfe JT, Cohen GM. DNA fragmentation into 200-250 and/or 30-50 kilobase pair fragments in rat liver nucleic is stimulated by Mg^{2+} alone and Ca^{2+}/Mg^{2+} but not by Ca^{2+} alone. 1994. FEBS Lett 349:385.

Caligiuri MA, Zmuidzinas TJ, Manley H, Levine KA, Smith J. Functional consequences of interleukin-2 receptor expression on resting human lymphocytes: identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. 1990. J Exp Med 171: 1509.

Caruana G, Cambareri AC, Gonda TJ, Ashman LK. Transformation of NIH3T3 fibroblasts by the c-Kit receptor tyrosine kinase: effect of receptor density and ligand-requirement. 1998. Oncogene 16:179.

Ciacchi C, Dignass MA, Koizumi M, Podolsky DK. Functional interleukin 2 receptors on intestinal epithelial cells. 1993. J Clin Invest 92:527.

Clarke PGH, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. 1996. Anat Embryol 193:81.

Cohen PS, Chan JP, Lipkuns kaya M, Biedler JL, Seeger RC. The Children's Cancer Group: Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. 1994. Blood 84:3465.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. 1992. Current protocols in immunology. Vol. 1. National Institutes of Health. USA.

Coventry BJ, Weeks SC, Heckford SE, Sykes PJ, Bradley J, Skinner JM. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma. 1996. J Immunol 156:3486.

D'Andrea AD, Lodish HF, Wong G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. 1989. Cell 57:277.

deCastro CM, Denning SM, Langdon S, Vandembark GR, Kurtzberg J, Searce R, Haynes BF, Kaufman RE. The c-kit proto-oncogene receptor is expressed on a subset of human CD3⁻ CD4⁺ CD8⁻ (triple-negative) thymocytes. 1994. Exp Hematol 22:1025.

Dignass AU, Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. 1996. Exp Cell Res 225:422.

Ellery JM, Kempshall SJ, Nicholls PJ. Activation of the interleukin 2 receptor: a possible role for tyrosine phosphatases. 2000. Cellular Signalling 12:367.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. 1999. *Annu Rev Biochem* 68:383.

Faust EA, Saffran DC, Toksoz D, Williams DA, Witte O. Distinctive growth requirements and gene expression patterns distinguish progenitor B cells. 1993. *J Exp Med* 177:915.

Fehniger TA, Carson WE, Mrózek E, Caligiuri MA. Stem cell factor enhances interleukin-2-mediated expansion of murine natural killer cells in vivo. 1997. *Blood* 90:3647.

Ferrao P, Gonda TJ, Ashman LK. Expression of constitutively activated human c-Kit in Myb transformed early myeloid cells leads to factor independence, histiocytic differentiation, and tumorigenicity. 1997. *Blood* 90:4539.

Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the c-kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sl^d* mutant. 1991. *Cell* 64:1025.

Fung MR, Scarce RM, Hoffman JA, Pepper NJ, Hammes SR, Hosking JB, Schmandt R, Greene WC. A tyrosine kinase physically associates with the β -subunit of the human IL-2 receptor. 1991. *J Immunol* 147:1253.

Galli ST, Zsebo KM, Geissler E. The kit ligand, stem cell factor. 1994. *Advances in Immunol* 55:1.

Grabstein K.H, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdeih M, Johnson L, Alderson MR, Watson JD, Anderson DM, Giri JG. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin 2 receptor. 1994. *Science (Wash. DC)* 264:965.

Green AR, Salvaris E, Begley C. Erythroid expression of the "helix-loop-helix" gene, *scl*. 1991. *Oncogene* 6:475.

Han DS, Pottin-Clemenceau C, Imro MA, Scudeletti M, Doucet C, Puppo F, Brouty Boyé D, Vedrenne J, Sahraoui Y, Brailly H, Poggi A, Jasmin C, Azzarone B, Indiveri F. IL-2 triggers a tumor progression process in a melanoma cell line MELP, derived from a patient whose metastasis increased in size during IL-2/INF- α biotherapy. 1996. *Oncogene* 12:1015.

Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. 1988. *Science* 241:42.

- Hannun Y. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. 1997. *Blood* 89:1845.
- Hatakeyama M, Kawahara A, Mori H, Taniguchi T. c-fos gene induction by interleukin 2 receptor: Identification of the critical cytoplasmic regions within the interleukin 2 receptor β chain. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2022.
- Hatakeyama M, Kono T, Kobayashi N, Kawahara A, Levin SD, Perlmutter RM, Taniguchi T. Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56. Identification of novel intermolecular association. 1991. *Science* 252:1523.
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. 2000. *Blood* 96:925.
- Heldin CH: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. 1995. *Cell* 80:213.
- Heldin CH, Westermark B. Growth factors as transforming proteins. 1989. *Eur J Biochem* 184:487.
- Hu Z-B, Ma W, Uphoff CC, Quentmeier H, Drexler H. c-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines. 1994. *Blood* 83:2133.
- Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu T-Y, Buck J, Lahm H-W, Wellner-D, Leder P, Besmer P: The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. 1990. *Cell* 63:225.
- Hunag EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. 1992. *Mol Biol Cell* 3:349.
- Inoue M, Kyo S, Fujita M, Enomoto T, Kondoh G. Coexpression of the c-kit receptor and stem cell factor in gynecological tumors. 1994. *Cancer Res* 54:3049.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. 1997. *Cell* 88:347.
- Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD, O'Shea JJ. Tyrosine phosphorylation and activation of Stat 5, Stat 3 and Janus kinases by IL-2 and 15. 1995. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8705.
- Johnston JA, Kawamura M, Kirken RA, Chen YQ, Blake TB, Shibuya K, Ortaldo JR, McVicar DW y O'Shea JJ. Phosphorylation and activation of the Jak-3 janus kinase in response to interleukin 2. 1994. *Nature (Lond.)* 370:151.

Kaplan D. Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. 1996. *Immunol Today* 17:303.

Karnitz LM, Burns LA, Sutor SL, Blenis J. Interleukin-2 trigger a novel phosphatidylinositol 3-kinase dependent MEK activation pathway. 1995. *Mol Cell Biol* 15:49.

Kawahara A, Minami Y, Miyazaki T, Ihle JN, Taniguchi T. Critical role of the interleukin 2 (IL-2) receptor γ -chain-associated Jak3 in the IL-2-induced c-fos and c-myc, but not bcl-2, gene induction. 1995. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8724.

Kees UR, Ford J. Synergistic action of stem-cell factor and interleukin-7 in a human immature T-cell line. 1999. *Immunol* 96:202.

Kerr, JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. 1972. *Br J Cancer* 26:239.

Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF. Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. 1991. *EMBO J* 10:2425.

Kitayama H, Kanakura Y, Furitsu T, Tsujimura T, Oritani K, Ikeda H, Sugahara H, Mitsui H, Kanayama Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y. Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. 1995. *Blood* 85:790.

Kitayama H, Tsujimura T, Matsumura Y, Oritani K, Ikeda H, Ishikawa J, Okabe M, Suzuki M, Yamamura K-i, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Kanakura Y. Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. 1996. *Blood* 88:995.

Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nakano R. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. 1999. *Cancer* 85:1799.

Kondoh G, Hayasaka N, Nishimune Y, Hakura A. An *in vivo* model for receptor tyrosinekinase autocrine/paracrine activation: auto-stimulated KIT receptor acts as a tumor promoting factor in papillomavirus-induced tumorigenesis. 1995. *Oncogene* 10:341.

Kondoh G, Murata Y, Aozasa K, Yutsudo M, Hakura A. Very high incidence of germ cell tumorigenesis (seminomagenesis) in human papillomavirus type 16 transgenic mice. 1991. *J Virology* 65:3335.

Lavrovsky VA, Chagin AS, Subkhankulova TN. Internalization of growth factor-receptor complexes under the influence of antibodies initiates cell apoptosis in vitro. 1999. *Eur J Cell Biol* 78:194.

Lazcano EC, Nájera AP, Alonso RP, Buiatti E, Hernández AM. Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. 1996. *Rev Inst Nal Cancerología* 42: 123.

Learly AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in Go and into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4013.

Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T Lymphocytes for apoptosis. 1991. *Nature* 353:858.

Lenardo M, Chan FC, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis-Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. 1999. *Annu Rev Immunol* 17:221.

Lev S, Yarden Y, Girol D. Dimerization and activation of the Kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. 1992. *J Biol Chem* 267:15970.

Lin WC, Yasumura S, Suminami Y, Sung MW, Nagashima S, Stanson J, Whiteside T. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of receptor, and tumor cell growth. 1995. *J Immunol* 155: 4805.

Liu Z-J, Oishi Y, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, Taniguchi T. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. 1994. *Science* 266:1045.

Longley BJ, Tyrrell L, Lu SZ, Ma Y-S, Langley K, Ding T, Duffy T, Jacobs P, Tang LH, Modlin Y. Somatic c-KIT activating mutation in urticaria pigmentosa and aggressive mastocytosis: Establishment of clonality in a human mast cell neoplasm. 1996. *Nat Genet* 12:312.

Lorenz U, Bergemann AD, Steinberg HN, Flanagan JC, Li X, Galli SJ, Neel BG. Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. 1996. *J Exp Med* 184:1111.

Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Fausset PR, Lauren S, Mendiaz EA, Zebo KM, Langley KE. Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from Buffalo rat liver cell-conditioned medium. 1991. *J Biol Chem* 266:8102.

Majumdar MK, Feng L, Medlock E, Toksoz D, Williams D. Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein. 1994. *J Biol Chem* 269:1237.

Marziali G, Lazzaro D, Sorrentino V. Binding of germ cells to mutant S1^d Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand. 1993. *Dev Biol* 157:182.

McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. 1998. *Toxicol Lett* 99:157.

McMillan DN, Kernohan NM, Flett ME, Heys SD, Deehan DJ, Sewell HF, Walker F, Eremin O. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumour cells *in situ* and *in vitro*: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. 1995. *Int J Cancer* 60: 776.

Migazawa K, Hendrie PC, Mantel C, Wood K, Ashman LK, Broxmeyer HE. Comparative analysis of signaling pathways between mast cell growth factor (c-kit ligand) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a human factor-dependent myeloid cell line involves phosphorylation of raf-1, GTPase-activating protein and mitosis-activated protein kinase. 1991. *Exp Hematol* 19:1110.

Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. 1998. *J Cell Biol* 140:627.

Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T. The IL-2receptor complex: its structure, function, and target genes. 1993. *Annu Rev Immunol* 11:245.

Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. 1991. *Mol Cell Biol* 11: 4895.

Miyazaki T, Liu Z-J, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, Barsoumian EL, Perlmutter RM, Taniguchi T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc and Lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. 1995. *Cell* 81:223.

Miyazaki T, Maruyama M, Yamada G, Hatakeyama M, Taniguchi T. The integrity of the conserved "WS motif", common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction. 1991. *EMBO J* 10:3191.

Miyazawa K, Hendrie PC, Mantel C, Wood K, Ashman LK, Broxmeyer HE. Comparative analysis of signaling pathways between mast cell growth factor (c-kit ligand) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor in a human factor-dependent myeloid cell line involves phosphorylation of Raf-1, GTPase-activating protein and mitogen-activated protein kinase. 1995. *Exp Hematol* 19:1110.

Mui A, Alai M, Cutler R, Bustelo X, Barbacid M, Krystal G. Steel factor stimulates the tyrosine phosphorylation of vav in both murine and human hemopoietic cell lines. 1991. *Blood* 78:161a.

Muñoz N, Bosch FX. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. 1997. *Salud Publica Mex* 39:274.

Nagata S. Apoptosis by death factor. 1997. *Cell* 88:355.

Nistico G, De Sarro. Is interleukin 2 a neuromodulator in the brain? 1991. *Trends Neurosci.* 14:146.

Orr-Urtreger A, Avivi A, Zimmer Y, Givol D, Yarden Y, Lonai P. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. 1990. *Development* 109:911.

Palacios R, Nishikawa SI. Developmentally regulated cell surface expression and function of c-kit receptor during lymphocyte ontogeny in the embryo and adult mice. 1992. *Development* 115: 1133.

Pandit J, Bohm A, Jancarik J, Halenbeck R, Koths K, Kim S-H. Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. 1992. *Science* 258:1358.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. 1993. *Int J Cancer* 54:594.

Paulson RE, Vesely, Siminovitch KA, Berntein A. Singaling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the receptor tyrosine kinase c-kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. 1996. *Nat Genet* 13:309.

Piao X, Paulson R, van der Gerr P, Pawson T, Berntein A. Oncogenic mutation in the Kit receptor tyrosine kinase alters substrate specificity and induces degradation in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14665.

Pinto A, Gloghini A, Gattei V, Aldinucci D, Zagonel V, Carbone A. Expression of the c-kit receptor in human lymphomas is restricted to Hodgkin's Disease and CD30⁺ anaplastic large cell lymphomas. 1994. *Blood* 83:785.

Plaisance S, Rubinstein E, Alieche A, Han D, Sahraoui Y, Mingari MC, Bellomo R, Rimoldi D, Colombo M, Jasmin C, Carrel S, Azzarone B. Human melanoma cells express a functional interleukin-2 receptor. 1993. *Int J Cancer* 55:164.

Pontén J, Adami HO, Bergström R, Dillner J, Friberg LG, Gustafsson L, Miller AB, Parkin DM, Sparén P, Trichopoulos D. Strategies for global control of cervical cancer. 1995. *Int J Cancer* 60:1.

Porter AG. Protein translocation in apoptosis. 1999. *Trends in Cell Biol* 9:394.

Qui F, Ray P, Brown K, Baker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besner P. Primary structure of c-kit: Relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. 1988. *EMBO J* 7:1003.

Rajotte D, Haddad P, Haman A, Cragoe EJ, Hoang T. 1992. *J Biol Chem* 267:9980.

Ramenghi U, Ruggieri L, Dianzani I, Rosso C, Brizzi MF, Camaschella C, Pietsch T, Saglio G. Human peripheral blood granulocytes and myeloid leukemic cell lines express both transcripts encoding for stem cell factor. 1994. *Stem Cells* 12:521.

Rangel-Corona R, Rodríguez-Cruz L, Gómez-Ruiz C, Flores-Flores G, Soto-Cruz I, Mendoza-Rincón J, Weiss-Steider B. Differential expression of the two components of the interleukin 2 receptor in cervical cancer cells. 1998. 17th International Cancer Congress. International Proceedings Division. Monduzi Editore Rio de Janeiro Brasil. Abstract Book. 326.

Ratajczak MZ, Kuczynski WI, Sokol DL, Moore JS, Pletcher CH, Gewirtz AM. Expression and physiologic significance of Kit ligand and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand in normal human CD34-, c-Kit⁺ marrow cells. 1995. *Blood* 86:2161.

Ratajczak MZ, Luger SM, Gewirtz A. The c-kit proto-oncogene in normal malignant human hematopoiesis. 1992. *Int J Cell Cloning* 10:205.

Rebollo A, Gómez J, Martínez A. Lessons from immunological, biochemical, and molecular pathways of the activation mediated by IL-2 and IL-4. 1996. *Advances in Immunol* 63:127.

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. 1997. *Nature* 387:773.

Reith AD, Rottapel R, Giddens E, Brady C, Forrester L, Bernstein A. W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. 1990. *Genes Dev* 4:390.

Robey E. T cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. 1995. *Immunol Today* 17:306.

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG, White DE. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin 2 or high-dose interleukin-2 alone. 1987. *N Engl J Med* 316:889.

Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA, White DE. Experience with the use of high-dose of interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. 1989. *Annu Surg* 210:474.

Russell NH. Autocrine growth factors and leukemic haemopoiesis. 1992. *Blood Rev* 6:149.

Sasaki S, Tsujisaki M, Jinnohara T, Ishida T, Sekiya M, Adachi M, Takahashi S, Hinoda Y, Imai K. Human tumor growth suppression by apoptosis induced with anti-ErbB-2 chimeric monoclonal antibody. 1998. *Jpn J Cancer Res* 89:562.

Schwartzman R, Cidlowski J. Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. 1993. *Endocrinology* 133:591.

Shibuya H, Yoneyama M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Taniguchi T. IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: Demonstration of novel role for c-myc. 1992. *Cell* 70:57.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. 1999. *Nature* 399:483.

Shiota G, Kawasaki H, Nakamura T, Schmidt EV. Inhibitory effect of hepatocyte growth factor against FaO hepatocellular carcinoma cells may be associated with changes of intracellular signalling pathways mediated by protein kinase C. 1994. *Res Cmmun Mol Pathol Pharmacol* 85:271.

Smith K. A. The interleukin 2 receptor. 1989. *Annu Rev Cell Biol* 5:397.

Soto-Cruz I, Navarrete-Marquez V, Reyes-Vega C, Rangel-Corona R, Mendoza-Rincón J, Weiss-Steider B. Inhibition of tyrosine phosphorylation by anti-IL-2 γ receptor in cervical cancer cells. 1998. 17th International Cancer Congress. International Proceedings Division. Monduzi Editore Rio de Janeiro Brasil. Abstract Book 325.

Stambolic V, Mark TW, Woodgett R. Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. 1999. *Oncogene* 18:6094.

Sui X, Tsuji K, Tajima S, Tanaka R, Muraoka K, Ebihara Y, Ikebuchi K, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Nakahata T. Erythropoietin-independent erythrocyte production: Signals through gp130 and c-kit dramatically promote erythropoiesis from human CD³⁴ cells. 1996. *J Exp Med* 183:837.

Tan JC, Nocka K, Ray P, Traktman P, Besmer P. The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. 1990. *Science* 247:209.

Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis gastrointestinal stromal tumors. 1999. *Cancer Res* 59:4297.

Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. 1993. (Review) *Cell* 73:5.

Thèze J, Alzari PM y Bertoglio J. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. 1996. *Immunol Today* 17: 481.

Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FH, Williams DA. Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7350.

Tomeczakowski J, Beilken A, Frick D, Wieland B, König A, Falk MH, Reiter A, Welte K, Sykora K-W. Absence of c-kit receptor and absent proliferative response to stem cell factor in childhood Burkitt's lymphoma cells. 1995. *Blood* 86:1469.

Torriglia A, Negri C, Chaudun E, Prosperi E, Courtois Y, Counis MF, Scovassi AI. Differential involvement of Dnases in HeLa cell apoptosis induced by etoposide and long term-culture. 1999. *Cell Death and Differentiation* 6:234.

Turner AM, Zsebo KM, Martin F, Jacobsen FW, Bennett LG, and Broudy VC. Nonhematopoietic tumor cell lines express stem cell factor and display c-kit receptors. 1992. *Blood* 80:374.

Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW, Atkins HL, Langley KE, Parker V, Martin F, Broudy VC. Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. 1995. *Blood* 85:2052.

Ullrich A, Schlessinger. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. 1990. *Cell* 61:203.

Voss SD, Sondel PM, Robb RJ. Characterization of the interleukin 2 receptors (IL-2R) expressed on human natural killer cells activated in vivo by IL-2: association of the p64 γ chain with the IL-2R β chain in functional intermediate-affinity IL-2R. 1992. *J Exp Med* 176: 531.

- Voss SD, Leary TP, Sondel PM, Robb RJ. Identification of a direct interaction between interleukin-2 and the p64 interleukin -2 receptor gamma chain. 1993. Proc Natl Acad Sci USA 90:2428.
- Watowich S, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu S, Lodish H. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. 1996. Ann Rev Cell Dev Biol 12:91.
- Waldmann TA, Goldman CK, Robb RJ, Greene WC. Expression of interleukin-2 receptors on activated human B cells. 1984. J Exp Med 160:1450.
- Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. 1993. (Review) Immunol Today 14:264.
- Warren J, Leonard MD. The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. 1996. Annu Rev Med 47: 229.
- Weidmann ME, Sacchi M, Plaisance S, Heo DS, Yasumura S, Lin WC, Johnson JI, Herberman RB, Azzarone B, Whiteside TL. Receptors for interleukin 2 on human squamous cell carcinomas cell lines and tumor *in situ*. 1992. Cancer Res 52:5963.
- Welham MJ, Schrader JW. Modulation of c-kit mRNA and protein by hematopoietic growth factors. 1991. Mol Cell Biol 11:2901.
- Welham MJ, Schrader JW. Steel factor-induced tyrosine phosphorylation in murine mast cells. 1992. J Immunol 149:2772.
- Wells JA, Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. 1996. Annu Rev, Biochem 65:609.
- Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Ness KV, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS, Burgess GS, Cosman D, Lyman SD. Identification of ligand for the c-kit proto-oncogene. 1990. Cell 63:167.
- Williams GT. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. 1991. Cell 65:1097.
- Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. 1995. Nature 377:242.
- Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. 1995. J Clin Invest 95:1897.

Yannelli JR. The preparation of effector cells for use in the adoptive cellular immunotherapy of human cancer. 1991. *Journal of Immunological Methods* 139:1.

Yasumura S, Lin WC, Weidmann E, Hebda P, Whiteside TL. Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. 1994. *Int J Cancer* 59:225.

Yee NS, Langen H, Besmer P. Mechanism of kit ligand, phorbol ester, and calcium-induced down-regulation of c-kit receptors in mast cells. 1993. *J Biol Chem* 268:14189.

Zakut R, Perlis R, Eliyahu S, Yarden Y, Givol D, Lyman SD, Halaban R. Kit ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of Kit expressing melanoma cells. 1993. *Oncogene* 8:2221.

Zandstra PW, Jervis E, Haynes CA, Kilburn DG, Eaves CJ, Piret J. Concentration-dependent internalization of a cytokine/cytokine receptor complex in human hematopoietic cells. 1999. *Biotechnology and Bioengineering* 63:493.

Zsebo KM, Williams DA, Geisler EN, Broudy VC, Martin FH, Atkins HL, Hsu R-Y, Birkett NC, Okino KH, Murdock DC, Jacobsen FW, Langley KE, Smith KA, Takeishi T, Cattanch BM, Galli SJ, Suggs SV. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. 1990. *Cell* 63:213.

13. APÉNDICE

13.1. Solución salina de verseno.

Esta solución se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se pesan las siguientes sustancias:

Tris base	3.04g
Cloruro de sodio	8.00g
Cloruro de potasio	0.40g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con HCl 10 N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 minutos.

13.2. Preparación del colorante azul de tripano.

Para pruebas de viabilidad, generalmente se empleó una dilución del colorante Azul de Tripano (Sigma, USA), al 0.3% en PBS, antes de utilizarlo, el colorante fue filtrado mediante el uso de papel filtro del número 2 (Whatman, England).

13.3. Solución amortiguadora de fosfatos (SAF).

Se usa para mantener las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato, los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

Cloruro de magnesio	0.1g
Cloruro de calcio	0.1g

Cloruro de sodio	8.0g
Cloruro de potasio	0.2g
Fosfato monoácido de sodio	2.16g
Fosfato diácido de potasio	0.2g

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800ml de agua bidestilada y después se adiciona los 100ml que contiene el cloruro de magnesio y el de calcio. Se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4 utilizando HCl 8N y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro de poro de 22 μ , la solución se almacena a temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

13.4. Tripsina.

La enzima tripsina es utilizada para remover los epitelios normales adheridos de la caja de cultivo.

Para su preparación se pesan 0.05g de tripsina y se diluyen en 100 ml de verseno estéril. La solución se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

13.5. Amortiguador de carbonatos.

1.59 gr de Na_2CO_3

2.93 gr de NaHCO_3

0.20 gr de NaNO_3

Llevar a pH de 9.5 y aforar a 1 litro con H_2O .

13.5.1. Amortiguador de citratos.

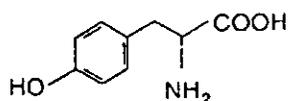
0.1 M Acido cítrico

0.2 M Na_2HPO_4

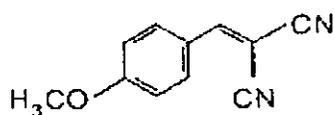
Llevar a pH de 5.6 y aforar a 1 litro con H_2O .

13.6. Estructura molecular de las Tirfostinas.

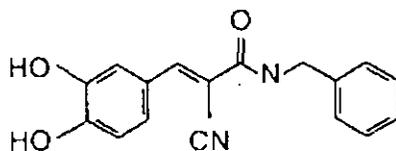
Tirosina



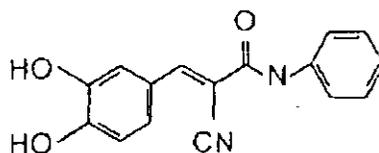
Tirfostina I
(4-Metoxibencilideno) malononitrilo



Tirfostina B42
N-Bencilo-3,4-
dihidroxibencilidenocianoacetamida



Tirfostina B48
N-Fenil-3,4-
dihidroxibencilidenocianoacetamida



13.7. Solución de lisis.

1% Tritón X-100 en Tris 50 mM a pH 7.5

(2.5 ml de Tris a una concentración 1M y 500 µl de tritón)

0.5 ml EDTA 0.5M

0.05 ml KCl 1M

1.4 ml NaCl 140 mM

0.1 ml MgCl₂ 1M

Aforar a 50 ml de H₂O MilliQ

13.7.1. Inhibidores de proteasas.

1mM PMSF

1 mM NaF

1% aprotinina

1 µl/ml leupeptina

100 µM Na₃VO₄

Los inhibidores se adicionan en el momento de usar la solución de lisis.

13.7.2. Cuantificación de proteínas.

Se realiza una curva patrón de albúmina partiendo de una solución stock con una concentración de 0.5 mg/ml.

Tubo	Albúmina (µl)	Concentración (µg/ml)	H ₂ O (µl)
1	2.5	1.25	998.75
2	5	2.5	997.5
3	10	5	995
4	20	10	990
5	40	20	980
Blanco	-	-	800

Resuspender los tubos y extraer 200 μ l de la mezcla y sustituir por 200 μ l del reactivo de Bradford (BioRad)

Para el análisis de las muestras se toman 1-5 μ l de la proteína extraída y se adicionan a los tubos problema de la misma manera que se hizo con la albúmina. Finalmente se determinó la concentración de las proteínas a una absorbancia de 595 nm.

13.7.3. Amortiguador de la muestra o Laemmli.

0.025 M de Tris-HCl (pH 6.8), 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 0.02% de azul de bromofenol.

13.7.4. Incubación de la proteína A sefarosa con los anticuerpos.

El amortiguador de lavado se usa para lavar las esferas de proteína A sefarosa. Se toman 15 μ l de la suspensión en la que se encuentra la proteína y se ponen en 500 μ l de amortiguador de lavado a 5,000 rpm a 4°C 5 min dos veces, posteriormente se adicionan 3 μ g del anticuerpo más 20 μ l de amortiguador de lavado, se incuban con el anticuerpo primario durante 2 hrs en el amortiguador de lavado a 4°C con agitación suave. Finalmente el complejo se lava tres veces con amortiguador de lavado como antes se mencionó.

13.7.5. Amortiguador de inmunoprecipitación.

2.5 ml Tris 1M

5 ml NaCl 5 M

0.25 ml MgCl₂ 1M

0.05 ml Tritón X-100

0.025 SDS al 10%

Aforar a 50 ml con H₂O MilliQ

Al amortiguador se le adicionan los inhibidores de proteasas.

13.7.6. Amortiguador de lavado.

2.5 ml de Tris 1 M pH7.5

50 μ l Tritón X-100

Aforar a 50 ml de H₂O MilliQ.

Al amortiguador se le adicionan los inhibidores de proteasas.

13.7.7. Amortiguador AP (Fosfatasa alcalina).

10 ml Tris-HCl 100 mM a pH 9.5

2 ml NaCl 5M

0.5 ml MgCl₂ 1M

Aforar a 10 ml con H₂O MilliQ

13.7.8. BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).

Disolver 50 mg de BCIP en 1 ml de dimetilformamida,

Hacer alícuotas de 100 μ l.

Fotosensible, almacenar a -20 °C.

13.7.9. NBT (Azul de tetrazolium).

Disolver 50 mg de BNT en 1 ml de una solución 70%de Dimetilformamida y 30% de H₂O MilliQ

Hacer alícuotas de 100 μ l

Fotosensible, almacenar a -20 °C