



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"



TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

IVONNE RAMÍREZ CERVANTES

*TÍTULO: Estudio de la interacción entre la cinasa Lck y la
cadena beta del receptor para IL-2 en las líneas de
carcinoma de cérvix CALO e INBL.*

Directora de tesis: Dra. Isabel Soto Cruz

Asesor de tesis: M en C. Arturo Valle Mendiola

Marzo-2009



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 fue desarrollado en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza, con apoyo financiero del CONACYT (Proyecto 103761).

AGRADECIMIENTOS:

El esfuerzo científico sostiene el mundo de la veracidad, por otro lado el saber humano siempre está respaldado por protagonistas sin los cuales, en mi caso, no habría realizado dicha labor científica. Por mi satisfactorio desempeño universitario agradezco a:

Mis padres (Candelaria y José Luis) por su invariable cariño y apoyo. Los quiero mucho.

Mis hermanos (Iván y Francisco) por brindarme su compañía. Los tengo presentes en todo momento.

Mis abuelos (Ofelia, Luis, Florencia y Porfirio) que siempre confiaron y creyeron en mí.

Mis maestros (Dra. Isabel Soto, M. en C. Arturo Valle, Dra. Martha Legorreta, M. en C. Araceli García y Dr. Flavio Mendoza) por su disposición, sus consejos, regaños y la ayuda que siempre recibí de ustedes.

Mis tíos (Carolina, Rubén, Alejandra, María, Alejandro) que nunca olvidaron lo importante que esto es para mí.

Mis primos (Karla, Daniela, Paty, Eduardo, Oscar, Ricardo, Memo) porque siempre me dieron ánimos para seguir adelante.

Mis amigos (Olga, Erendira, Nancy, Susana, Christian, Arlette, Wilson, Gabriel, Fátima, Pablo y Rodro) por su comprensión, sé que cuento siempre con ustedes.

Mis compañeros de trabajo (Fernando, Mónica, Alfredo, Isabel, Gonzalo, José de Jesús, Karla y Tatiana) por el empuje que me otorgaron para lograr y llegar al término de este ciclo.

Gracias a todos

INDICE

I.	RESUMEN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	2
A.	Origen del cáncer.....	2
B.	Las células cancerosas no dependen de señales externas.....	3
C.	Generalidades del cáncer.....	3
1.	Cáncer cervicouterino.....	3
D.	Citocinas.....	4
1.	Definición.....	4
2.	Propiedades generales.....	4
E.	Interleucina-2 (IL-2).....	6
1.	Estructura general del receptor para IL-2.....	6
2.	Cadena α del receptor de IL-2 (IL-2R α).....	7
3.	Cadena β del receptor de IL-2 (IL-2R β).....	8
4.	Cadena γ del receptor de IL-2 (IL-2R γ).....	8
5.	Transducción de señales activadas por IL-2.....	10
F.	STATs.....	10
1.	La activación de mecanismos de proteínas STATs.....	11
2.	Papel fisiológico de las STATs.....	11
G.	Lck.....	12
1.	Características generales de la proteína Lck.....	12
2.	Actividad de Lck.....	14
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	19
V.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
VI.	HIPÓTESIS.....	20
VII.	METODOLOGÍA.....	21
1.	Cultivo celular.....	21
2.	Conteo celular.....	21
3.	Lisado total de células.....	21
4.	Cuantificación de proteínas.....	22
5.	Inmunoprecipitación.....	22
6.	Electroforesis.....	22
7.	Wester blot.....	23
8.	Elución de anticuerpos.....	23
VIII.	RESULTADOS.....	24
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	31
X.	CONCLUSIONES.....	34
XI.	PERSPECTIVAS.....	35
XII.	ANEXOS.....	36
1.	Material y preparación de soluciones.....	36
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	38

I. RESUMEN

El cáncer cérvicouterino es la principal causa de muerte en México según la Secretaría de Salud. Dicho cáncer abarca un espectro de lesiones bien caracterizadas, el cual progresa con el tiempo hasta llegar a un alto grado de lesiones escamosas intraepiteliales que pueden resultar en un tumor invasivo.

Aunque la infección del epitelio genital por los tipos oncogénicos del virus del papiloma humano sea considerada como el factor de riesgo principal para el cáncer cérvico-uterino, es claro que un tumor es el resultado de la acumulación de mutaciones en genes que controlan la muerte celular (apoptosis) y mecanismos de supervivencia.

La interleucina-2 (IL-2) es una citocina del sistema inmune, y su receptor está conformado por tres subunidades: IL-2R α , IL-2R β y IL-2R γ . No se ha reportado que las subunidades tengan actividad enzimática intrínseca, más bien, éstas actúan como sitios de anclaje para la asociación de factores de transducción de señal, como las proteínas con actividad de tirosina cinasa (PTKs).

Por otro lado, la proteína Lck (tirosina cinasa específica de leucocitos), es una cinasa de la familia Src que actúa como subunidad catalítica para un gran número de receptores que carecen de actividad enzimática. Se ha reportado a la cinasa Lck como la primera cinasa asociada con el dominio citoplasmático en la subunidad β por la región ácida del receptor de IL-2 (IL-2R).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL expresan el receptor para IL-2 (IL-2R) y que además responden al estímulo con su ligando, por lo que se decidió realizar el análisis de la activación de Lck, una cinasa esencial para el desarrollo y activación de los linfocitos T, después de la unión de IL-2 a su receptor (factor de proliferación para los linfocitos T), y analizar si existe una interacción entre la cinasa Lck con la cadena β (del IL-2R) y con las proteínas de la familia STAT. Para este fin, se estimularon *in vitro* las líneas celulares CALO e INBL con bajas concentraciones de IL-2, se lisaron las células y se inmunoprecipitaron las proteínas en estudio. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis y se analizaron con inmunoblot con anticuerpos específicos para cada ensayo. La evidencia obtenida en este trabajo demuestra la presencia de Lck y un aumento en la fosforilación en tirosina en respuesta a la estimulación con IL-2, las células que presentaron mayor respuesta fueron las células de la línea INBL comparadas a las células de la línea CALO. Además, se demostró la interacción entre Lck y la subunidad β de IL-2, así como con la proteína STAT5.

Estos resultados sugieren que en las líneas celulares de carcinoma CALO e INBL podría inducir una vía activada por Lck para provocar la anti-apoptosis, tal como sucede en linfocitos normales.

II. MARCO TEÓRICO

A. ORIGEN DEL CÁNCER

El humano adulto está compuesto por aproximadamente 10^{15} células. Muchas de las cuales requieren dividirse y diferenciarse para reponer las células que se pierden en los tejidos y órganos (1).

El control de la proliferación celular se logra a través de una red de mecanismos moleculares que gobiernan el crecimiento celular por un lado y la muerte celular (apoptosis) por el otro. Cualquier factor que altere el balance entre el nacimiento y la muerte puede ser capaz, si no es corregido, de alterar el número total de células en un órgano o tejido. Después de muchas generaciones celulares este incremento en el crecimiento celular se puede detectar clínicamente como una neoplasia, la cual es, de manera literal, un nuevo crecimiento de células (1).

Si una mutación al azar confiere una ventaja selectiva a un individuo, justo como en la evolución darwiniana, ese individuo será capaz de crecer mejor; algo similar sucede con las células cancerosas, las mutaciones en los genes que controlan la proliferación o la apoptosis son responsables del cáncer; si estas mutaciones en genes individuales originan células capaces de evadir los mecanismos homeostáticos normales, estas pueden detectarse en lo sucesivo en las células cancerosas. Los sucesos dentro de este escenario se pueden analizar desde dos perspectivas, la de la célula individual y la del organismo en conjunto. Desde el punto de vista celular, este fenómeno es ventajoso, ya que inmortaliza a la célula, que de otra forma tendría un tiempo de vida media corto, aunque a la larga sea capaz de matar a su hospedero. Este fenómeno a nivel de un organismo completo, es terrible, ya que significa la pérdida sobre el control del crecimiento de un grupo celular, lo cual acarrea consecuencias nefastas, y en el peor de los casos, la muerte (1).

Las mutaciones, en el contexto de la carcinogénesis podrían definirse como, los cambios en el genoma de una célula particular, esto incluye las mutaciones puntuales (las cuales causan sustituciones de aminoácidos); mutaciones dentro del marco de lectura (frameshift) o dentro de los codones de terminación (crean proteínas truncadas o cambios en su secuencia); inestabilidad cromosómica (la cual resulta en amplificación, sobreexpresión o expresión inapropiada de ciertos genes); pérdida de genes o su fusión con otros (resultando una proteína quimérica con funciones alteradas); modificaciones epigenéticas del DNA (la más importante es la metilación de la citosina en las islas CpG, llevando al silenciamiento de genes). Las células cancerosas en desarrollo seleccionan dos tipos de mutaciones; las que incrementan la actividad de las proteínas codificadas por los genes modificados (son llamados oncogenes, por ejemplo STAT3, Ras, etc); o mutaciones que disminuyen o inactivan un gen funcional (son llamados genes supresores de tumores, por ejemplo p53, pRB, etc) (1).

B. LAS CÉLULAS CANCEROSAS NO DEPENDEN DE SEÑALES EXTERNAS

Las células normales proliferan en respuesta a una serie de señales externas, la mayoría producida de manera local. Estas señales externas son factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), diversas interleucinas (IL-2, IL-6, etc.), entre otros. Estos factores de crecimiento ejercen sus acciones proliferativas después de unirse a un receptor apropiado e inducen cascadas de respuestas, las cuales involucran eventos de fosforilación. Las células tumorales han encontrado mecanismos para activar estas señales de proliferación de manera constante. Estos mecanismos difieren de cáncer a cáncer, dependiendo del tipo celular, e incluso puede cambiar dentro del mismo tumor, pero el resultado es el mismo, una constante estimulación mitogénica (1).

C. GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento anormal y diseminado de células que al desarrollarse en forma incontrolada avanza entre los tejidos normales y los destruye, alterando así el funcionamiento del organismo. Se inicia casi siempre como una enfermedad localizada (2).

1. Cáncer cervicouterino

En el ámbito mundial, el carcinoma del cuello uterino es la segunda causa de morbilidad y mortalidad, por cáncer en la mujer. En México, el cáncer cervicouterino aún es un grave problema de salud pública (2).

La mayor parte de las displasias se diagnóstica en la mujer después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 y 39 años de edad y el carcinoma invasor después de los 40 años (2).

El crecimiento lento y paulatino del cáncer cervical presenta varios periodos: primero, desde el carcinoma *in situ* y la evidencia de invasión incipiente del estroma; segundo, de la invasión incipiente del estroma al microcarcinoma; tercero, entre el microcarcinoma y el cáncer clínicamente manifiesto (2).

Dicho cáncer abarca un espectro de lesiones bien caracterizadas, el cual progresa con el tiempo hasta llegar a un alto grado con lesiones escamosas intraepiteliales que pueden resultar en un tumor invasivo (3).

Aunque la infección del epitelio genital por los tipos oncogénicos del virus del papiloma humano sea considerada como el factor de riesgo principal para el cáncer cervicouterino, es claro que un tumor es resultado de la acumulación de mutaciones en genes que controlan la muerte celular (apoptosis) y mecanismos de supervivencia (3).

D. CITOCINAS

1. Definición

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular, que se sintetizan rápidamente, las producen diferentes células tanto saludables como enfermas (principalmente fagocitos mononucleares y linfocitos T activos), primordialmente después que se han estimulado (4).

Son proteínas secretadas por las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de las funciones de estas células. Las citocinas se producen en respuesta a microorganismos y otros antígenos y diferentes citocinas estimulan respuestas diversas de las células implicadas en la inmunidad y la inflamación. En la fase de activación de las respuestas inmunitarias, las citocinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos, y en las fases efectoras de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa activan diferentes células efectoras para que eliminen microorganismos y otros antígenos (5).

Las citocinas también estimulan el desarrollo de las células hematopoyéticas (5). La nomenclatura de las citocinas a menudo se basa en sus fuentes celulares. Las citocinas producidas por los fagocitos mononucleares reciben en ocasiones el nombre de monocinas, y las producidas por los linfocitos habitualmente se denominan linfocinas. Con el desarrollo de la clonación molecular, se ha descubierto que la misma proteína se puede sintetizar por linfocitos, monocitos y diversas células tisulares, tales como las células endoteliales y algunas células epiteliales. Por consiguiente, se ha adoptado el término genérico citocinas como nombre de elección para esta clase de mediadores. Debido a que muchas citocinas son producidas por los leucocitos (por ejemplo macrófagos o células T) y actúan sobre otros leucocitos, también reciben el nombre de interleucinas (IL) (5). Actúan en diferentes células dianas adyacentes, a menudo de manera aditiva, sinérgica o antagónica (4).

2. Propiedades generales

- La secreción de citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado. En general, las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia habitualmente mediante una nueva transcripción genética como resultado de un proceso de activación celular. Esta activación de la transcripción es transitoria, y los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) que codifican la mayoría de las citocinas son inestables, por lo que la síntesis de las citocinas también es transitoria. Es posible que la producción de algunas citocinas esté controlada además por mecanismos postranscripcionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente, dando lugar a un pico de liberación en el momento en que son necesarias (5).
- Las acciones de las citocinas a menudo son pleiotropicas y redundantes. El pleiotropismo es la capacidad de una citocina de actuar sobre diferentes tipos

- celulares. Esta propiedad permite a una citocina mediar diversos efectos biológicos, pero limita notablemente su uso terapéutico debido a que la administración de una citocina para un efecto clínico deseado puede causar numerosos efectos secundarios no deseados. La redundancia es la propiedad de varias citocinas de tener los mismos efectos funcionales. Debido a esta redundancia, los antagonistas frente a una citocina o la inhibición selectiva del gen de una citocina pueden no tener consecuencias funcionales, ya que otras citocinas pueden compensar su función (5).
- Las citocinas a menudo influyen en la síntesis y las acciones de otras citocinas. La capacidad de una citocina para estimular la producción de otras da lugar a cascadas en las que una segunda o tercera citocina pueden mediar los efectos biológicos de la primera. Dos citocinas pueden interactuar para antagonizar mutuamente sus acciones, producir efectos sumativos o, en algunos casos, producir efectos mayores que los esperados, o sinérgicos (5).
- Las acciones de las citocinas pueden ser locales y sistémicas. La mayoría de las citocinas actúa cerca del lugar donde se producen, bien en la misma célula que la secreta (acción autocrina), o en una célula próxima (acción paracrina). Cuando se producen en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar en la circulación y actuar a distancia del sitio de producción (acción endocrina) (5).
- Las citocinas, al igual que otras hormonas polipeptídicas, inician sus acciones uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana. Los receptores de citocinas a menudo se unen a sus ligandos con gran afinidad, con constantes de disociación (Kd) dentro de intervalos de 10^{-10} a 10^{-12} M. En consecuencia, solo se necesitan cantidades muy pequeñas de una citocina para ocupar los receptores y producir un efecto biológico. La mayoría de las células expresan niveles bajos de receptores de citocinas (del orden de 100 a 1000 receptores por célula), pero estos niveles parecen ser suficientes para inducir respuestas (5).
- Diversas señales externas regulan la expresión de los receptores de citocinas y, de esta manera, la capacidad de respuesta de las células a las citocinas. Por ejemplo, la estimulación de linfocitos T o B por antígenos da lugar a un aumento de la expresión de receptores de citocinas. Por este motivo, durante una respuesta inmunitaria los elementos que responden preferentemente a las citocinas secretadas son los linfocitos específicos del antígeno. Este mecanismo mantiene la especificidad de las respuestas inmunitarias, a pesar del hecho de que las citocinas no son específicas del antígeno. La expresión de receptores también está regulada por las citocinas, incluidas otras citocinas o incluso la misma citocina que se une al receptor, lo cual permite una amplificación positiva o una retroalimentación negativa (5).

Las citocinas comprenden un gran número de factores que regulan el crecimiento celular, el desarrollo y la respuesta inmune, pueden dividirse en dos grupos principales. Citocinas de tipo I incluyen las interleucinas IL2-7, IL9, IL11-13, e IL15, factores estimuladores de colonias como MCSF, GM-CSF y G-CSF, factores neutróficos, y las

hormonas, que se unen a los receptores transmembrana de las proteínas que contienen cuatro residuos de Cys conservados, una región extracelular PRT-Ser-X-PRT-Ser, y dominios variables intracelulares. Citocinas de tipo II incluyen los interferones (IFNs) e IL10, que se unen a los receptores con cuatro residuos Cys, pero sin dominios extracelulares. Algunos receptores incluyen sólo una subunidad que homodimeriza en el momento de unirse con el ligando, mientras que otras están compuestas de dos, o, con menor frecuencia, tres diferentes subunidades (13).

E. INTERLEUCINA-2

La interleucina-2 (IL-2) es un factor de proliferación de células T, que controla la amplificación de las células estimulando inicialmente el crecimiento después de la activación del antígeno y posteriormente promueve la activación-inducida de la muerte celular (6, 7, 8). La habilidad de estimular a células NK y la lisis celular mediada por CD8⁺ (Linfocito T citotóxico) de tumores crearon interés clínico en la interleucina-2 como un agente biológico en el cáncer (6).

Se ha avanzado mucho en el entendimiento básico de la IL-2 y su receptor en el contexto de la respuesta inmune a la infección, la regulación de las células T activas, expansión y muerte, y de la persistencia de la memoria de células T en una compleja organización de múltiples citocinas y receptores de señales (6, 8, 9).

La IL-2 se produce exclusivamente en las células T activas e induce la proliferación de las células T activadas y la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos (CTL), también tiene efectos sobre otras células inmunitarias incluyendo células asesinas (NK), células B, monocitos/macrófagos y neutrófilos (7, 10, 11). Es una citocina expresada como una proteína glicosilada de diversas formas de aproximadamente 15.05 KDa (12). IL-2 está implicada en la generación de fenotipos efectores de los antígenos estimulados por las células T. Este efecto sin embargo solo se observa por corto tiempo después de la participación del receptor para antígeno de las células T (TCR) y actúa a través del receptor de IL-2 (12).

1. Estructura general del receptor para IL-2

La interacción de la IL-2 con su receptor (IL-2R) estimula la activación de transducción de señales que promueven la proliferación de células T y también inicia la activación de proteínas tirosina cinasa y la fosforilación del complejo IL-2R. Este receptor está compuesto de 3 subunidades diferentes: IL-2R α , IL-2R β , e IL-2R γ . Ninguna de las tres subunidades presenta actividad enzimática intrínseca, más bien, actúan como plataformas para la asociación de otras moléculas que funcionan como transductoras de la señal (12).

En la figura 1 se representan las tres subunidades para la conformación del receptor de alta afinidad para IL-2.

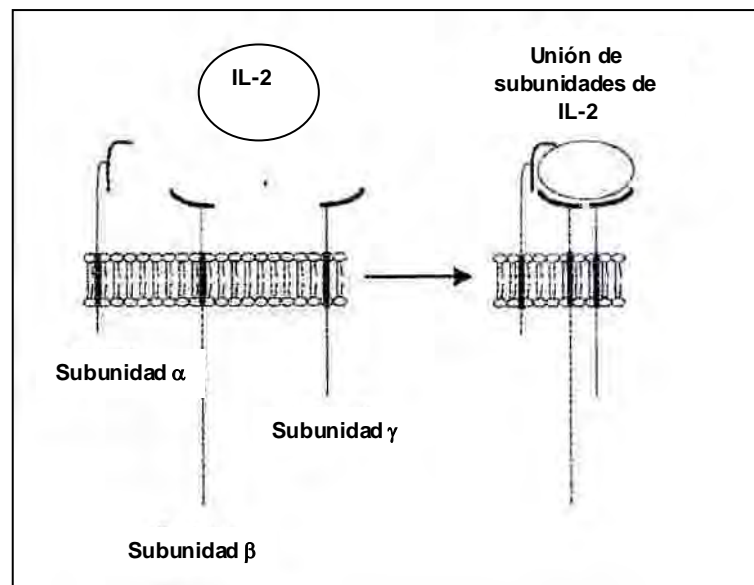


Figura 1. Representación de subunidades de IL-2, mostrando la unión α , β y γ para conformar el receptor de alta afinidad (12).

2. Cadena α del receptor de IL-2 (IL-2R α)

La subunidad α (IL-2R α) descrita originalmente como antígeno Tac es una glicoproteína de ~55 kDa capaz de unirse a IL-2 con baja afinidad, con una constante de disociación $K_d = 10$ nM. Su expresión se induce en células T activadas con mitógeno o antígeno. Está compuesta de 251 aminoácidos (aa), así como un péptido señal de 21 aa de longitud. La estructura primaria del IL-2R α no muestra una secuencia homóloga importante con otras moléculas de receptores conocidos (14).

Los 219 aa terminales forman un dominio extracelular. Este dominio contiene dos sitios potenciales de glicosilación de unión N y múltiples sitios de posibles uniones a carbohidratos. Los residuos de cisteína identificados participan en la formación de enlaces disulfuro requeridos para la unión a la IL-2. Un segundo dominio contiene una región hidrofóbica simple próxima al carboxilo terminal (COOH-terminal) de 19 aa, la cual es una región transmembranal. El tercer y último dominio es una región citoplasmática muy corta de 13 aa, que contiene aa cargados positivamente. Los sitios potenciales aceptores de fósforo (serina y treonina, pero no tirosina) están presentes en el dominio intracitoplasmático. El gen que codifica para la subunidad IL-2R α consiste de 8 exones y 7 intrones empalmados en una distancia mínima de 24 Kb, está localizado en el cromosoma 10 (15).

3. Cadena β del receptor de IL-2 (IL-2R β)

Ensayos de afinidad posteriores a la caracterización de la cadena α identificaron bioquímicamente otro componente del IL-2R (16). La estructura de este componente, la subunidad beta (IL-2R β) (p75), fue confirmada a través de la expresión clonal de ADN para el IL-2R β humano, usando anticuerpos monoclonales contra esta proteína (17).

El gen del IL-2R β consta de 10 exones y 9 intrones empalmados en 24 Kb en el cromosoma 22q. La forma madura del IL-2R β , deducido por la secuencia de nucleótidos, consiste de 525 residuos de aa, pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas de clase I, con un factor común de dos pares de residuos de cisteína conservados cerca de la región amino terminal y un motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS, región WS) en el dominio extracelular (18). 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 IL-2R funcional; mutaciones puntuales en el sitio de la región WS del IL-2R β disminuye su capacidad de unión a la IL-2 (19).

La cadena β es una proteína transmembranal que consiste de 551 aminoácidos, presenta una secuencia señal seguida de 525 residuos de aminoácidos que forman la proteína madura del IL-2R β . La porción citoplasmática del IL-2R β es más grande que la del IL-2R α , pero ésta no contiene ningún dominio aparente de cinasa. Esta proteína es rica en prolina (24/286) y residuos de serina (30/286), y esta notablemente inclinada o torcida por los aminoácidos cargados negativamente, por lo tanto, esta región contiene 40 aa cargados negativamente (ácido glutámico y aspártico), y solamente 18 aa cargados positivamente (lisina y arginina). Esta inclinación es particularmente evidente en la porción media de esta región (aminoácidos 345-390). La región citoplasmática del IL-2R β se puede dividir en tres subregiones basadas en su composición de aa. Estas subregiones se han designado: como la “región rica en serina”, “región ácida” y “región rica en prolina”; esta subunidad presenta una constante de disociación de más de 100 nM (20).

En muchos casos, como en el de IL-2R β , las regiones proximales a la membrana del receptor son necesarias para la mitogénesis. El dominio citoplasmático de IL-2R β se acopla con cinasas como p56 Lck, Syk y JAK1 (21, 22). La proteína tirosina cinasa de la familia Src, p56Lck, se asocia con la región ácida citoplasmática de la subunidad IL-2R β (21). La región rica en serina y la región ácida de la IL-2R β se requieren para la activación de p56Lck después de la estimulación con IL-2, indicando que la interacción física de p56Lck con la región ácida es necesaria, pero no suficiente para activar a Lck (21).

4. Cadena γ del receptor de IL-2 (IL-2R γ)

El peso de la molécula de 64 kDa co-precipitada con la subunidad beta del receptor (IL-2R β) correlacionó bien con el nivel de afinidad intermediario de los sitios de unión de la IL-2, lo que sugirió la posibilidad de que la molécula de 64 kDa era la tercera subunidad de la IL-2. Basándose en la secuencia de aa, se aisló el clon completo de ADN que codificó

una molécula de 64 kDa, demostrando que es el tercer componente del IL-2R conocido como cadena γ (IL-2R γ) del receptor para IL-2 (23). La forma madura de la cadena, p64, consiste de 347 residuos de aa con una secuencia típica que lo incluye en la familia de receptores de clase I, igual que la cadena β (24). El dominio extracelular contiene 86 residuos de aa, presenta un dominio SH2, que es homólogo a los dos subdominios de la región de homología 2 de Src (SH2) compuesta de 5 subdominios conservados (25).

La subunidad gama (IL-2R γ) está involucrada en la formación de los receptores de IL-2 de afinidad alta e intermedia. El IL-2R γ (p64) se puede co-precipitar con el IL-2R β en presencia de IL-2 en células linfoides produciendo el IL-2R de alta afinidad. La proteína posee 22 aa en el extremo amino terminal y con 347 aa más se conforma la proteína madura. En esta cadena, las regiones de los aminoácidos 232, 29 y 86 constituyen la longitud extracelular que atraviesa la membrana y la región citoplasmática respectivamente. La región citoplasmática de IL-2R γ es considerablemente más corta que el IL-2R β . El dominio extracelular del IL-2R γ contiene importantes regiones que se conservan en otros receptores de citocinas, lo que indica que el IL-2R γ pertenece a la familia de receptores hematopoyéticos de clase I (23).

El papel crítico de la IL-2R γ en la señalización por IL-2 se ha estudiado ampliamente. Primero, se ha mostrado que una línea mutante de células T que han perdido la capacidad de expresar a IL-2R γ , pero retiene a IL-2R α y a IL-2R β han perdido la habilidad de responder a IL-2. Segundo, se ha encontrado que un ratón mutante en el que la IL-2 se une a IL-2R α y a IL-2R β , pero no a IL-2R γ , falla en la transmisión de las señales proliferativas (21). El papel crítico de la región citoplasmática de IL-2R γ se ha enfatizado por la observación de la expresión de un mutante ectópico en el que IL-2R γ ha perdido la mayor parte del dominio citoplásmico, lo que inhibe la habilidad del IL-2R para transmitir las señales proliferativas en las células BAF-B03 (21).

En pacientes que sufren de inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (XSCID), se han encontrado, mutaciones en el extremo carboxilo-terminal que son resultado de un gen truncado para IL-2R γ . Es una enfermedad que se caracteriza por la ausencia o la reducción marcada del número de células T, lo que sugiere que la IL-2R γ juega un papel importante en la maduración de los precursores de las células T (21).

Las subunidades β y γ forman parte de una superfamilia de receptores de citocinas (25) mientras que la subunidad α es distinta. Las subunidades β y γ son componentes funcionales de otros receptores de citocinas (26-31). Estas 3 subunidades no se expresan constitutivamente por las células mononucleares periféricas en la sangre (32) y la afinidad del receptor depende de las subunidades que se expresan en la superficie de las células, lo que sugiere que pueden tener una función biológica o evolutiva (33,34).

Las subunidades β y γ juntas forman el receptor de afinidad intermedia (35), y se convierte a una forma de afinidad alta con la co-expresión de la subunidad α (36).

La unión de la IL-2 induce la estructura terciaria correcta del receptor de alta afinidad (IL-2R) (37). Las diferencias en la afinidad del receptor pueden ser un elemento temporal para la señalización que influye en la fuerza, calidad y la duración de la transducción de la señal. Por ejemplo, se induce la expresión de la subunidad α en los linfocitos T, con la participación del TCR, lo que conduce a un aumento en la sensibilidad de la célula a IL-2 y un aumento correspondiente en la solidez de la respuesta inmune (38).

La IL-2 tiene un papel importante en la protección de los linfocitos T para evitar la muerte celular por inducción de mecanismos anti-apoptóticos (12).

5. Transducción de señales activadas por IL-2

La interacción de la IL-2 con su receptor induce la heterodimerización de sus componentes y posteriormente la transfosforilación y activación de las cinasas JAK asociadas al receptor, JAK3 y JAK1. Una vez activadas las JAK son capaces de fosforilar en tirosina a las cadenas del receptor creando sitios de unión para los dominios SH2 de los Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STATs por sus siglas en inglés). Posteriormente las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que ellas a su vez sean fosforiladas por las cinasas JAK. Las STATs después de ser fosforiladas, forman dímeros, se translocan al núcleo y estimulan la expresión de los genes inducibles por citocinas (39, 40).

F. STATs

La familia de factores de transcripción STAT, consta de 7 miembros (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, y 6) de los cuales STAT3 y STAT5 se activan por el estímulo con IL-2; estos factores requieren de una doble fosforilación para una activación máxima de transcripción (41-43).

Estos factores de transcripción se activan por una serie extracelular de proteínas de señalización como las citocinas, los factores de crecimiento, y las hormonas que se unen a las células-receptores de superficie celular. El resultado de la vía de transducción de señales les permite desempeñar diferentes funciones en los procesos celulares normales fisiológicos, tales como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis (44).

Sin embargo, la activación aberrante de las STATs produce diferentes manifestaciones patológicas, por ejemplo, la transformación celular y oncogénesis. A pesar de que regulan el ciclo celular no contribuyen a la reparación de los daños del ADN, participan en la tumorigénesis por medio de la desregulación de las señales en las vías en que están implicadas (44). Las STATs pueden dividirse en dos grupos de acuerdo con sus funciones específicas. Uno se compone de STAT2, STAT4, y STAT6, que se activan por un número pequeño de citocinas y desempeñan un papel en el desarrollo de las células T y en las señales activadas por IFN γ . El otro grupo incluye, STAT3, y STAT5, que se activan en diferentes tejidos por medio de una serie de ligandos y que participan en la señalización de IFN, el desarrollo de la glándula mamaria y embriogénesis, respectivamente. Este último

grupo de STATs desempeña un papel importante en el control del ciclo celular y la progresión de la apoptosis y por lo tanto, contribuye a la oncogénesis (45).

1. La activación de mecanismos de proteínas STATs.

Las proteínas STAT se activan por medio de una variedad de factores solubles, tales como citocinas, factores de crecimiento, y hormonas (46).

Las proteínas STATs se activan también por factores de crecimiento, como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor estimulador de colonias (CSF-1) ya que todos estos receptores, poseen una actividad intrínseca de tirosina cinasa (47).

Estos receptores pueden activar proteínas STAT ya sea indirectamente, por medio de la proteína cinasa JAK, o directamente, como en el caso de la activación de STAT1 por los receptores para PDGF o EGF (48), que pueden fosforilar a STAT1 *in vitro* (49). Además, muchos receptores pueden activar el mismo sustrato de STAT fosforilando los residuos de tirosina con la participación de diferentes JAKs. La especificidad de activación de las STATs en las distintas líneas celulares depende de las interacciones existentes entre las proteínas STAT y sus respectivos receptores (50). Las STATs también pueden ser activadas por las proteínas cinasas de no receptor como Abl y Src.

Las proteínas STATs se componen de aproximadamente 850 aminoácidos, a excepción de STAT2 y STAT6, que tienen entre 750 y 800 aminoácidos y un rango de tamaño de 90-115 kDa. Todas las STATs comparten varios dominios conservados como: el dominio de oligomerización, activación transcripcional, dominio de unión de DNA, dominio enlazador y SH2, que son indispensables para cada función específica. STAT5 se activa por una serie de citocinas, que incluyen: prolactina, hormona de crecimiento, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), el factor de estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, e IL-15, y están involucrados en un gran número de funciones básicas en relación con la regulación del crecimiento celular (51).

2. Papel fisiológico de las STATs

La STAT5a se activa por prolactinas para el desarrollo de la glándula mamaria y lactogénesis (52). STAT5b se activa por la hormona de crecimiento y regula el dimorfismo sexual (53). Los ratones Knockout STAT5a/b son infértiles debido a la alteración del desarrollo del cuerpo lúteo, lo que sugiere que la función de la STAT5 puede ser redundante (54). STAT5b también participa en el desarrollo de células NK tras la estimulación con IL-15. Los ratones deficientes de STAT5a/b con actividad citotóxica presentan alteraciones en estas células, aunque es más evidente en los ratones que carecen de STAT5b. STAT5 podría inducir c-myc durante la transcripción de IL-2 inducida por la proliferación de linfocitos y regular la expresión de ciclinas D1 en las células hemopoyéticas, por lo tanto, puede intervenir en el control del crecimiento de estas células (51).

G. Lck

1. Características generales de la proteína Lck

De las cinasas de la familia Src, muy frecuente aunque no exclusivamente, la cinasa c-Src se encuentra sobre-expresada y/o activada de manera aberrante en cánceres de tipo epitelial y no epitelial. La activación es muy común en cáncer de colón y de mama, y es menos frecuente en melanomas o en tumores de ovario, gástrico, cabeza y cuello, pancreático, de pulmón, cerebro o de la sangre. No se ha reportado a la fecha relación entre el cáncer de cérvix y la sobre-expresión o activación de la cinasa Lck. El grado de incremento de actividad de las cinasas de la familia Src a menudo correlaciona con el potencial maligno del tumor y la sobrevida del paciente. La activación de las cinasas de la familia Src en los tumores humanos puede ocurrir a través de diversos mecanismos, y con frecuencia es un evento crítico en la progresión del tumor. Aún se desconoce como las cinasas de la familia Src contribuyen con el proceso de transformación maligna, sin embargo, parecen ser importantes en múltiples aspectos de la progresión del tumor, incluyendo proliferación, disrupción del contacto célula/célula, migración, invasividad, resistencia a apoptosis, y angiogenesis (64,65).

La cinasa Lck pertenece a la familia Src de proteínas tirosina cinasas y se expresa principalmente en las células T. La expresión o la activación de la cinasa Lck está repartida tanto en los tumores malignos linfoides como en los no linfoides (50).

Lck es una proteína con peso molecular de 56 kDa, consta de varios dominios como: sitio N-terminal con características únicas para la adición de ácidos grasos, dominio SH3, dominio SH2, dominio de tirosina cinasa (SH1) y un dominio C-terminal para la regulación negativa (55). El sitio N-terminal permite la adición o incorporación covalente de cadenas de ácidos grasos saturados como el ácido mirístico y fracciones de ácido palmítico. Los dominios SH2 y SH3 están involucrados en la regulación intramolecular e intermolecular por la mediación de las interacciones proteína-proteína a través de poli-prolina e interacciones de fosfotirosina específicas, respectivamente (55). El dominio único, es probable que contribuya en su localización diferencial de células T. La proteína cinasa Lck media su interacción con los co-receptores CD4 y CD8 (55).

CD4 y CD8 son células T específicas, que presentan proteínas transmembranales que se unen a regiones invariables de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de clase II y clase I respectivamente. Lck interacciona específicamente con los co-receptores CD4 y CD8 a través de un motivo de di-cisteína único presente en su dominio N-terminal y con dos cisteínas en el citoplasma de los dominios de CD4 y CD8. La interacción de estos co-receptores con Lck facilita su participación en el inicio de transducción de señales (TCR) durante el reconocimiento del antígeno (55).

Todas las proteínas de la familia Src conservan un residuo de glicina inmediatamente después del inicio de metionina (55). La proteína cinasa Lck se encuentra en mayor proporción en la membrana plasmática de las células T.

La cinasa Lck activada fosforila a la tirosina y estimula la capacidad de unión al ADN de la STAT5b, un miembro de la familia STAT activado por una variedad de células tumorales. La cinasa Lck activa interactúa con STAT5b en células tumorales, lo cual sugiere que Lck fosforila directamente a STAT5b (50).

Lck es esencial para el desarrollo y activación de las células T normales. Las propiedades oncogénicas de Lck *in vivo* se mostraron por primera vez por el desarrollo de tumores en ratos atímicos transgénicos que sobreexpresan Lck.

En los seres humanos, el gen de Lck se encuentra en un sitio frecuente de anomalías cromosómicas asociadas con linfomas. La elevada expresión de Lck y de actividad de cinasa también se ha implicado en la patología de tumores malignos linfoides y no linfoides.

Al igual que otros miembros de la familia Src, la actividad de la cinasa Lck se regula negativamente por la fosforilación de un residuo de tirosina altamente conservado (Tyr 505) situado cerca del carboxilo terminal de la proteína (50).

La cinasa Lck activa constitutivamente es oncogénica y transforma a los fibroblastos en cultivo. Estudios recientes sobre STATs han proporcionado nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes oncogénicos (50). En la figura 2 se muestra la imagen de la proteína Lck.



Figura 2. Representación de la proteína Lck (63)

1. Actividad de Lck

La cinasa Lck muestra un aumento en su actividad después de la estimulación con IL-2 en células T y se puede mediar por la fosforilación de residuos de tirosina junto con la subunidad de IL-2R β *in vitro*, específicamente en las posiciones 355, 358, 361, 292 y 510 pero no en la 388 (12).

En estudios recientes (Delespine-Carmagnat, et. al.) de la incubación de células de leucemia de células T humanas con glutatona S-transferasa de fusión de proteínas mutantes de la región ácida mostró que la asociación de Lck es dependiente de los residuos de aminoácidos ácidos en las posiciones 335-365 e independiente de los residuos de tirosina (12).

Lck es regulada positivamente por la fosforilación del residuo de tirosina en la posición 394 (Y-394) y esta actividad se inhibe por la fosforilación de un residuo de tirosina en la posición 505 (Y-505) (12). La activación completa de Lck requiere de un evento de desfosforilación que implica que otros factores puedan asociarse con el IL-2R.

Existen otras cinasas como JAK1 y JAK3 (Janus cinasa 1 y 3) que se asocian con IL-2R. La actividad de JAK3 es central en la activación de receptor de IL-2 que conduce a la proliferación. Se ha demostrado que JAK1 y JAK3 activan a Lck mediante la fosforilación de residuos de tirosina dentro de las subunidades del receptor. Únicamente se requieren los residuos de tirosina dentro de la subunidad β para la proliferación (12).

Estudios sobre células T inactivas, que carecen de expresión perceptible de JAK3, mostraron que el estímulo del IL-2R de afinidad intermedia causó la activación de Lck y la transducción de señales anti-apoptosis, vía activación de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa) mediada por Lck e independiente de JAK1 y JAK3 (12).

El sitio catalítico de Lck es bloqueado y la actividad se inhibe posteriormente cuando el residuo Y-505 es fosforilado. Este residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal de la proteína se ha conservado entre la familia de proteínas tirosina cinasa Src (PTKS). La desfosforilación de este residuo de tirosina presente en la cinasa Src por la proteína fosfatasa de tirosina (SHP-1), regula positivamente su actividad de cinasa. SHP-1, la cual es una fosfatasa citoplasmática que no actúa sobre Lck, pero en el contexto de TCR (receptor de unión de antígeno de células T), la señal de la desfosforilación del residuo Y-505 parece estar mediada por CD45 (una fosfatasa transmembranal) (12, 50).

Se ha propuesto que en ausencia de la actividad de la cinasa JAK3, Lck se activa parcialmente por la desfosforilación del residuo Y-505 por un factor asociado con el dominio PROX (región proximal de la membrana) de la subunidad γ del receptor para IL-2. Para que la cinasa Lck alcance su actividad máxima, el residuo de tirosina Y-505 debe ser desfosforilado para permitir el acceso al sitio catalítico, y el residuo Y-394 debe ser fosforilado para mejorar la actividad cinasa. Otra cinasa asociada con el IL-2R, podría fosforilar el residuo Y-394 (12,50).

En la figura 3 se resume mediante un esquema la transducción de señales en la que participa la cinasa Lck.

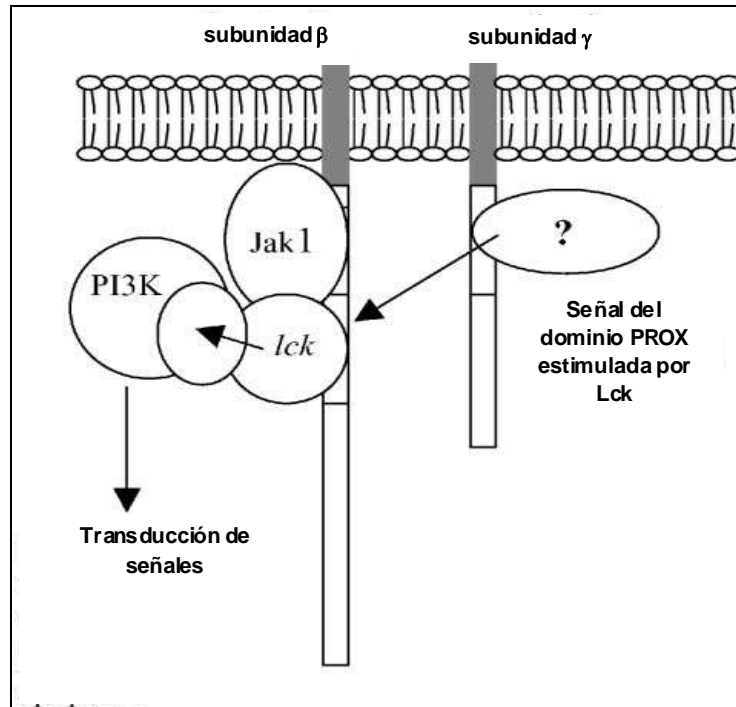


Figura 3. Vía de señalización en la que participa Lck en ausencia de la actividad de JAK3 (12).

Con la disminución de los niveles de JAK3, la señalización por el receptor IL-2R cambia hacia la activación de PI3K independiente de JAK3 y mediado por Lck. Se propone que una fosfatasa asociada con el dominio PROX de la subunidad γ promueve la actividad cinasa de Lck mediando la defosforilación del residuo de tirosina inhibitor en el carboxilo terminal. Una vez defosforilada Lck, aumenta su actividad de cinasa y es capaz de fosforilar a PI3K que se asocia a la subunidad β, a un nivel suficiente para inducir la señalización anti-apoptótica (12). Tal sistema no requiere que las células sean expuestas a niveles altos de IL-2 y proporcionen el medio para promover su supervivencia en la periferia como una consecuencia de la secreción localizada de IL-2.

La presencia de JAK3 puede conducir a una reducción de la capacidad de señales derivadas del dominio PROX de la subunidad γ sobre Lck. Sin este evento de señalización, la activación de PI3K mediada por Lck, que conduce a la inducción de Bcl-2 (inhibidor de la apoptosis) no ocurre. En cambio, Shc se moviliza por la fosforilación del residuo Y-388 en la subunidad β, un evento que Lck no puede lograr, y posteriormente está implicada en la incorporación cooperativa de PI3K a la vía de señalización (12). Esto evita la incorporación de PI3K mediada por Lck o la colocan en una posición donde Lck es incapaz de activarla. Por lo tanto, podría explicar porque Lck no está implicada en la generación de

eventos de señales anti-apoptosis en el contexto de activación del receptor en presencia de actividad de JAK3.

La inhibición de la actividad Lck reduce el nivel de proliferación de células T inducida por IL-2. Esto demuestra que la asociación de Lck con la subunidad β , y su activación, se requiere para la transducción de señal máxima cuando JAK3 está presente (12). La estimulación con IL-2 sobre células T inactivas que expresan solo el IL-2R de afinidad intermedia, permitió demostrar que PI3K podría ser activada por Lck. (12).

Una señal derivada del dominio PROX de la subunidad γ conduce a la activación de Lck. Esto activa a PI3K, que es capaz de mediar la homodimerización de Akt (proteína cinasa B), resultando en la inducción de mecanismos anti-apoptóticos. Este es probablemente un mecanismo importante a largo plazo para la supervivencia de células inmunes en la periferia que puede proveer de "memoria" contra un nuevo desafío antigénico (12).

De modo interesante, en el contexto de activación de JAK3, se sabe que es capaz de activar a los miembros de la familia STAT1, STAT3 y STAT5 (activadores de las señales de transcripción). La señal de Lck se requiere para reclutar a STAT5 y para la activación de mecanismos anti-apoptóticos, pero realmente no afecta el nivel de proliferación (12).

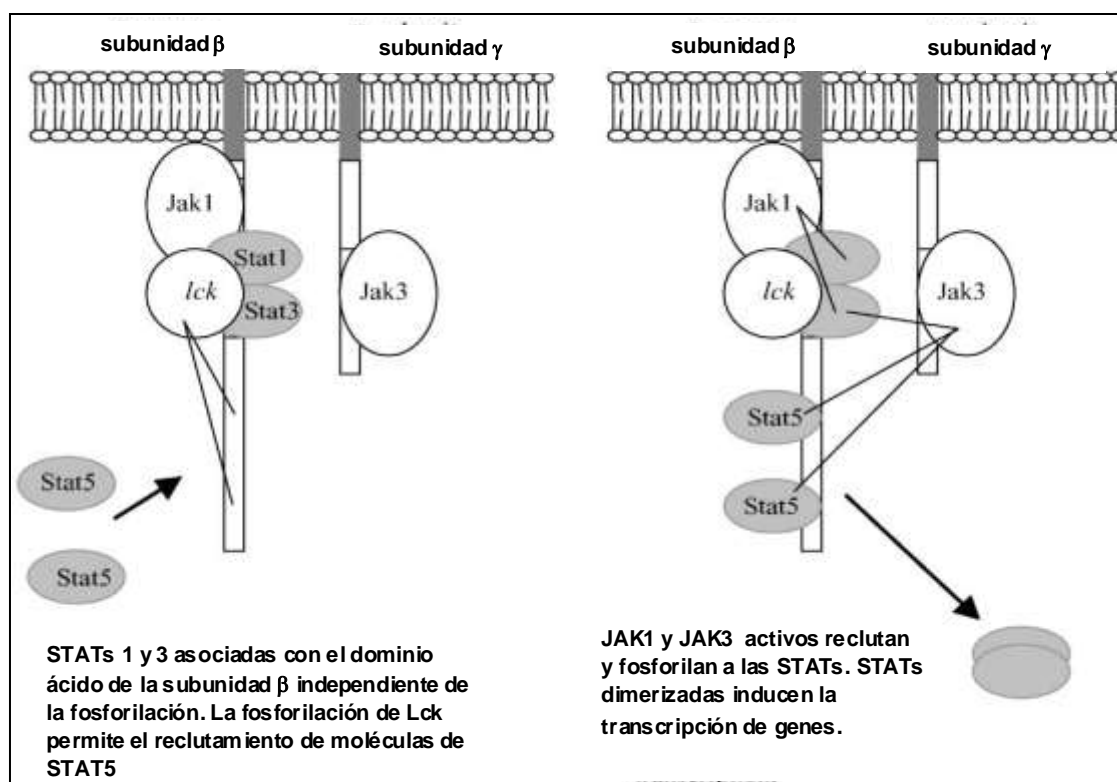


Figura 4. Activación de las STATs por JAK1 y JAK3 (12).

Las rutas de señalización de la IL-2 que inducen diversas respuestas celulares son sumamente complejas y no se han aclarado totalmente. Esto ha sido difícil porque depende de la activación de la cinasa JAK3, la cual parece activar dos vías diferentes de cascadas de señalización. Una, en ausencia de la activación de JAK3, induce mecanismos anti-apoptóticos mediante Lck-PI3K. Con la activación de JAK3 el receptor se hace totalmente activo. Otro, en donde varias PTKS están implicadas en la activación de múltiples cascadas de señalización que inducen proliferación de la célula mediado por JNK (cinasa del N-terminal de Jun), y p42/44MAPK (cinasa activada por mitógeno), y la inducción de mecanismos anti-apoptóticos vía PI3K pero no requieren de Lck (12).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en el mundo (2). El principal factor de riesgo es el VPH (las cepas 16 y 18, son las más frecuentes en mujeres mexicanas), por lo que es de gran importancia conocer las vías de señalización que utilizan estas células para mantener su fenotipo maligno, ya que esto nos permitirá desarrollar inhibidores específicos que sirvan como tratamiento a futuro.

Se ha demostrado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix, establecidas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer a partir de biopsias de pacientes mexicanas, CALO e INBL expresan las tres subunidades del receptor de IL-2. Además, se ha analizado la activación de la vía JAK-STAT en respuesta a la unión de IL-2 a su receptor. Se sabe que una de las primeras cinasas en activarse es la JAK3 y que ésta a su vez activa a las STATs. Las líneas celulares responden al estímulo con IL-2, con dosis bajas aumentando su proliferación. Por otro lado, la cinasa Lck se presenta de manera normal en linfocitos, en estas células se asocia a la cadena β del receptor de IL-2 que es un factor de proliferación de las células T. Lck se activa de manera independiente de las JAKs, y es capaz de activar a STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas. En las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL se expresa Lck, y su fosforilación aumenta en respuesta al estímulo con IL-2. Por lo tanto, es de gran importancia analizar si la cinasa Lck expresada en las líneas tumorales se comporta de manera similar a la cinasa encontrada en linfocitos normales, ya que esto permitirá entender los mecanismos de señalización en las células tumorales y compararlos con las células normales para desarrollar tratamientos alternativos para el carcinoma de cérvix.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Analizar la vía de señalización que desencadena la IL-2 a bajas dosis en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL y determinar la participación de la cinasa Lck.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar y mantener líneas celulares CALO e INBL.
- Determinar el estado de fosforilación en tirosina de Lck en respuesta a la IL-2
- Determinar la interacción entre Lck e IL-2R β
- Determinar la unión entre Lck y STAT5.

VI. HIPOTESIS:

La cinasa Lck presente en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL formará un complejo con la cadena β del receptor IL-2 y con STAT5 en respuesta a la IL-2, por lo que integrará un complejo semejante a lo que ocurre en linfocitos normales para inducir señales anti-apoptóticas.

VII. METODOLOGÍA

1. CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer cervicouterino CALO e INBL. Éstas se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-G, anfotericina B y 0.01% de estreptomicina. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 36-37° C, con un ambiente de CO₂ al 4%. Cada tercer día se revisaron en el microscopio invertido para observar el crecimiento, ya que pueden requerir cambio de medio o resiembra. En el caso de cambio de medio, se desechó el contenido en la botella y se agregó medio nuevo; cuando se resembró se ocupó solución de verseno para despegar las células ya que éstas se adhieren a la botella de cultivo, se centrifugaron las células para desechar el verseno y se agregó medio fresco.

2. CONTEO DE CÉLULAS

En las botellas que contienen las líneas celulares CALO e INBL, se desechó el medio de cultivo, posteriormente se agregó verseno para despegarlas, después para cada línea, la solución de verseno con células se colocó en tubos para centrífuga de plástico de 50 mL, se colocaron 10 mL de medio de cultivo, se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, enseguida se desechó el sobrenadante y se agregó medio de cultivo al 10% y se resuspendieron las células de cada línea. Finalmente se tomaron 20 µL, se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo de las mismas.

3. LISADO TOTAL DE CÉLULAS

Se sembraron 3 millones de células por caja, se incubaron por 48 horas a 37° C con RPMI-1640 con suero fetal de bovino al 0.5%, después de transcurrido este tiempo se reemplazó el medio con 1 mL de medio RPMI-1640 sin suero y se incubaron por 15 minutos. Pasado este tiempo se estimularon las células de cada línea con IL-2 (10 U/mL), por 5, 10 y 15 minutos y se utilizó una caja por línea; como control negativo se utilizaron células sin IL-2. Las cuatro cajas de CALO se marcaron de la siguiente manera: control negativo, 5 minutos, 10 minutos y 15 minutos; el mismo procedimiento se realizó con las INBL, esto se hizo para determinar el tiempo en que se presenta la máxima activación de las proteínas. Posteriormente se colocaron en la incubadora y se comenzó a tomar tiempo, transcurridos los 5 minutos se tomó la primera caja de petri de la incubadora para lo cual se realizó lo siguiente: se desechó el medio que contienen la caja y se agregó 1 mL de PBS frío para detener la estimulación, se desechó el PBS, se agregó 1 mL de buffer de lisis total y con gendarme se raspó la caja para que las células se lisaran. Las células más el buffer de lisis se colocó en un tubo Eppendorff. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

El mismo procedimiento se realizó para todas las condiciones experimentales (10 minutos, 15 minutos y el control para cada línea celular). Las células en buffer de lisis se incubaron durante 15 minutos a 4°C, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4° C. El sobrenadante representa la fracción del citoplasma y el botón representa la fracción nuclear y restos celulares.

4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando un kit comercial (Bio-Rad Dc Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, Ca.), mediante el método de Lowry el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

Se preparó una curva estándar de la siguiente manera: 100 mg de albúmina y se disolvieron en 1 mL de buffer de lisis, de esta solución se prepararon diferentes diluciones: 70 μ L de buffer y 30 μ L de albúmina (concentración final 30 μ g/mL), 85 μ L de buffer y 15 μ L de albúmina (concentración final 15 μ g/mL), 95 μ L de buffer y 5 μ L de albúmina (concentración final 5 μ g/mL), 99 μ L de buffer y 1 μ L de albúmina (concentración final 1 μ g/mL).

Para la preparación de las muestras se realizó lo siguiente: Se colocaron 200 μ L de reactivo B (ver anexo) en pozos de una placa de ELISA, enseguida se adicionaron 25 μ L de reactivo A (ver anexo) en cada pozo, después se agregaron 5 μ L de cada una de las muestras obtenidas en el lisado total, posteriormente se dejó la placa en agitación por 15 minutos a temperatura ambiente, finalmente se leyó la absorbancia a 630 nm en el lector de placas para determinar la cantidad de proteínas obtenidas por muestra.

5. INMUNOPRECIPITACIÓN

Esta técnica se utilizó para separar proteínas de una mezcla que contiene gran cantidad de proteínas. En tubos Eppendorff se colocaron 25 μ L de esferas de agarosa acopladas con proteína A, se agregaron 100 μ L de buffer de lisis para eliminar los conservadores que tiene, se centrifugaron por 1 minuto a 13,000 rpm a 4° C, se desechó el buffer con precaución, este procedimiento se repitió dos veces. Una vez lavadas se agregaron 1.5 μ L de anticuerpo (Ab) anti-Lck, más 40 μ L de buffer de lisis y se incubaron por 1 hora a 4° C con agitación. Después de este tiempo, las esferas con anticuerpo unido se lavaron con buffer de lisis y se incubaron con los lisados de células estimuladas con IL-2 y con los controles negativos durante tres horas a 4° C con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo, las esferas se lavaron con buffer de lisis cinco veces, se agregaron 20 μ L de buffer de Laemmli no reductor a cada tubo, se hirvieron por 5 minutos y se guardaron a -20° C.

6. ELECTROFORESIS

Es una técnica que separa a las proteínas por su peso molecular. Se realizó de acuerdo al método de Laemmli, se utilizó una concentración del gel concentrador de 4.5 %. Se prepararon los geles separador (10 %) y concentrador (4.5%), posteriormente se colocaron en el aparato de electroforesis, después de que estos polimerizaron se agregaron las muestras obtenidas en el lisado total e inmunoprecipitación. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375M Tris-HCl (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS, y las concentraciones de acrilamida fueron 12.5% y 10% p/v). Los geles se polimerizaron por adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co.

U.S.A.) y tetrametiletileno-diamina (TEMED), (Sigma Chemical, Co, U.S.A.) para el gel separador o 0.1 % de cada catalizador en el gel concentrador. El amortiguador de corrida (pH 8.3) contuvo 0.025 M Tris, 0.192 M glicina. Se utilizaron marcadores de peso preteñidos (Gibco, U.S.A.) en el rango de 200 a 16 KDa. La electroforesis se realizó con un voltaje de 85V por 2 horas en una cámara vertical (ATTO).

7. WESTERN-BLOT

El western-blot se utilizó para identificar proteínas. Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 125 mA durante 1.5 horas utilizando para este fin buffer de transferencia. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloquearon con albúmina bovina al 1% en buffer TBS-Tween durante toda la noche a 4° C. Todas las membranas se incubaron con el anticuerpo antifosfotirosina (1:2000) durante 1.5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas se lavaron cinco veces con TBS-Tween por 5 minutos cada una y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ver anexo, Pierce, USA).

8. ELUCIÓN DE ANTICUERPOS

Esta técnica se utilizó para probar anticuerpos diferentes sobre una misma membrana, se utilizó para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas en tirosina. Cada membrana se lava una vez con TBS, se incubó con la solución de elución (ver anexo) de anticuerpos durante 1 hora a 70-80° C, se lavó una vez con TBS-Tween por 15 minutos con agitación constante; se lavó tres veces con TBS-Tween por 5 minutos con agitación. La membrana se bloqueó toda la noche con albúmina al 3% en TBS-Tween. Se incubó con el anticuerpo específico anti-Lck, anti-cadena β o con anti-STAT5, durante 1.5 horas con agitación constante, se lavó 5 veces con TBS-Tween y se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 30 minutos con agitación constante. Se lavaron las membranas con TBS-Tween y dos veces con TBS, y se visualizaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (Pierce, USA).

VIII. RESULTADOS

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el receptor para IL-2 está presente en las líneas celulares CALO e INBL. En estudios realizados en linfocitos normales se ha reportado que la subunidad beta interactúa con la cinasa Lck y que se activan señales anti-apoptóticas.

Para determinar la presencia de la cinasa Lck y analizar su activación en respuesta a IL-2 en células de carcinoma de cérvix procedimos a obtener lisado total a partir de líneas celulares y su análisis por electroforesis, e inmunoblot, lo cual permitió determinar la presencia de Lck. Se puede observar en la figura 5 (A y B) que la IL-2 induce un aumento en la fosforilación de Lck con respecto al tiempo. Se nota que la línea CALO no presenta una fosforilación basal de Lck (figura 5 A, carril 1, control) a diferencia de la línea INBL que sí presenta una alta fosforilación basal (figura 5 B, carril 1, control), sin embargo, se observa un aumento en la fosforilación a los 15 minutos de estimulación en ambas líneas celulares.

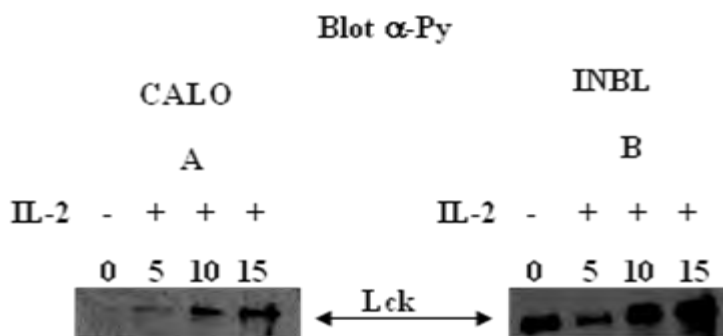


Figura 5. Fosforilación en tirosina de la cinasa Lck en respuesta a IL-2. Las células se trataron con IL-2 (10 U/mL) a diferentes tiempos, se lisaron y se separaron las proteínas mediante electroforesis. Las proteínas se visualizaron mediante inmunoblot con anticuerpos antifosfotirosina. (A) Línea celular CALO: 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos. (B) Línea celular INBL: 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos.

Para determinar si la proteína identificada en los lisados era Lck se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cinasa Lck para ambas líneas celulares a partir de lisados totales, posteriormente se realizó su análisis mediante electroforesis e inmunoblot y para analizar el grado de fosforilación de la proteína Lck. Observamos que conforme se incrementa el tiempo de estimulación con IL-2 (10U/mL) aumenta el grado de fosforilación (figura 6).

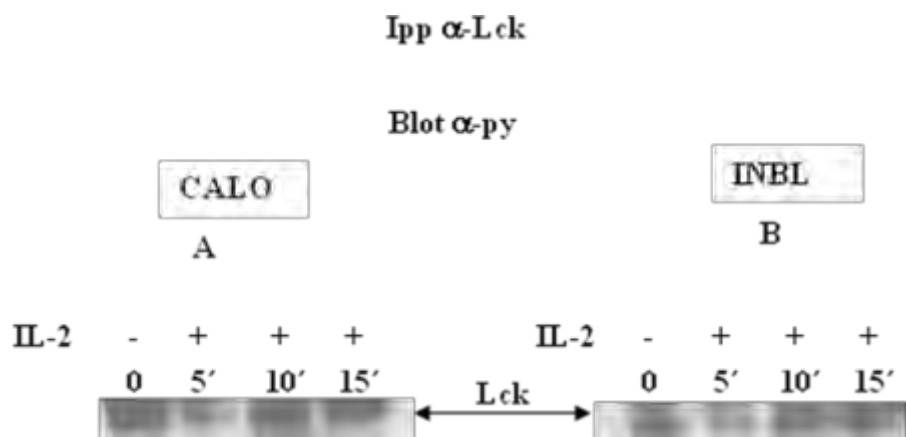


Figura 6. Proteína Lck fosforilada en tirosina en respuesta a IL-2. Las células se trataron con IL-2 (10 U/mL) a diferentes tiempos, se lisaron, se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Lck acoplados a esferas de agarosa conjugadas con proteína A, se separaron las proteínas inmunoprecipitadas por electroforesis y se visualizaron mediante inmunoblot con anticuerpos antifosfotirosina. Línea celular CALO (A): 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos. Línea celular INBL (B): 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos.

Debido a que la cinasa Lck tiene un peso molecular de 56 KDa, el cual es muy semejante al de la cadena pesada de los anticuerpos (55 KDa), no fue posible realizar un blot anti-Lck en la misma membrana.

Por lo tanto, se realizó una inmunoprecipitación igual a la anterior (figura 6) pero en este caso decidimos realizar la electroforesis en condiciones no reductoras. Esto permitió mantener el anticuerpo íntegro debido a que no se rompen los puentes disulfuro. El peso del anticuerpo es de 150 kDa, por lo que no interfiere en la identificación de la cinasa Lck.

Se inmunoprecipitó la cinasa Lck a partir de lisados totales y se visualizó la proteína utilizando anticuerpos anti-Lck (Santa Cruz Biotechnology), observándose una banda que corresponde a un peso molecular de 56 kDa (figura 7) en ambas líneas, que es el peso esperado para la cinasa Lck.

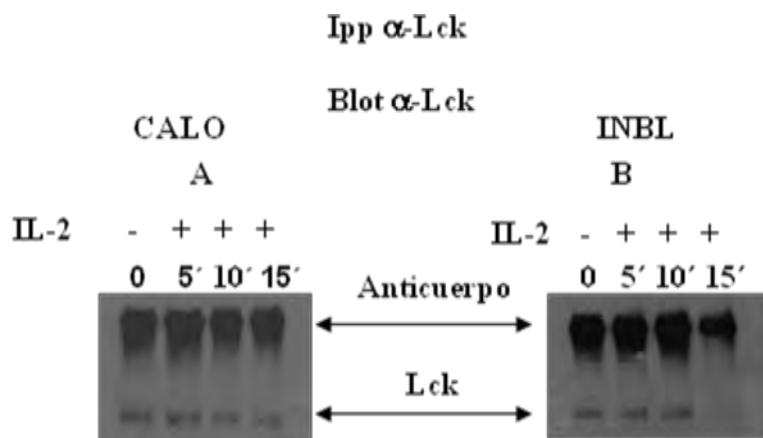


Figura 7. Presencia de la proteína cinasa Lck. Las células CALO e INBL se estimularon con IL-2, se lisaron y se inmunoprecipitó a la cinasa Lck utilizando un anticuerpo anti-Lck. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE 10 % no reductor y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Posteriormente se realizó un inmunoblot con anticuerpos anti-Lck y se observaron las bandas con peso aproximado de 56 kDa. (A) CALO: 0, control; estimuladas con IL-2 (10U/ml) por 5, 10 y 15 minutos. (B) INBL: 0, control; por 5, 10 y 15 minutos.

Se ha demostrado que la cadena beta del receptor para IL-2 interactúa con la cinasa Lck (21, 56, 57). Para analizar la interacción entre estas proteínas se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Se inmunoprecipitó la cinasa Lck de lisados de células estimuladas con IL-2, se analizó por electroforesis e inmunoblot con anticuerpo anti-cadena β para confirmar la interacción de Lck con la cadena beta. Con estos resultados se sugiere la interacción de Lck con la cadena β en las líneas celulares al ser estimuladas por diferentes tiempos con IL-2 a una concentración de 10 U/mL (figura 8). Se observa que en el control negativo de las líneas celulares CALO e INBL hay interacción de la cadena β con Lck y que al incrementar el tiempo de estímulo aumenta esta interacción.

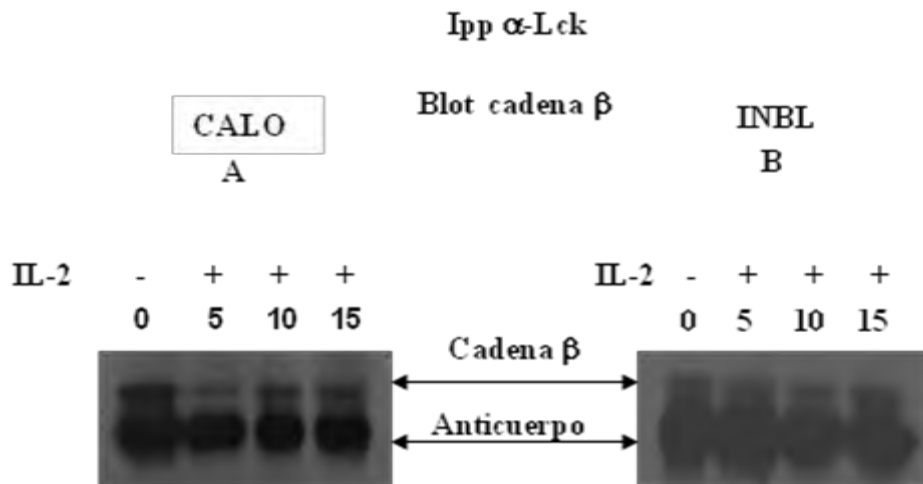


Figura 8. Interacción entre la cinasa Lck y la cadena β del receptor para IL-2. Las células se trataron con IL-2 (10U/mL) a diferentes tiempos, se lisaron y se inmunoprecipitaron proteínas con anticuerpo anti-Lck. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis y se visualizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-cadena β . (A) Línea celular CALO: 0; control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos. (B) Línea celular INBL: 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos. El control negativo se observó a la cadena β en ambas líneas celulares.

Para analizar el grado de fosforilación de la cadena β , se llevó a cabo la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-cadena β , las proteínas se separaron por electroforesis, y se analizó la fosforilación mediante inmunoblot. Se puede observar en la figura 9 que la IL-2 induce un aumento en la fosforilación de la cadena β con respecto al tiempo. Se nota que la línea CALO presenta una fosforilación basal (figura 9 A, carril 0, control) a diferencia de la línea INBL que presenta una alta fosforilación basal (figura 9 B, carril 0, control), sin embargo, se observa un aumento en la fosforilación a los 15 minutos de estimulación en ambas líneas celulares.

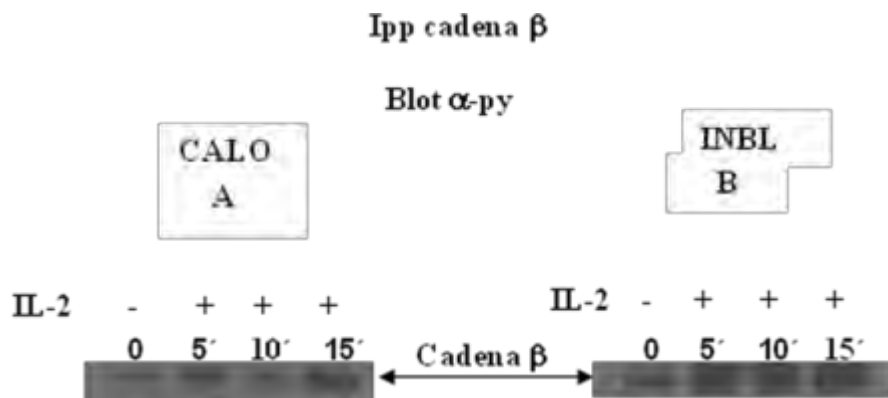


Figura 9. Cadena β fosforilada en respuesta a IL-2. Las células se trataron con IL-2 (10 U/mL) a diferentes tiempos, se lisaron y las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por electroforesis. Las proteínas se visualizaron mediante inmunoblot con anticuerpos antifosfotirosina. (A) Línea celular CALO: 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos. (B) Línea celular INBL: 0, control; estimuladas por 5, 10 y 15 minutos.

En linfocitos normales se ha observado que existe una interacción entre la cinasa Lck y la proteína STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas. Por lo tanto, analizamos la interacción entre la cinasa Lck y la proteína STAT5. De lisados celulares se inmunoprecipitó la proteína STAT5 y se analizó la presencia de la cinasa Lck. Se observa que en los controles negativos para las líneas celulares CALO e INBL existe una unión, y que esta aumenta a los 10 min de estimulación y disminuye a los 15 minutos, pero no ocurre así en INBL (figura 10).

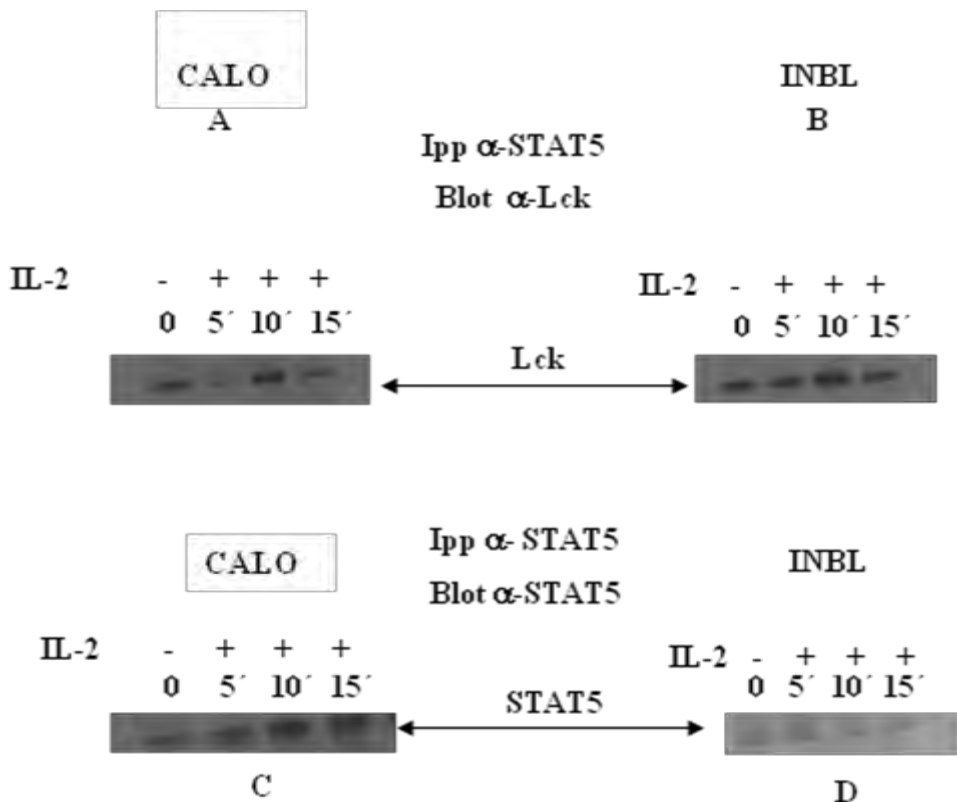


Figura 10. Inmunoprecipitación anti-STAT5. La inmunoprecipitación de proteínas de ambas líneas celulares se realizó con el anticuerpo anti-STAT5 (Santa Cruz Biotecnology) acopladas a esferas de agarosa conjugadas con proteína A. El revelado se detectó en primer lugar con anti-Lck y se observaron bandas que indicaron unión entre la proteína cinasa Lck y STAT5 (A y B). Para comprobar la presencia de STAT5, las membranas fueron tratadas con amortiguador ácido para eluir los anticuerpos, y se revelaron con anticuerpo anti-STAT5 (C y D). La estimulación se llevó a cabo con IL-2 a 10 U/mL. El control negativo (0); las muestras se estimularon con IL-2 (10U/mL) durante 5, 10 y 15 minutos, para ambas líneas celulares.

Para corroborar la interacción de la cinasa Lck con la proteína STAT5, ahora se inmunoprecipitó la cinasa Lck, posteriormente se separaron las proteínas por electroforesis, y se analizó la interacción utilizando anticuerpos anti-STAT5, con esto se comprobó la interacción de Lck con STAT5 en cada una de las líneas celulares al ser estimuladas a diferentes tiempos con 10U/mL de IL-2 (figura 11).

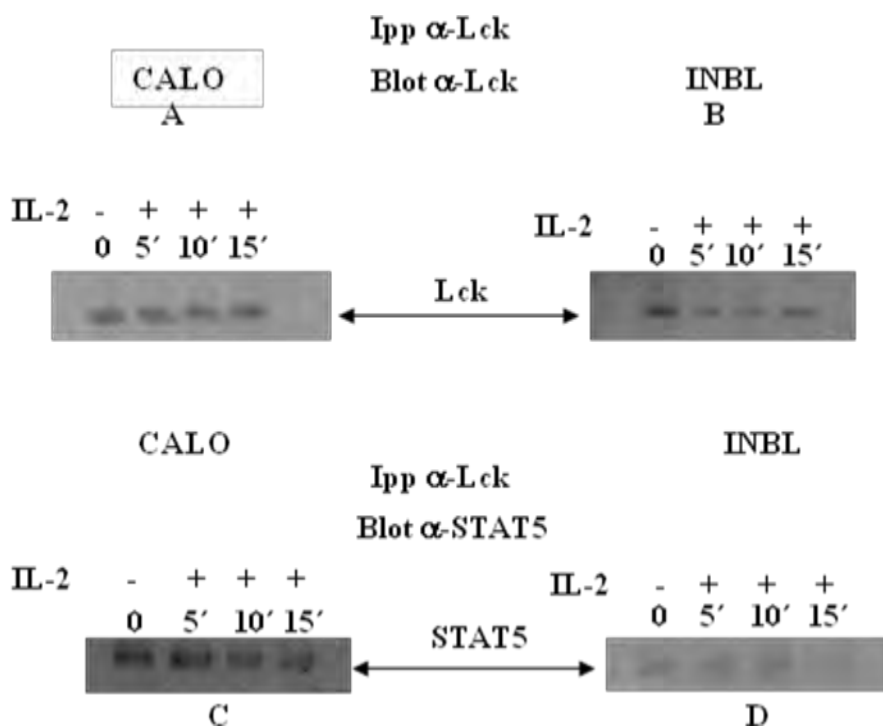


Figura 11. Inmunoprecipitación anti-Lck. La inmunoprecipitación de la cinasa en ambas líneas celulares se realizó con el anticuerpo anti-Lck. Se reveló en primer lugar con anti-STAT5 y se observaron bandas que indicaron unión entre la proteína cinasa Lck y STAT5 (A y B). Para comprobar la presencia de Lck, las membranas se trataron con amortiguador ácido para eluir los anticuerpos, y se revelaron con anticuerpo anti-Lck (C y D). La estimulación se llevó a cabo con IL-2 a 10 U/mL. El control negativo (0); las muestras se estimularon con IL-2 (10U/mL) durante 5, 10 y 15 minutos, para ambas líneas celulares.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En investigaciones anteriores, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor para interleucina-2 (IL-2R) cadenas α , β y γ y que además puede responder al estímulo con IL-2. El receptor para IL-2 carece de actividad intrínseca de cinasa y se asocia con diferentes proteínas cinasas para que se pueda activar la cascada de señalización iniciada por IL-2 (5).

La cadena β pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas esenciales para la transducción de señales intracelulares (58). Se ha demostrado que Lck se asocia con la cadena β del receptor IL-2, que es fundamental para la señalización activada por IL-2 y que induce la activación de Lck (figura 7 y 8).

Lck se regula positivamente por la fosforilación de tirosina en la posición 394 (Y-394) y su actividad se inhibe fuertemente por la fosforilación de residuos de tirosina en la posición 505 (Y-505). En los linfocitos se ha demostrado que la activación de Lck está asociada con la inhibición de la apoptosis (12).

Debido a que el receptor para IL-2 está presente en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL y que la cinasa JAK3 también está presente y activa de manera constitutiva, decidimos analizar si la cinasa Lck también está presente y si se activa en respuesta a la IL-2 (figura 5). Nuestros resultados muestran la presencia de la cinasa Lck y el aumento en su fosforilación en tirosina en respuesta a la unión de IL-2 a su receptor (figuras 5 y 6).

Los resultados de la figura 5 demostraron que la fosforilación de Lck aumenta cuando se estimula con IL-2 a tiempos de 10 y 15 minutos, en la línea CALO se observó una fosforilación menor a los 15 min que INBL. Se observa que en INBL, Lck se encuentra activada de manera constitutiva, por lo que nos hace suponer que INBL es una línea celular mas agresiva que CALO, esto debido a que Lck es capaz de inducir la activación de vías anti-apoptoticas a través de PI3K (9).

Se detectó que existe una interacción tanto constitutivamente como con la estimulación con IL-2, se comprobó que esta asociación se incremento conforme al tiempo de estímulo con IL-2, y que esta interacción fue mayor en la línea INBL que CALO, por lo que se puede suponer que existe una asociación entre Lck y la cadena beta de IL-2 en las líneas CALO e INBL (figuras 6 y 7).

Se sabe que al igual que JAK3, Lck se asocia a la cadena β del receptor de IL-2, y que la proliferación mediada por la IL-2 requiere de la expresión y fosforilación de JAK3, indicando que se trata de un acontecimiento clave en la transducción de señales de proliferación (59). En células normales se ha demostrado que JAK1 y JAK3 activan a Lck y juntos median la fosforilación de los residuos de tirosina dentro de las subunidades del receptor y que sólo los residuos de tirosina en la subunidad beta son necesarios para la proliferación. En las líneas células CALO e INBL, no se sabe con certeza si JAK3 es independiente de Lck, esto podrá comprobarse con el uso de inhibidores de la cinasa JAK3

(figuras 8 y 9). También se sabe que los residuos de tirosina fosforilados permiten señales secundarias, a través de sus dominios SH2, estos se activan por fosforilación e inducen mayor activación de los receptores responsables de las vías de señalización. La mayoría de los eventos de señalización pueden estar vinculados a determinados residuos de tirosina en la subunidad beta, pero la inducción de bcl-2 no requiere ninguna (60). Mientras que la regulación de la proliferación de células T mediada por IL-2 se afecta por la expresión de JAK3, esta expresión no afectó a la inducción de bcl-2, un hallazgo interesante, cuando en determinadas circunstancias, tales como en células T anérgicas, la activación de JAK3 y la posterior activación de JAK1 no se observa (61).

Estudios sobre células T inactivas, que carecen de expresión perceptible de JAK3, mostraron que el estímulo del IL-2R de afinidad intermedia causó la activación de Lck y la transducción de señales anti-apoptosis, vía activación de PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa) mediada por Lck e independiente de JAK1 y JAK3, permite suponer que en las líneas celulares CALO e INBL, Lck se puede activar independientemente de las JAKs y mantener activa la vía o vías para inducir la anti-apoptosis mediada por PI3K y subsecuentemente activar otras proteínas vía AKT para activar a p70 y la vía Ras como una forma de inhibir la apoptosis. Aunque también existe la posibilidad de que ambas vías se activen y sean sinérgicas en el efecto de proliferación y antiapoptosis (12).

Con la disminución de los niveles de JAK3, la señalización a través de la IL-2R independiente de JAK3 para la activación de PI3K se da a través de la activación de Lck. Es una propuesta muy atractiva que una fosfatasa (PI3K) asociada con el dominio PROX de la subunidad γ c promueva la actividad de la cinasa Lck mediada por la desfosforilación de la tirosina inhibidora presente en el extremo carboxilo. Al haber sido desfosforilada la cinasa Lck aumenta su actividad y es capaz de fosforilar a PI3K asociada a la subunidad beta a un nivel suficiente para inducir la anti-apoptosis (12). Un sistema de este tipo no requiere que las células estén expuestas a niveles altos de IL-2 y proporcionarían un medio para promover su supervivencia en la periferia como consecuencia de la secreción local de la IL-2 no relacionada en la respuesta inmune. Con el tiempo, es probable que el número de cada clon de células T disminuirá por que la supervivencia depende de señales externas a la exposición de IL-2 la cual no está garantizada (12).

La presencia de JAK3 puede dar lugar a una reducción en la capacidad de las señales procedentes del dominio PROX de la subunidad γ c para actuar sobre Lck. Sin este evento de señalización, Lck no promueve la activación de PI3K, la cual no garantiza que impulse a la inducción de Bcl-2 (62). En su lugar, Shc se recluta por la fosforilación de Y-388 en la subunidad β , un evento que no puede cumplir Lck y, posteriormente, participa en la activación de PI3K. Estos eventos probablemente impidan el reclutamiento de PI3K por Lck o lo coloca en una posición en la que no está en condiciones de activarlo (figura 5 y 6). Esto podría explicar por qué Lck no participa en la generación de señales anti-apoptóticas en el contexto de la activación de los receptores en presencia de actividad de JAK3 (62).

Lck tiene un papel importante en la proliferación de linfocitos normales, en las líneas celulares CALO e INBL es probable que esta proteína bloquee la apoptosis, lo cual les

puede proveer una vía de resistencia tanto algunos medicamentos como al sistema inmune (figura 7).

En estadios más avanzados como en el caso de la línea INBL, se observa que las células presentan activación constitutiva de Lck (figuras 5 y 6).

El papel que tiene Lck en el mantenimiento de la anti-apoptosis es a través de la activación PI3K, lo cual contribuirá a que la célula este mejor adaptada para ser más invasiva.

Los resultados obtenidos muestran la interacción entre la cinasa Lck y STAT5 en respuesta a IL-2 (figuras 10 y 11). Otros factores de transcripción citoplasmáticos activados por el IL-2R son algunos de los miembros de la familia STATs. STAT5a y STAT5b son reclutados a la tirosina del extremo carboxilo terminal de la subunidad β del IL-2R, donde se fosforilan por las cinasas de familia JAK. Sin embargo, STAT5 puede unirse de manera directa a Lck, se fosforila por esta cinasa. En las líneas celulares CALO e INBL, existen estas dos formas de activar a STAT5, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que JAK3 es capaz de activar a STAT3 y STAT5 (3), y los resultados obtenidos en este trabajo, indican que STAT5 es capaz de asociarse a Lck, de manera muy parecida a como ocurre en células normales (figuras 10 y 11).

Este fenómeno podría ser un indicio de que, a diferencia de lo que sucede en células normales, esto es, que la vía de JAK3 y la vía de Lck sean excluyentes, en estas líneas celulares actúen de manera conjunta para hacer a estas células más invasivas y resistentes a la apoptosis. En linfocitos normales se ha observado que existe una interacción entre la cinasa Lck y la proteína STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas (12). En este trabajo, se demostró que los factores de transcripción STAT, en especial STAT5 interactúan directamente con la cinasa Lck y que se activa de manera independiente de JAK3. En estadios más avanzados como en el caso de INBL se observa que las células presentan activación constitutiva o basal de Lck y JAK3 (figura 10 y 11).

La cinasa Lck constitutivamente activa es oncogénica y transforma los fibroblastos en los cultivos. La activación de STAT5b es una consecuencia directa de la activación de Lck en las células tumorales y contribuye a la oncogénesis mediada por Lck.

El papel que Lck juega en la transformación y mantenimiento de la tumorigénesis no está bien definido, en este estudio hemos comprobado la presencia de Lck así como su aumento de fosforilación inducido por la estimulación de IL-2 (10) y su interacción con la subunidad β del receptor de IL-2. Además, se comprobó la asociación de la proteína STAT5 con la cinasa Lck y se observó que en ambas líneas presentan activación constitutiva.

Estos resultados sugieren la activación de la vía de señales que bloquean la apoptosis en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

X. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran la presencia de la proteína Lck en líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL y que además responde al estímulo con IL-2 aumentando su fosforilación. Además se demostró que Lck interactúa con IL-2R β y con STAT5 de manera similar a lo reportado para células normales. Es probable que Lck active la vía de PI3K, generando señales anti-apoptóticas. Se mostró que STAT5 puede interactuar y ser activada por Lck, la cual es una vía alternativa a la vía de JAK-STAT.

XI. PERSPECTIVAS

Se propone realizar estudios de inhibición de la cinasa Lck para determinar la participación de la proteína Lck en la vía de activación de STATs estimulada a diferentes dosis de IL2. También analizar la vía de PI3K inhibiendo a la cinasa Lck y determinar si depende de ésta para su activación. Analizar la activación de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-X_L y Bcl-2.

XII. ANEXOS

1. MATERIAL Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

- Líneas celulares CALO (estadio IIIB) e INBL (estadio IVB) establecidas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.
- Medio de cultivo comercial RPMI-1640.
- Suero fetal de bovino, mantenerlo en refrigeración, antes de adicionarlo al medio de cultivo se recomienda someterlo a un baño de agua a 56° C durante 30 minutos para inactivar algunas proteínas que interfieren con crecimientos celular.
- Penicilina-G, anfotericina B y estreptomicina (Invitro).
- Albúmina bovina libre de inmunoglobulina (catalogo 52-2323) (Sigma, USA).
- Reactivo A (catalogo 500-0113) y Reactivo B (catalogo 500-0114) (Bio-Rad Dc Protein Assay).
- Anticuerpos anti-Lck, anti-STAT5, anti-cadena β y antifosfotirosina (Santa Cruz Biotechnology, USA).
- Esferas de agarosa conjugadas con proteína A (Invitrogen).
- Buffer de Laemli no reductor.
- Solución de elución: En 800 mL de agua bidestilada se disuelven las siguientes sustancias 3.75 gr de glicina 0.1 M, 2.5 gr de dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS), se ajusta a pH 2.2 con HCl 10 N, se lleva a un volumen de 1000 mL.
- Solución de Verseno: En 800 mL de agua bidestilada se disuelven las siguientes sustancias: 0.20 g EDTA, 3.04 g de Tris base, 8 g de NaCl y 0.40 g de KCl, el pH final de la solución se ajusta a 7.7 con HCl 10 N, se lleva el volumen a 1000 mL y enseguida se esteriliza en autoclave a 20 lb de presión durante 20 minutos.
- Buffer de lisis: A un tubo de ensaye de 50 mL agregar 10 mL de agua bidestilada, después 500 μ L de Triton X-100 esperar a que se disuelva totalmente, después agregar, 500 μ L de PMSF 0.1 M, 50 μ L de ortovanato de sodio, 10 μ L de EDTA 0.5 M, 1.5 mL de NaCl 5 M, 3 mL de NaF 0.5 M, 1 mL de pirofosfato de sodio y 500 μ L de Tris 1 M pH 7.5.
- Buffer de lisis total: La solución de buffer de lisis anterior adicionada con: 500 μ L de aprotinina a una concentración de 100 μ g/mL, 500 μ L de leupeptina a una concentración de 100 μ g/mL, 500 μ L de pepstatina a una concentración de 100 μ g/mL.

- Solución amortiguadora de fosfatos (PBS): Para 1000 mL se requieren los siguientes reactivos: 0.1 g de $MgCl_2$, 0.1 g de $CaCl_2$, 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 2.16 g de NaH_2PO_4 y 0.2 g de K_2HPO_4 . El $MgCl_2$ y $CaCl_2$ se disuelven por separado en 100 mL de agua destilada, las sales restantes se disuelven en 800 mL de agua bidestilada, se mezclan las dos soluciones, se ajusta el pH a 7.2-7.4 con HCl 10 N y se afora a 1000 mL.
- Gel para electroforesis (SDS-PAGE): Para el gel separador se requieren los siguientes reactivos: 3.33 mL de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de gel separador 0.375 M pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.5 mL de persulfato de amonio al 1.5%, 4.8 mL de agua bidestilada y 0.015 mL de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). Para el gel concentrador se requieren: 0.625 mL de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8), 1.25 mL de gel concentrador 1.125 M Tris pH 8.8, 0.05 mL de SDS al 10%, 0.25 mL de persulfato de amonio al 1.5%, 2.8 mL de agua bidestilada y 0.0075 mL de TEMED.
- Buffer de transferencia (WESTERN-BLOT): Para preparar 1000 mL se requieren las siguientes sustancias: 3.02 g de Tris, 14.4 g de glicina y 0.5 g de SDS. Estos reactivos se disuelven primero en 700 mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 8.3 con HCl 10 N, se completan 800 mL y se agregan 200 mL de metanol para llegar a un volumen final de 1000 mL.
- Tris buffer salino (TBS): Para 1000 mL se requiere lo siguiente: 20 mL de Tris 1 M pH 7.5, 30 mL de NaCl 5 M, se completa a 1000 mL con agua bidestilada.
- Tris buffer salino (TBS)-Tween: A 500 mL de TBS se le adiciona 500 μ L de Tween 20.
- Método de quimioluminiscencia: Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con el anticuerpo primario durante 1:30 hrs, se realizaron 5 lavados con TBS-Tween. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-mouse o anti-rabbit, dependiendo del anticuerpo primario) durante 1 hora, se realizaron 5 lavados con TBS-Tween y dos lavados con TBS, se agregaron 650 μ L de reactivo 1 y 650 μ L de reactivo 2 del Supersignal west pico (chemiluminescent product, #34080, Pierce) y se agitaron durante 5 minutos. La membrana se colocó en plástico, se eliminaron las burbujas, y se colocó la membrana de nitrocelulosa en contacto con película de Rayos X en un cassette para quimioluminiscencia durante diferentes tiempos, dependiendo de la intensidad de la señal. Se revelaron las películas al sumergirlas 30 segundos en revelador (Kodak), enjuagando en agua, y finalmente lavándolas 1 minuto en fijador (Kodak). Después de este tiempo, se enjuagaron las películas con agua y se dejaron secar al aire.

XIII. BIBLIOGRAFIA:

1. Valle A, Weiss B, Origen molecular del cáncer. *Vertientes*. Revista Especializada en Ciencias de la Salud 2003; 6(1):3-8.
2. Alonso P, Cáncer Cervicouterino: diagnóstico, prevención y control. México: Médica Panamericana; 2000. p. 7-9, 15-20.
3. Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Cacéres-Cortés JR, Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I, et al, Interleukin-2 (IL-2) receptor- β signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling* 2004; 16:1239-47.
4. Nicolini A, Carpi A, Rossi G, Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006; 17:325-337.
5. Abbas A, Lichtman A, Pober J, Inmunología celular y molecular, 5ta. ed., España: McGraw Hill; 2004. p. 243-247.
6. Smith KA, Interleukin-2; inception, impact and implications. *Science* 1988; 240: 1169-76.
7. Swain SL, Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. *Curr Opin Immunol*. 1991; 3: 304-10.
8. Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y, Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001; 14: 105-10.
9. Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R, Interleukin-2, interleukin-15 and their receptors. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 205-26.
10. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R, Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976; 193: 1007-08.
11. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA, Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002; 13: 169-83.
12. Ellery JM, Nicholls PJ, Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002; 13: 27-40.
13. Kirken RA, Malabarba MG, Xu J, DaSilva L, Erwin RA, Liu X, et al. Two discrete regions of interleukin-2 (IL2) receptor beta independently mediate IL2 activation of a PD98059/rapamycin/wortmannin-insensitive Stat5a/b serine kinase. *J Biol Chem* 1997; 272(24):15459- 65.
14. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March CJ, A new cytokine receptor superfamily. *TIBS*. 1990; 15: 265.
15. Hatakeyama M, Minamoto S, Uchiyama T, Hardy RR, Yamada G, Taniguchi T, Reconstitution of functional receptor for human interleukin-2 in mouse cells. *Nature* 1985; 318: 467.
16. Dukovich M, Wano Y, Thuy JB, Katz P, Cullen BR, Kehr JH, Greene WC, A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. *Nature* 1987; 327: 518.
17. Tsudo M, Kitamura F, Miyasaka M, Characterization of the interleukin-2 receptor β chain using three distinct monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 1982.

18. Bazan JF, Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today* 1991; 11: 1523.
19. 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. *EMBO J* 1991; 10: 3191.
20. 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. *Science* 1991; 252: 1523.
21. Minami Y, Taniguchi T, IL-2 signalling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine by the components of the IL-2R. *Curr Op in Cell Biol* 1995; 7: 156-62.
22. Morice WG, Wiederrecht G, Brunn GJ, Siekierka JJ, Abraham RT, Rapamycin inhibition of the interleukin-2-dependent p33^{cdk2} and p34^{cdc2} kinase activation in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1993; 268: 22737-45.
23. Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Manukata H, Nakamura M, Sugamura K, Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 1992; 257: 379.
24. Taniguchi T, Minami Y, The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 1993; 73: 5-8.
25. Bazan JF, Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6934-8.
26. Giri JD, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilisation of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO* 1994; 13: 2822-30.
27. Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, Brennan J, Roessler E, Waldman TA. The interleukin (IL) 2 receptor β chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4940-4.
28. Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 1993; 262: 1880-3.
29. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993; 262: 1877-80.
30. Kawahara A, Minami Y, Taniguchi T. Evidence for a critical role for the cytoplasmic region of the interleukin 2 (IL-2) receptor γ chain in IL-2, IL-4, and IL-7 signalling. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5433-40.
31. Kondo M, Takeshita T, Higuchi M, Nakamura M, Sudo T, Nishikawa S, Sugamura K. Functional participation of the IL-2 receptor γ chain in IL-7 receptor complexes. *Science* 1994; 263: 1453-4.
32. Ohashi Y, Takeshita T, Nagata K, Mori S, Sugamura K. Differential expression of the IL-2 receptor subunits, p55 and p75 on various populations of primary peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1989; 143: 3548-55.

33. Robb RJ, Rusk CM, Yodoi J, Greene WC. Interleukin 2 binding molecule distinct from the Tac protein: analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Immunology* 1987; 84: 2002–6.
34. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T. Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs. *Science* 1989; 244:551–6.
35. Takeshita T, Ohtani K, Asao H, Kumaki S, Nakamura M, Sugamura K, An associated molecule, p64 with IL-2 receptor β chain: its possible involvement in the formation of the functional intermediate affinity IL-2 receptor complex. *J Immunol* 1992; 148: 2154–58.
36. Arima N, Kamio M, Okuma M, Ju G, Uchiyama T, The IL-2 receptor α -chain alters the binding of IL-2 to the β -chain. *J Immunol* 1991; 147: 3396–3401.
37. Syed R, Reid S, Li C, Cheetham J, Aoki K, Liu B, Zhan H, Osslund T, Chirino A, Zhang J, Finer-Moore J, Elliott S, et. al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 1998; 395: 511–16.
38. May M, Sankar G, Signal transduction through NF-kB. *Immunol Today* 1998; 19: 80–88.
39. Cacalano NA, et al, Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of JAK3: mapping of the JAK3-receptor interaction domain. *EMBOJ* 1999; 18(6): 1549-1958.
40. Lin JX, Leonard, WJ, The role of STAT5a and STAT5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000; 19 (21): 2566-2576.
41. Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(19):8705– 9.
42. Wen Z, Zhong Z, Darnell Jr JE. Maximal activation of transcription by STAT1 and STAT3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82(2):24150.
43. Beadling C, Guschin D, Witthuhn BA, Ziemiecki A, Ihle JN, Kerr IM, et al. Activation of JAK kinases and STAT proteins by interleukin-2 and interferon alpha, but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes. *EMBO J* 1994;13(23):5605– 15
44. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19(21):2474–2488.
45. Bromberg JF. STAT proteins and oncogenesis (review). *J Clin Invest* 2002; 109(9):1139–42.
46. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses (Mini review). *Cytokine Growth Factor Rev.* (2000) 11:199–207.
47. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 1999; 11:490–496.
48. Fu XY, Zhang JJ. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the cfos gene promoter. *Cell* 1993; 74(6):1135–45.
49. Quelle FW, Thierfelder W, Witthuhn BA, Tang B, Cohen S, Ihle JN. Phosphorylation and activation of the DNA binding activity of purified STAT1 by

- the Janus protein-tyrosine kinases and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1995; 270(35):20775- 20780.
50. Mingjian Shi, John C Cooper, and Chao-Lan Yu, A Constitutively Active Lck Kinase Promotes Cell Proliferation and Resistance to Apoptosis through Signal Transducer and Activator of Transcription 5b Activation, *Mol Cancer Res* 2006; 4(1):39–45).
 51. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A, STAT Proteins: From Normal Control of Cellular Events to Tumorigenesis. *J. Cell. Physiol* 2003; 197: 157–168
 52. Liu X, Robinson GW, Wagner K-U, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. STAT5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 1997; 11:179–186.
 53. Udy JB, Tower RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park S-K, Ram FA, Waxman DJ, Davey HW. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7239–7244.
 54. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. STAT5a and STAT5b proteins have essential and non essential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998; 93:841–850.
 55. Palacios H, Weiss A, Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004; 23: 7990–8000.
 56. Kono T, Minami Y, Taniguchi T, The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the β -chain. *Cell* 2002; 26: 256-260.
 57. Fischer S, Marie-Cardine A, p56lck a lymphocyte specific protein tyrosine kinase: activation, regulation and signal transduction. *Seminars in immunology* 1993; 5: 299-307.
 58. Sugamura K, Asao H, The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:179-205.
 59. Goldsmith MA, Lai SY, Xu W, Amaral MC, Kuczek ES, Parent LJ, Mills GB, Tarr KL, Longmore GD, Greene WC. Growth signal transduction by the human interleukin-2 receptor requires cytoplasmic tyrosines of the β chain and non-tyrosine residues of the γ c chain. *J Biol Chem* 1995; 270:21729–37.
 60. Gaffen SL, Lai SY, Ha M, Liu M, Hennighausen L, Greene WC, Goldsmith MA. Distinct tyrosine residues within the interleukin-2 receptor β chain drive signal transduction specificity, redundancy, and diversity. *J Biol Chem* 1996; 271:21381–90.
 61. Tsujino S, Miyazaki T, Kawahara A, Maeda M, Taniguchi T, Fujii H. Critical role of the membrane-proximal, proline-rich motif of the interleukin-2 receptor γ c chain in the Jak3-independent signal transduction. *Genes to Cells* 1999;4:363–73.
 62. Brockdorff J, Nielson M, Kaltoff K, Mustelin T, Ropke C, Svejaard A, Geisler C, Odum N. *lck* is involved in interleukin-2 induced proliferation but not cell survival in human T cells through a MAP kinase independent pathway. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:225–31.

63. WillowW 948×1014×8 (239072 bytes) Ribbon diagram of the SH2 domain from P56-Lck tyrosine kinase (PDB accession code 1lkk, chain A). Made with MOLMOL.
64. Kopetz S, Shah A, Gallick G, Src continues aging: current and future clinical directions. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24):7232-7236.
65. Summy J, Gallick G, Src family kinases in tumor progresión and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003; 22:337-358.