



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER FES-ZARAGOZA, UNAM.

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA 2
(IL-2) POR RT-PCR EN LINEAS CELULARES DE CÁNCER
CERVICO UTERINO EN DIFERENTES ESTADIOS.**

T E S I S

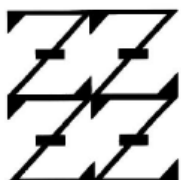
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

ANAYELI ROJAS LABRA

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2009

**U N A M
FES
ZARAGOZA**



**LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION**



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DETERMINACION DE LA EXPRESION DE INTERLEUCINA 2 (IL-2)
POR RT-PCR EN CÉLULAS DE CARCER CERVICO UTERINO EN
DIFERENTES ESTADIOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4 PB, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM". Dirigida por la Ma, en C. Rosalva Rangel Corona y asesorada por el Dr. Benny Weiss Steider.

Anayeli Rojas Labra

Este trabajo contó con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, convenios.
IN210306 e IN222108.

MÉXICO D.F. SEPTIEMBRE 2009

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A tí DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

Principalmente a mis Padres: Martha Labra Jaimes y Felipe Rojas Olvera , que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento y me han conducido por la vida con amor y paciencia, hoy me han forjado un anhelo, una ilusión y un deseo. No los defraudaré: los haré sentir orgullosos y verán que todos sus sacrificios y tragos amargos hoy son dulce miel. Son los que han velado por mi salud, mis estudios, educación, alimentación, etc., son a ellos a quien les debo todo. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor.

A Mis hermanas que son mis ojos y no puedo sino darles las Gracias por el tiempo, pero sobretodo por el inmenso amor que siento de su parte a: Coín, Liz, Cris, Felipe e Isma para que ninguno se sienta primero, todos los días le doy gracias a Dios por haberlas traído a mi vida. Gracias infinitas por siempre estar presentes. Gracias por ser mi apoyo, por estar conmigo apoyarme, los quiero mucho. Y a mis cuñados Yadira y Luis.

A mis sobrinos Elizabeth, Paulina, Cecilia, Cesar y Saúl, ya que todos son curiosos, juguetones, divertidos y los quiero mucho.

A mis amigos que me han acompañado, que han estado conmigo desde el inicio y a lo largo de la carrera: Lety, Ange, Jose, Areli, Ara, Giovis, Nalle, Rebe, Ivín Juan y con los cuales he contado desde que los conocí, por permitirme conocerlos y ser parte de su vida, aunque a veces es un poco difícil vernos pero no imposible verdad. Por ayudarme y estar conmigo a lo largo de la carrera, y aun después...

A Misael Aquino Bolaños, por su amistad incondicional, por brindarme todo su apoyo en las buenas y en las malas, por su comprensión, consejos, opinión y por todo el tiempo en que llevamos conociéndonos como amigos, te agradezco el compartir momentos agradables y el apoyarme en momentos difíciles y que ahora que somos novios sigámonos adelante y apoyándonos uno al otro y que ambos cumplamos nuestras metas.

A mis amigos del laboratorio: Arturo, Itzel, Evelín, Luz, Tania, Karla, Rebe, Cinthia, Marlen, Leo, etc., muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos difíciles, felices y tristes, gracias por ser mis amigos.

A el Dr. Adolfo Martínez Tovar por la paciencia, apoyo esa gran amistad que me brindó y me brinda, por escucharme y aconsejarme siempre, jefe del Laboratorio de Biología molecular, del Hospital General de México, en donde realice mi servicio social. Gracias a todo el equipo: al Dr. Jorge Zamora, Dr. Irma y a mi amiga Aline, por los consejos y amistad en donde no solo éramos un equipo de trabajo, sino también un equipo de amigos.

A Cointia Rojas jefa del Laboratorio de ISSEMYM Valle de Chalco donde realice prácticas profesionales y a los compañeros y amigos del laboratorio, Lety, Miriam, Sergio, Irma, Alejandra ... a todos gracias por su amistad y consejos.

Y no me puedo ir sin antes decírles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sírvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidare.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la M. en C. Rosalva Rangel Corona por su asesoramiento en el tema, los aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los miembros del Jurado de esta tesis: Dra. Lucila Álvarez Barrera, Bíol. Ana Laura Maldonado Tena, Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón y M. en C. Hugo López Muñoz por la lectura del manuscrito por su presencia y relevantes aportes, críticas, comentarios, sugerencias durante el desarrollo de esta investigación, que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

INDICE

1)	Lista de Figuras y Tablas.....	3
2)	Abreviaturas.....	5
3)	Resumen.....	6
4)	Introducción.....	7
5)	Marco Teórico	
	5.1. Diferenciación celular y cáncer.....	8
	5.2. Factores de riesgo.....	10
	5.3. Nomenclatura de la clasificación del CaCU.....	10
	5.4. Virus del papiloma humano	13
	5.5. Etiología.....	14
	5.6. Sistema inmunológico.....	16
	5.7. Citocinas.....	19
	5.8. Interleucina 2 (IL-2).....	20
	5.9. La IL-2 en la Inmunoterapia.....	22
6)	Planteamiento del Problema.....	25
7)	Justificación.....	26
8)	Hipótesis.....	27
9)	Objetivos	
	Objetivo General.....	28
	Objetivos particulares.....	28
10)	Material y método	
	10.1 Material biológico.....	29

11) Método Experimental	
11.1 Condiciones de cultivo de las líneas celulares de CaCU.....	31
11.2 Extracción de linfocitos de sangre periférica.....	32
11.3 Extracción de RNA.....	32
11.4 Electroforesis para la integridad del RNA.....	33
11.5 Obtención del cDNA a partir de RNA.....	34
11.6 Reacción en cadena de la Polímerasa (PCR).....	35
11.7 Electroforesis de los productos de la PCR.....	36
12) Resultados.....	37
13) Discusión de Resultados.....	48
14) Conclusiones.....	52
15) Perspectivas.....	53
16) Referencias.....	54
17) Apéndice 1 (Reactivos y soluciones).....	60
18) Apéndice 2 (preparación de reactivos y soluciones).....	64

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS	Pg
Figura 1. Interleucina 2 (IL-2)	21
Figura 2. Efectos biológicos de Interleucina 2	22
Figura 3. Receptor para Interleucina 2(RIL-2)	23
Figura 4. RNA mensajero extraído de las líneas de CaCU.	37
Figura 5. Producto de amplificación de DNA de linfocitos de sangre periférica, usando los primers para IL-2.	38
Figura 6. Productos de amplificación para β -actina de los cDNA de las líneas células de CaCU.	39
Figura 7. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II cultivadas a 15 minutos.	40
Figura 8. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II cultivadas a 2 horas.	41
Figura 9. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II cultivadas a 15 minutos y 2 horas.	42
Figura 10. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio IV cultivadas a 15 minutos.	43
Figura 11. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio IV cultivadas a 2 horas.	44

Figura 12. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio IV cultivadas a 15 minutos y 2 horas.	45
Figura 13. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio II y IV cultivadas a 15 minutos.	46
Figura 14. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio II y IV cultivadas a 2 horas.	47

TABLAS

Tabla 1. Correlación de las nomenclaturas en la citología cervical para las lesiones premalignas y cáncer <i>in situ</i> del cérvix.	11
Tabla 2. Descripción de las características de los estadios del Cáncer Cérvico Uterino.	12
Tabla 3. Incidencia por estadio, donde prevalece el estadio IV.	13
Tabla 4. Características de las líneas celulares de CaCU empleadas.	30
Tabla 5. Condiciones para RT.	34
Tabla 6. Condiciones para PCR.	35
Tabla 7. Programa del termociclador para PCR.	36

ABREVIATURAS

CaCU	Cáncer Cérvico Uterino.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
cDNA	DNA complementario.
DNTP'S	Desoxirribonucleótidos de trifosfato.
dTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético.
IL-2	Interleucina 2.
MMLV-RT	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
NK	Células asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>).
Pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNA_m	RNA mensajero.
RPMI-1640	Medium was developed at Roswell Park Memorial Institute.
RT	Retrotranscripción.
Rx	Reacción.
SFB	Suero Fetal Bovino.
TBE	Amortiguador Tris ácido Borico-EDTA.
UIDCC	Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer.
VPH	Virus del papiloma humano.

RESUMEN

En México el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), es el segundo cáncer más frecuente entre los tumores malignos en la población femenina. Actualmente grupos de investigación trabajan con interleucinas (ILs); ya que juegan un papel muy importante en la respuesta inmunológica, recientemente se ha descrito su papel en la regulación de células no hematopoyéticas tanto normales como tumorales, controlando positiva o negativamente su proliferación. Asimismo, existen datos de que estas ILs también pueden ser secretadas por células tumorales, participando en un sistema autócrino de proliferación. Para su detección se pueden emplear técnicas de biología molecular como el RT-PCR.

Por otro lado, se sabe que interleucina 2 (IL-2) se ha utilizado como alternativa terapéutica en algunos tipos de cáncer, sin embargo, se debe tener cuidado en la dosis a emplear, ya que nuestro equipo de trabajo ha demostrado que a bajas dosis, la IL-2 puede inducir la proliferación de células de CaCU, lo cual nos lleva a pensar que las células de este tipo de cáncer pueden producir IL-2 para sustentar su proliferación, tal como sucede con células de leucemias y linfomas que producen IL-2. Sin embargo, se desconoce si las células de CaCU la expresan y si esta expresión depende de factores como el tiempo de cultivo y el estadio del tumor. Por esta razón, en el presente trabajo se determina la expresión del mensajero de IL-2 en diferentes líneas celulares de CaCU cultivadas a diferentes tiempos.

Nuestros resultados, indican que las líneas celulares de CaCU INBL, HELA, CASKI, estadio IVB; y las líneas VIPA, ROVA, SIHA y CALO estadio IIB, todas infectadas por virus del papiloma humano (VPH), cultivadas a 15 minutos y 2 horas expresan el mensajero para IL-2, mientras que las líneas celulares C33A y VIBO estadio IIA y IIB negativas a VPH, no lo expresan, estos datos nos hacen sugerir que la expresión de IL-2 podría ser una consecuencia de la inserción del DNA viral y que esta expresión depende proporcionalmente del tiempo de cultivo.

Este trabajo proporciona información acerca de la biología del CaCU y propone un mecanismo autócrino de la proliferación para este tipo de cáncer, en donde las células tumorales serían más eficientes para utilizar las citocinas secretadas por ellas mismas u otras células del organismo como los linfocitos T. De esta manera, la expresión de IL-2 puede ser postulada como un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica para CaCU.

INTRODUCCION

El Cáncer Cérvico uterino (CaCU), representa aproximadamente un 30 % de todos los padecimientos y muertes por cáncer en las mujeres mexicanas. (Cáceres 2001). La investigación desarrollada en diferentes áreas del conocimiento, como la biología molecular, han permitido la caracterización de numerosas proteínas que participan en la proliferación y diferenciación celular. Estas proteínas forman parte de una clase de mediadores intercelulares conocidos como interleucinas (ILs) o citocinas, que son secretadas en respuesta a estímulos específicos y actúan a través de receptores de membrana modulando el metabolismo celular. Algunas citocinas presentan características antimicrobiales, antivirales o antitumorales, sugiriendo un papel protector en la defensa del organismo contra patógenos infecciosos y enfermedades invasivas.

Debido, a su gran importancia biológica, algunas de estas citocinas han sido incluidas en protocolos de investigación básica y clínica, para evaluar su eficiencia en el tratamiento de algunos padecimientos como el cáncer, con el propósito de ofrecer nuevas alternativas terapéuticas a los pacientes que lo sufren. Las citocinas actúan como hormonas ya que pueden tener un efecto pleiotrópico sobre diversos tipos celulares en diferentes etapas del desarrollo, pero también tiene efecto autócrino, es decir son producidas y utilizadas por la misma célula, características que son de gran utilidad en la investigación (Kaplan 1996).

Al respecto en el laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) FES-Zaragoza, UNAM, en un trabajo previo se demostró que las líneas CaCU CALO e INBL sintetizan citocinas como IL-3 e IL-6 (Torres 2000), lo cual nos lleva a pensar que las células de este tipo de cáncer pueden producir IL-2 para sustentar su proliferación. En estudios realizados en células de leucemias y linfomas se ha demostrado que producen IL-2, pero se desconoce si sucede lo mismo en células de CaCU. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la expresión de IL-2 en líneas celulares de CaCU y determinar si esta síntesis depende del estadio del tumor o de el tiempo de cultivo, para ello se utilizó la técnica de Retrotranscripción-Reacción en Cadena de la Polímerasa (RT-PCR) en la cual se realizó la extracción del RNAm de líneas celulares de CaCU en diferentes estadios, usando la enzima transcriptasa reversa obteniendo como productos el DNA complementario (cDNA) que se utilizó para llevar a cabo la amplificación por la técnica PCR, los productos obtenidos fueron sometidas a electroforesis de agarosa para visualizar y llevar a acabo su análisis.

MARCO TEORICO

Diferenciación celular y cáncer

La diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula primitiva se convierte en una célula con características fisiológicas y metabólicas específicas. El proceso por el cual una célula especializada pierde sus características fisiológicas y metabólicas se le conoce como desdiferenciación. Como consecuencia de este proceso se genera una reorientación de los patrones metabólicos, originando una síntesis continua de ácidos nucleicos, proteínas mitogénicas, enzimas y otras citocinas relacionadas con la proliferación celular, que conduce al desarrollo de crecimientos tumorales que se establecen a expensas de un grupo celular localizado en una área determinada de tejido, con un aumento en el número celular y con una multiplicación progresiva y aparentemente autónoma del control celular (Wyke 1986, De Vita, et al., 1989).

Cáncer es el término común para designar a todos los tumores malignos, y se refiere al crecimiento descontrolado de una masa de tejido, en donde las células normales se transforman en células malignas por la adquisición de mutaciones, las cuales acarrearán como consecuencia el daño del genoma. Este daño puede ser el resultado de un proceso endógeno ó por ataques exógenos. El crecimiento excesivo y sin coordinación de los tejidos normales del cuerpo persiste una vez que ha cesado el estímulo que le dio origen. El tejido canceroso crece sin propósito, deteriora al huésped y es virtualmente autónomo, aunque depende del huésped para su nutrición y aporte vascular (Martínez 2004, Weiss, et al., 2003).

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en el tejido corporal, no es una enfermedad única si no un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de forma distintas, siendo tres los principales subtipos: los sarcomas los cuales proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los carcinomas proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres mas

frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. Estos factores ayudan a su clasificación (Rojas 2001).

Casi todos los cánceres forman tumores, pero no todos los tumores son malignos; la mayor parte son benignos (no ponen en peligro la salud, no son cancerosos). Un tumor benigno está compuesto por células que no responden adecuadamente a los controles normales del crecimiento, pero incapaces de invadir tejidos adyacentes y de metastatizar. Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una cápsula. Los tumores benignos tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden (Rojas 2001).

En ocasiones pueden producir alteraciones por obstrucción, compresión o desplazamiento de las estructuras vecinas, como sucede a veces en el cerebro. Aunque los tumores benignos no son una amenaza para la vida, es importante que las células de éstos no se diseminen a otras partes del cuerpo. Los pólipos, quistes y verrugas genitales son tipos de tumores benignos del cuello uterino, también denominado cérvix. Estos se convierten en un grave problema médico si interfieren con las funciones normales del organismo o si secretan sustancias biológicamente activas como hormonas (Rojas 2001).

Los tumores malignos se generan por que además de proliferar, se diseminan e invaden tejidos adyacentes por todo el organismo a través del sistema linfático o vascular. Las células cancerosas pueden invadir y dañar tejidos y órganos localizados cerca del tumor; también pueden desprenderse de un tumor maligno y entrar en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático, de esa manera, los carcinomas como el CaCU puede diseminarse a otras partes del cuerpo como los pulmones, ganglios linfáticos, recto, vejiga o los huesos de la columna vertebral. Al proceso mediante el cual el cáncer se disemina, se le llama metástasis, esta capacidad del tumor es el principal problema para su erradicación además de que actualmente se asocia al 90% de las muertes por cáncer, como el CaCU que es un grave problema de salud en los países en vías de desarrollo (Frías, et al., 2005).

Factores de riesgo

Se estima que un 75% de los tumores malignos del ser humano se generan por factores ambientales; incluyen agentes químicos (como los inhalados durante el consumo de tabaco), físicos (como las radiaciones ultravioleta) y biológicos (representados por el virus) resulta interesante la propuesta de que algunos de ellos principalmente los agentes químicos y físicos, junto con el envejecimiento y procesos inflamatorios, ocasionen daño al material genético a través de la generación de radicales libres oxidantes (Panduro, et al., 2000).

En la actualidad se han incrementado los avances en las investigaciones en el campo epidemiológico del CaCU, lo cual ha llevado a la aparición de nuevas hipótesis acerca de su etiología. El CaCU tiene un origen multifactorial y los virus del papiloma no son suficientes en sí mismos para la inducción del tumor, siendo necesarios otros factores y cofactores; antecedentes ginecoobstétricos y aspectos socioculturales: los más importantes factores de riesgo establecidos, indican que está asociado con la baja escolaridad, nivel socioeconómico bajo, inicio de relaciones sexuales a temprana edad, elevado número de parejas (participación del hombre como vector, el cual se incrementa en relación con el mantenimiento de contactos sexuales frecuentes con prostitutas), alta paridad (cinco o más partos), primer parto a temprana edad, pobre higiene genital, inflamación cérvico vaginal persistente, infecciones sexuales intercurrentes, el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo, dieta deficiente en frutas y verduras, bajo consumo de vitamina C, B-carotenos y folatos, deficiencias nutritivas, antioxidantes, retinoides, algunos de estos al actuar sinérgicamente podrían en un tiempo de alrededor de 25 años, evolucionar hasta la enfermedad maligna pasando por las lesiones intraepiteliales (Nápoles, et al., 2008, Chávez, et al., 2007, Chang, et al., 2006, Tirado, et al., 2005, Valdespino, et al., 2004).

Nomenclatura de la clasificación

La primera nomenclatura descrita en la historia de la Ginecología fue la propuesta por Papanicolaou en 1928, después en 1967 Richart y otros describieron la clasificación que se conoce como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). En diciembre de 1988, se reunieron diferentes sociedades de patólogos-ginecólogos y acordaron una nueva nomenclatura conocida como Bethesda. (Tabla 1) Correlación de las nomenclaturas en la citología cervical para las lesiones

pre malignas y cáncer *in situ* del cérvix (Nápoles, et al., 2008, Murillo 2001, Cruz 1998).

Nomenclatura del Cáncer Cérvico Uterino			
Descripción	NIC (Richart)	Bethesda	Papanicolaou
Normal	Atipia	Normal	Clase I
Negativo con datos inflamación	Atipia	ASI	Clase II
Displasia leve	NIC 1	LIBG	Clase III
Displasia moderada	NIC 2	LIAG	Clase III
Displasia severa	NIC3	LIAG	Clase III
Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	LIAG	Clase IV
Cáncer microinvasor e invasor	Cáncer microinvasor e invasor	Cáncer microinvasor e invasor	Clase V

Modificado del Manual de procedimientos para la vigilancia, prevención, diagnóstico, tratamiento y control del cáncer cérvico uterino. IMSS 1998.

Tabla 1. Correlación de las nomenclaturas en la citología cervical para las lesiones premalignas y cáncer *in situ* del cérvix (Murillo 2001).

El CaCU es una enfermedad progresiva dividida en estadios cero (0) y de I a IV (Tabla 2), donde se observa la descripción y características de los estadios del CaCU (Ponten, et al., 1995)

Estadio	Características	Subetapas
Estadio 0	Es un Cáncer muy temprano, las células anormales solo se encuentran en la primera capa de células que recubre el cuello uterino.	
Estadio I	Se encuentra en el cuello uterino	IA: Se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer, no teniendo más de 5mm de profundidad y 7mm de ancho. IB: El cáncer se encuentra dentro del cuello uterino aproximadamente más de 4 cm.
Estadio II	El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino sin alcanzar la pared pélvica.	IIA: Cáncer se ha diseminado a dos tercios superiores de la vagina. IIB: El cáncer se ha diseminado ha dos tercios superiores de la vagina a los tejidos en torno al útero.
Estadio III	Cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina y talvez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes.	IIIA: Se ha diseminado al tercio inferior de la vagina. IIIB: se ha diseminado a la pared pélvica y es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres. Y puede haber alcanzado a los ganglios linfáticos.
Estadio IV	El cáncer se ha diseminado a la vejiga, recto y otras partes del cuerpo.	IVA: Cáncer diseminado en la vejiga o a la pared del recto y puede que también en los ganglios linfáticos en la pelvis. IVB: El cáncer se ha diseminado más allá de la pelvis y ganglios linfáticos y otros lugares en el cuerpo como abdomen, hígado, tubo intestinal o pulmones.

Tabal 2. Descripción de las características de los estadios del Cáncer Cérvico Uterino (Alonso, et al., 2000).

Desafortunadamente, el 70% de los casos de CaCU se identifica en etapas avanzadas IB a IVA y en más del 90% corresponden al tipo epidermoide. Los datos estadísticos obtenidos en el Instituto Nacional de Cancerología (Tabla 3), Muestra la incidencia por estadio, donde prevalece la del estadio IV y se analiza que 1244 casos de CaCU, únicamente 134 eran estadio I y con un mayor número de casos se encuentra el estadio IV (con 254 casos) (García, et al., 2008).

Incidencia por estadios		
Estadio	Núm.	%
0	9	0.072
I	134	10.7
II	217	17.4
III	630	50.6
IV	254	20.0
Total	1,244	100

Instituto Nacional de Cancerología

Tabla 3. Incidencia por estadio, donde prevalece el estadio IV (García et al, 2008).

Virus del Papiloma Humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH), es un virus DNA de 55 nanómetros de diámetro sin envoltura y con una estructura icosaédrica constituida por 72 capsómeros. En su interior se encuentra el genoma viral compuesto por una doble cadena circular de DNA de alrededor de 7900 pares de bases nucleotídicas (Spinelli, et al., 2003).

A pesar de la gran diversidad de los HPV, su organización genómica es muy conservada. Todos presentan seis genes de expresión temprana (E) y dos de expresión tardía (L), así como una región reguladora no codificadora. Los genes E codifican para proteínas encargadas de la replicación viral, la transformación de la célula infectada y del desmantelamiento de la red de citoqueratina de la célula huésped. Los genes L se encargan de codificar para las proteínas estructurales del virus (Spinelli, et al., 2003, Consuegra, et al., 2004).

En 1976, Zur Hausen planteó su hipótesis en la cual propone VPH, como el agente sexualmente transmitido responsable de la transformación neoplásica en el cuello

uterino. Posteriormente esta hipótesis ha sido validada, tanto por estudios epidemiológicos como por la evidencia molecular de que el ADN del VPH está integrado en más del 90% de los carcinomas cervicales, con lo que se puede asegurar, sin lugar a dudas, el papel causal que el VPH tiene en el desarrollo del cáncer (Alonso, et al., 2000), más frecuente a nivel mundial, existen estimaciones que la ubican hasta en el 80% de las mujeres asintomáticas con vida sexualmente activa. Dicha infección es considerada, dentro de la etiología multifactorial y según la historia natural de la ontogénesis de cuello uterino, se considera como el principal factor etiológico de este tipo de cáncer (Rocha, et al., 2004, Bañuelos, et al., 2003, Monroy, et al., 2002).

Etiología

Su etiología es diversa, pero se acepta que el VPH es el agente causal en la mayoría de los casos de CaCU. En años recientes se ha notificado la existencia de más de 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo (AR), por encontrarse asociadas al CaCU en más de 95% de los casos. Por otra parte, se informa que otros tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación con CaCU denominándose, por tanto, tipos de bajo riesgo (BR) (Tovar, et al., 2008, Rocha, et al., 2007, Amezcua, et al., 2006, Tirado, et al., 2005, Castellanos 2004, Bañuelos, et al., 2003, Monroy, et al., 2002, Montoya, et al., 2001).

Los primeros tipos de VPH aislados directamente de biopsias de CaCU fueron los tipos 16 y 18, en los años 1983 y 1984. Pocos años después se demostró el papel de los VPHs, en la causa del CaCU relacionada con la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Entre los años 1992 y 1995 se reportaron los resultados de diferentes estudios epidemiológicos de casos y controles cuyos resultados indicaron que las infecciones persistentes por VPH oncogénicos son el factor de riesgo más significativo o necesario, pero no suficiente (se requieren diferentes factores en el huésped que influyen el riesgo de progresión) para desarrollar CaCU (Valdespino, et al., 2004).

La zona de transformación cervical es un anillo de tejido con alta susceptibilidad para la carcinogénesis por VPH. Los VPH penetran a la mucosa cervical a través de

microlesiones del epitelio y se introducen en las células basales. Los tres genes virales E5, E6, y E7 se colocan inicialmente de manera episomales (extracromosómicos) y luego se integran al ADN del queratinocito E6 y E7, que tienen el papel más importante en la transformación maligna, sus proteínas se expresan constitutivamente en lesiones premalignas y en el tejido maligno; la inhibición de su expresión bloquea el fenotipo tumoral (Valdespino, et al., 2004).

VPH 16 y 18

Los agentes virales que con mayor frecuencia se han relacionado con el desarrollo de cáncer corresponden al virus de DNA, como los VPH tipos 16 y 18, y que participan en forma directa en el CaCU (Panduro 2000), siendo estos dos los más frecuentes y considerados como factores de alto riesgo para el desarrollo de CaCU, ya que entre 95 y 99% de estos casos se encuentra asociado con el VPH (Tovar, et al., 2008, Rocha, et al., 2007, Amezcua, et al., 2006, Castellanos 2004, Rocha, et al., 2004, Dell Ghislaine, et al., 2003, Bañuelos, et al., 2003, Montoya 2001).

Cuando la infección es por los subtipos 16 y 18 no hay expresión morfológica viral, ya que partes del genoma viral (E6 y E7), se integran al DNA del huésped y tienen propiedades transformadoras. Se ha evidenciado que las células que contienen secuencias del genotipo 16 y 18 presentan alteraciones en el número y características de los cromosomas, como aneuploidia y marcadas atipias nucleares, que es característico de lesiones de tipo displasia intensa y carcinoma *in situ* (Alonso 2000).

El VPH-16 es el tipo que aparece, fundamentalmente en los tumores invasivos, se asocian a lesiones escamosas que pueden terminar en un cáncer epidermoide y en los de alto grado de malignidad; el VPH-18 se asocia al adenocarcinoma y carcinoma epidermoide también, se relaciona con el carcinoma pobremente diferenciado y con un mayor compromiso de los ganglios linfáticos. Tanto el genoma del VPH-18 como el del VPH-16 pueden encontrarse como viriones, integrados en el ADN celular o de forma episomal (Rocha, et al., 2007, Rocha, et al., 2004).

Sistema inmunológico

Históricamente. Inmunidad significa protección contra la enfermedad y de forma más específica, frente a una enfermedad infecciosa. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad forman el sistema inmunológico y la respuesta colectiva y coordinación frente a sustancias extrañas se denomina respuesta inmunitaria (Abbas 2004).

El sistema inmunológico, es el que se encarga de la vigilancia y protección del organismo; surgió durante la evolución para combatir las infecciones causadas por virus, bacterias, hongos, etc. Estos patógenos pueden ser responsables de infecciones intracelulares ó extracelulares, para los cuales la respuesta inmunológica debe ser diferente. De hecho, el sistema inmunológico ha desarrollado una variedad de respuestas apropiadas para combatir cada tipo de patógeno, al mismo tiempo que mantiene la tolerancia a los componentes del propio organismo. Para lograr la eliminación de cualquier patógeno que haya establecido una infección, lo primero que debe hacer el sistema inmunológico es reconocerlo como agente extraño y así desarrollar una respuesta adecuada para eliminarlo. Dicho sistema actúa mediante dos tipos de mecanismos que se diferencian en las estructuras de reconocimiento de los patógenos, pues la fase efectora que produce su destrucción es esencialmente similar (Regueiro, et al., 2002).

La función fisiológica del sistema inmunológico es la defensa contra microorganismos infecciosos. La inmunidad es una reacción frente a sustancias extrañas, incluidos los microorganismos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos (Abbas 2004).

Existen dos mecanismos dependientes uno de otro a través de los cuales el Sistema Inmunológico genera una respuesta para defender al organismo: uno es la inmunidad innata y el otro es la inmunidad adaptativa. La afinidad de ambos mecanismos es la eliminación de antígenos, cada uno de estos mecanismos difieren en la manera específica para reconocer antígenos (Regueiro, et al., 1996).

El primero es conocido como inmunidad innata (también denominada inmunidad natural o naive) que constituye la primera línea de defensa del organismo, comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta. Estos mecanismos reaccionan sólo frente a microorganismos y

no a sustancias no infecciosas y responden esencialmente de la misma manera ante infecciones repetidas. Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en

- 1) Barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y linfocitos, células NK; estos tipos celulares destruyen antígenos y células tumorales mediante la lisis (citólisis) o inhibición del crecimiento (citotaxis). 3) proteínas de la sangre que incluyen componentes del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación y 4) proteínas que reciben el nombre de citocinas, que regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados y pueden ser incapaces de distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas. la inmunidad innata proporciona las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos (Abbas 2004).

Inmunidad adaptativa

Esta forma de inmunidad se denomina inmunidad adaptativa, porque se produce como una respuesta a la infección y se adapta a ésta (Abbas 2004).

Las características que definen la inmunidad adaptativa son una especificidad precisa por distintas moléculas y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo microorganismo. El sistema es capaz de reconocer y reaccionar frente a un gran número de sustancias microbianas y no microbianas. Además, tiene una extraordinaria capacidad para distinguir entre moléculas y microorganismos diferentes, incluso muy relacionados y por esta razón, también se denomina inmunidad específica. Algunas veces, también, recibe el nombre de inmunidad adquirida, para resaltar que estas potentes respuestas protectoras se “adquieren” por experiencia (Abbas 2004).

Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos, las sustancias extrañas que desencadenan respuestas inmunitarias específicas, o que son las dianas de dichas respuestas, reciben el nombre de antígenos (Abbas 2004).

Tipos de respuestas inmunitarias adaptativa

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular, que están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunológico y cuya función es eliminar distintos tipos de microorganismos (Abbas 2004).

Inmunidad humoral

Esta inmunidad es mediada por linfocitos B, que defienden al organismo de patógenos extracelulares como infecciones bacteriales y actúan por medio de proteínas secretadas por células B diferenciadas a células plasmáticas, conocidas como anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), las cuales se encuentran en el plasma sanguíneo y son capaces de reconocer los antígenos microbianos, neutralizan la capacidad infecciosa de los microorganismos y los eliminan mediante diversos mecanismos e identifican y se unen a marcadores específicos de las células blanco para que sean reconocidas y eliminadas (Abbas 2004).

La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, ya que los anticuerpos sintetizados se unen a los microorganismos y sus toxinas ayudan a eliminarlos (Abbas 2004).

Inmunidad celular

El segundo tipo de respuesta inmune específica, defiende al organismo del ataque de hongos, parásitos, infecciones virales y células transformadas. En esta fase los linfocitos T, son los encargados de llevar a cabo el reconocimiento y eliminación de las células blanco, mediante la secreción de citocinas (Abbas 2004).

La inmunidad celular ésta mediada por los linfocitos T y sus productos como, las citocinas y resulta esencial para la defensa contra los microorganismos intracelulares (Abbas 2004).

Citocinas

Fue el Dr. S. Cohen en 1974, quien usó la palabra “citocina” para describir cualquier sustancia soluble producida por células, que ejercen efectos específicos en sus células blanco (Meager et al, 1991). Las citocinas son secreciones de diversos tipos celulares pero principalmente las producen los linfocitos T y macrófagos ya que actúan como los principales reguladores de la respuesta inmune innata y específica. Dentro del grupo de las citocinas se agrupan las proteínas llamadas linfocinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias (Regueiro, et al., 2002).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, 15–30 KDa, constituídas por 120–180 aminoácidos, que pueden secretarse ó permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de nanogramos a picogramos. Algunas citocinas funcionan como hormonas del sistema inmunológico local o sistémico a muy bajas concentraciones sobre receptores específicos y son consideradas sustancias pleiotrópicas, es decir; que actúan sobre varias células en las que inducen múltiples efectos contradictorios. Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular (cuando la propia célula productora es a la vez diana), ó de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares (cuando la célula productora y la célula diana son distintas). Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune. Dentro de las propiedades generales de las citocinas se encuentra la regulación de la división celular, el control del crecimiento y la diferenciación de linfocitos estimulados, la modulación de la inmunidad natural; participación en respuestas inflamatorias no específicas además de la estimulación del crecimiento y la diferenciación de células inmaduras (Regueiro, et al., 2002, Margani 1996).

Las funciones de las citocinas son diversas, pero las principales son: generar señalizaciones autócrinas, parácrinas y endócrinas en diferentes células, inducir la proliferación, diferenciación y activación de distintas poblaciones celulares, aumentar la citotoxicidad de las células tales como: las polimorfonucleares, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y regular la respuesta inmunológica. Históricamente, las citocinas han sido usadas en cuatro áreas de investigación principalmente: Virología, con el uso de interferones, Inmunología, con el uso de interleucinas, Hematología, usando factores estimuladores de colonias y Biología Celular, usando factores polipeptídicos de crecimiento (Meager 1991).

Interleucina 2 (IL-2)

Las citocinas median la proliferación y diferenciación de los linfocitos después del reconocimiento del antígeno en la fase de la activación y de las células efectoras especializadas en la respuesta inmunitaria adaptativa. Una de las respuestas más importantes de los linfocitos T al reconocimiento del antígeno, es la producción de citocinas entre las que se encuentra la interleucina 2 (IL-2), que es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por el antígeno y es responsable de la expansión clonal de las células T, tras el reconocimiento del antígeno. Por este motivo, la IL-2 se denominó inicialmente factor de crecimiento de las células T (Maczy, et al., 2007, Kendall, et al., 2002).

La IL-2, es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute. Fue originalmente descrita como un "Factor de crecimiento de células T (TCGF), mitogénico de timocitos (TMF), factor auxiliador de células asesinas o factor coestimulador (KHF), y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en Suiza 1979 se le renombra como IL-2. Su gen fue clonado en 1984 lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se ha desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 y en la actualidad se le conoce como IL-2 (Kendall, et al., 2002, Aggarwal, et al., 1992, Morgan, et al., 1976).

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa, con 133 aa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2. Es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo; compuesta principalmente por una unión de cuatro hélices alfa. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28, contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125, dos de los cuales (58 y 105) forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula (Figura 1) (Kendall, et al., 2002, Aggarwal, et al., 1992).

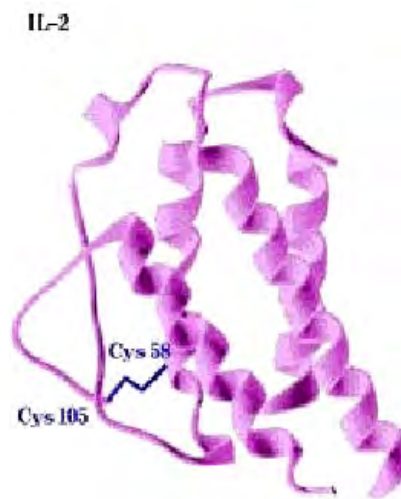


Figura 1. Interleucina 2 (IL-2)

Es producida por células T CD4+ y en menor cantidad por células T CD8+ en humanos. La IL-2 es un poderoso factor de crecimiento para una variedad de células y juega un papel clave en la diferenciación y desarrollo de linfocitos T y la activación de células NK, además de ser un potente inmunomodulador. La IL-2 estimula a células que pueden secretar otras citocinas y sustancias con actividad biológica que pueden medir efectos secundarios, también estimula la proliferación de todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G1 del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número celular; asimismo, estimula la actividad citolítica de subtipos de linfocitos T, aumenta su motilidad e induce la secreción de citocinas como: IFN- γ IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, TNF- α y TNF- β . (Figura 2) (Kendall, et al., 2002, Hassuneh, et al., 1997, Anderson, et al., 1994).

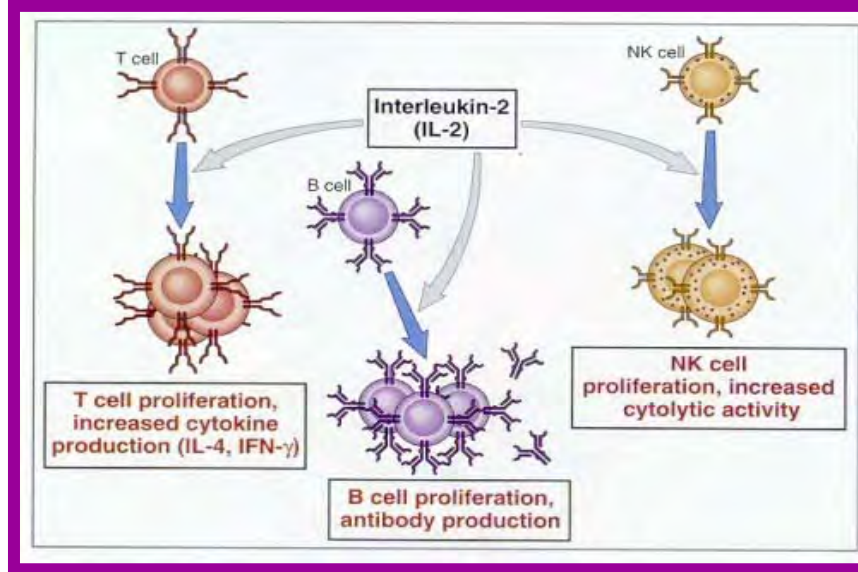


Figura 2. Efectos biológicos de la Interleucina 2

La IL-2 promueve la secreción de inmunoglobulinas y genera un aumento en los efectos inmunológicos mediados por linfocitos B, cambia la proliferación de linfocitos granulares y también facilita la destrucción de tumores por activación de macrófagos, NK y activadas por linfocinas e incrementa la producción de anticuerpos de las células B (Vella, et al., 1998, Boni, et al., 2001)

La IL-2 en la inmunoterapia

Durante las últimas décadas se han administrado productos naturales y sintéticos con el fin de aumentar la respuesta inmunológica normal del organismo. Varios grupos de trabajo han estudiado el efecto de las citocinas en el desarrollo de la inmunidad antitumoral para detectar el potencial terapéutico de estas moléculas.

La IL-2 es una proteína muy importante en la respuesta inmunológica mediada por células al promover la activación y proliferación de los Linfocitos T. Su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que este receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón y en células de carcinomas humanos. En el Laboratorio de Oncología Celular se demostró la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma de IL-2R en las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL. Además hemos reportado que el IL-2R es activado por la IL-2 exógena. También, contamos con datos que indican que el receptor tiene expresión diferencial en tumores de carcinoma de cérvix de acuerdo al estadio (Figura 3) (Rangel, et al., 1998).

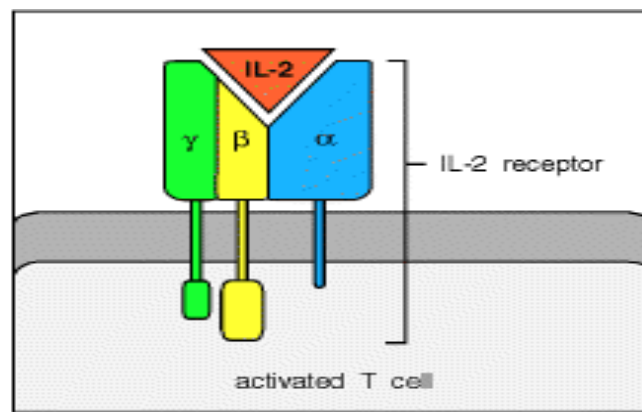


Figura 3. Receptor para Interleucina (RIL-2)

En varios modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión del tumor, al activar la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas IL-2, IL-12, IL-18, IFN γ y el factor estimulador de colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF) recombinantes se han utilizado referentemente como inmunoterapia contra el cáncer. Particularmente, el efecto adyuvante de la IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al VPH. Se ha demostrado que el tratamiento con la proteína recombinante y con el gen de IL-2, administrados por vía intratumoral, reduce significativamente el avance de los tumores asociados al VPH e inhibe la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía (Bermúdez, et al., 2005).

También, se ha confirmado que líneas celulares obtenidas de tumores producen citocinas que les permite tener un crecimiento autócrino, como es el caso de la línea M14 de melanoma que produce IL-2. Esto nos hace pensar que las células tumorales serían mas eficientes en utilizar la citocina, por que requieren de una concentración diez veces menor que los linfocitos para proliferar (Torres 2000).

Desafortunadamente, se sabe que la IL-2 administrada *in vivo* vía sistémica es sumamente tóxica. Ya que puede provocar serios efectos secundarios como son: síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, edema e hipotensión, entre otros. Ante esta situación se ha buscado una alternativa para la administración de altas concentraciones de IL-2 y ofrecerla como una alternativa terapéutica a las pacientes con carcinoma de cérvix (Hernández, et al., 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), ocupa el segundo lugar dentro de las neoplasias malignas en la mujer (Marie, et al., 2009) y continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. Su incidencia es mayor en los grupos con capacidades económicamente reducidas y de áreas suburbanas.

El CaCU, es el tipo de cáncer más común en la población femenina y en México es una de las principales causas de muerte por cáncer. En el 2002 la agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC), registró 12, 516 nuevos casos y 5,777 muertes por este padecimiento en nuestro país, es decir 12 mujeres mueren diariamente por CaCU, a pesar de los programas de detección oportuna, el diagnóstico se establece con alta frecuencia en estadios avanzados, por lo cual constituye un problema de salud pública, su frecuencia ascendente revela la necesidad de ampliar la cobertura de los programas nacionales de prevención y detección oportuna. La edad de los pacientes con esta neoplasia aparentemente se encuentra en descenso ya que se diagnostica CaCU, en mujeres cada vez más jóvenes aumentando su mortalidad en este grupo. El CaCU es una enfermedad progresiva que se inicia con lesiones denominadas displasias, que responden al tratamiento médico de primer nivel de atención en un 85% de los casos, una vez que el cáncer inicia (cáncer *in situ*) le toma de 10 a 20 años para convertirse en cáncer invasor, sin embargo, la incidencia de nuevos casos es muy alta debido principalmente a que las mujeres acuden tardíamente al médico (Lazcano 1996).

Por lo tanto, actualmente se buscan nuevas técnicas para conocer más a cerca de sus procesos de transformación neoplásica, asimismo, se pretende utilizar esta información para regular el crecimiento tumoral o establecer alternativas terapéuticas para este tipo de cáncer. Sabemos, que durante el proceso de transformación maligna las células tumorales se desdiferencian y sufren alteraciones en sus procesos metabólicos, entre los que se encuentran la síntesis de ciertas proteínas que normalmente no producen. Al respecto en el Laboratorio de Oncología Celular trabajamos en el esclarecimiento del papel que juegan las citocinas en la progresión tumoral. Por esta razón, el presente trabajo de investigación se desarrollo con el propósito de analizar la expresión del gene para IL-2 en células de CaCU en diferentes estadios. Los datos obtenidos nos servirán para proponer, la detección, por RT-PCR de IL-2 en biopsias de este tumor, como una técnica diagnóstica para CaCU.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la IL-2 se está utilizando como alternativa terapéutica, pero se tiene que tener cuidado sobre la dosis a emplear, ya que en el Laboratorio de oncología Celular de la UIDCC se ha demostrado que bajas dosis de IL-2 (10 UI/ml) induce la proliferación de células de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) (Alvarado 1997), por otro lado, un trabajo previo demuestra que las líneas CALO e INBL sintetizan otras citocinas como IL-3 e IL-6, (Torres 2000) lo cual nos lleva a pensar que las células de este tipo de cáncer pueden producir IL-2 para sustentar su proliferación. En estudios realizados en células leucémicas y linfomas se ha determinado que estas producen IL-2, pero se desconoce si sucede lo mismo en células de CaCU. Por esta razón es importante determinar la presencia de esta citocina por medio de una técnica sensible; como la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) que es una técnica de biología molecular mediante la cual a partir de un pequeño fragmento de ADN y su duplicación se obtienen productos visibles para su análisis.

Por lo antes expuesto, en este trabajo utilizamos la técnica de RT-PCR para determinar si las células de las líneas de CaCU en diferentes estadios sintetizan IL-2 y si dicha síntesis está relacionada con el estadio del tumor.

HIPOTESIS

Se ha demostrado que la interleucina 2 (IL-2) es una citocina que participa en la activación diferenciación y proliferación de linfocitos T, B, células NK, monocitos y granulocitos. Asimismo, contamos con datos que sugieren que las células de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) podrían estar secretando y utilizando de manera autócrina, factores de crecimiento como IL-3 e IL-6, cuya síntesis podría estar asociada al estadio de las células tumorales. Por lo tanto, si utilizamos la técnica de RT-PCR, que permite tanto la retrotranscripción de RNAm extraído de células de líneas de CaCU como la amplificación del DNA complementario utilizando primers específicos para IL-2, podremos determinar en células de CaCU la expresión de IL-2 dependiente del estadio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de RNA mensajero para IL-2 en líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino en diferentes estadios.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Cultivar 9 líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino a 15 minutos.
2. Cultivar 9 líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino a 2 horas.
3. Obtener DNA de linfocitos de sangre periférica (control positivo).
4. Obtener el RNAm de cada línea celular cultivada a diferentes tiempos utilizando trizol.
5. Obtener el cDNA a partir del RNAm por medio de la técnica de RT.
6. Amplificación de productos para IL-2 utilizando primers específicos para ella.
7. Electroforesis de los productos de la PCR.

MATERIAL Y MÉTODO

Material biológico

Líneas celulares

El material biológico consistió de nueve líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), obtenidas del Laboratorio de Oncología de la Unidad, las células se encontraban almacenadas en una solución de suero fetal de bovino y dimetilsulfóxido 10% (DMSO), en un criocontenedor sumergido en nitrógeno líquido, a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Tabla 4), de estas líneas, cinco eran positivas para el HPV tipo 18 (CALO, HELA, INBL, ROVA, VIPA); dos líneas con el HPV tipo 16 (CASKI, SIHA) y dos líneas negativas para el virus (VIBO, C33A).

Características de las líneas celulares

La línea celular SIHA establecida en el año 1975, es de origen de carcinoma de cérvix, establecida de fragmentos de una muestra de tejido escamoso primario quirúrgicamente obtenida, tiene un estadio IIB. Esta línea presenta el virus del papiloma humano (HPV-16, de una a dos copias por célula) integrado en su genoma (ATCC 2008, Palsson, et al., 1999).

La línea celular CASKI, establecida en el año 1977, se originó de tejido cérvico uterino por un carcinoma epidermoide, derivada de células metastásicas producidas por el intestino delgado mesentérico. En estas células se reporta la presencia de HPV-16, con alrededor de 600 copias por células (ATCC 2008, Palsson, et al., 1999).

La línea celular HELA, tiene un origen de adenocarcinoma metastásico, con un diagnóstico clínico estadio IVB. Las líneas celulares con una identidad étnica mestizas: (ATCC 2009, Palsson, et al., 1999).

CALO, con un diagnóstico clínico de carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizadas es estadio clínico; IIB con HPV-18 (Monroy 1991).

La línea celular INBL, tiene un diagnóstico, de carcinoma epidermoide de células grandes, no queratinizadas, con un estadio clínico IVB (Monroy 1991).

Las líneas ROVA con un estadio IIB, con HPV-18 y con un diagnóstico clínico de carcinoma epidermoide (Monroy, et al., 2002).

La línea celular C33A establecida en el año de 1964. Es derivada de una biopsia de cáncer cervical. Sus células son negativas para DNA y RNA del HPV (ATCC 2008, Palsson, et al., 1999).

La línea celular VIBO, se deriva de un carcinoma epidermoide. Sus células son negativas a HPV (Bañuelos 2003).

Línea celular VIPA con un estadio IIB, con HPV-18 y con un diagnóstico clínico de carcinoma epidermoide (Flores 2000, Monroy 1991).

Características de las líneas celulares		
Línea celular	Estadio	HPV
INBL	IVB	18
HELA	IVB	18
CASKI	IVB	16
SIHA	IIB	16
CALO	IIB	18
ROVA	IIB	18
VIPA	IIB	18
VIBO	IIB	Negativo
C33A	IIA	Negativo

Tabla 4. Características de las líneas celulares de CaCU empleadas

Existen diferentes técnicas para estudiar la biología molecular de las células que conforman un cáncer entre ellos podemos mencionar el cultivo *in vitro*, electroforesis y la técnica de PCR.

Condiciones del Cultivo Celular

El cultivo celular es una técnica usada en la mayoría de los procedimientos bioquímicos y moleculares, requiriendo la obtención de una gran cantidad de células para después aislar sus componentes, y así obtener la mayor información de un tipo celular. El cultivo celular es el proceso por el cual las células crecen bajo condiciones controladas en medios de cultivo. Las líneas celulares humanas de cáncer, han constituido accesibles modelos biológicos para investigar la biología del cáncer. El conocimiento previo de sus anormalidades genéticas puede permitir una opción más detallada del comportamiento de las células cancerígenas *in vivo* en experimentos biológicos.

Con el fin de tener células tumorales disponibles para subsecuentes experimentos, se llevo a cabo la criopreservación (apéndice 2). Para descongelar las células se sacaron las ampollas del nitrógeno y se mantuvieron a temperatura ambiente por algunos minutos para ser descongeladas y antes de estar totalmente líquidas fueron centrifugadas a 1500 rpm, el sobrenadante se desecho posteriormente el botón celular se lavó dos veces con RPMI para eliminar los residuos de DMSO. Después de esto, las células fueron cultivadas en medio con RPMI al 10% de SFB.

Las líneas celulares de CaCU, se cultivaron en un medio líquido RPMI 1640 10% SFB, (Gibco BRL, USA) (apéndice 2), las células se mantuvieron en una incubadora (HyClone) en una atmosfera de 5% CO₂, a una temperatura de 37°C y un ambiente saturado de humedad. Se cultivaron las líneas celulares en botellas de capacidad de 25 cm³, hasta que alcanzar una proliferación no mayor del 75%; es decir en fase exponencial, sin llegar a la saturación. Para desprender las células tumorales adherentes, se empleó verseno ó tripsina (apéndice 2). A estas células se les adiciono 5 mL de verseno y se dejo reposar por 5 minutos, una vez despegadas se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos para obtener el botón celular, el cual fue resuspendido con 1 ml de medio, su viabilidad fue evaluada por exclusión con azul de tripano (Sigma, USA), posteriormente la densidad fue calculada por conteo en cámara de Neubauer de (American Optical,U.S.A.) para así tener aproximadamente 1 500,000 células para cada extracción, el cual se realizó a diferentes tiempos 15 minutos y 2 horas para cada línea celular.

Extracción de linfocitos de sangre periférica (LSP)

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de un donador, para obtener células mononucleares mediante el método de gradiente de Ficoll-Hypaque, que fueron utilizados como control positivo en los ensayos de RT-PCR.

En condiciones de esterilidad se obtuvieron 5 ml de sangre periférica, utilizando jeringa con heparina. Después la sangre fue centrifugada durante 10 min a 1500 rpm, para luego separar el plasma del paquete celular mediante pipeteo suave.

El paquete celular fue lavado con RPMI, se adiciono un volumen de medio igual al del paquete celular, el lavado se realizó mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, para después desechar el sobrenadante y resuspendió el paquete celular nuevamente en RPMI para obtener una mezcla homogénea, después de esto se vertió una alícuota de 5 ml de la mezcla en tubos conteniendo 5 ml de Ficoll-Hypaque y fue centrifugada durante 30 minutos a 1500 rpm. Transcurrido el tiempo, se separaron las fases de células mononucleadas situadas en la interfase entre el paquete de eritrocitos y medio RPMI. Se obtuvo el halo de linfocitos y se colocó en un tubo con medio preparado (RPMI con SFB al 20%); para hacer un lavado, y se obtuvo el botón de linfocitos, este se resuspendió y se realizó la extracción de DNA con DNAzol para después someterlo a un PCR y electroforesis y usarlo como control positivo.

Extracción de RNA con trizol (GIBCO BRL)

Las líneas celulares fueron cultivadas a 2 tiempos (15 minutos y 2 horas), transcurrido este tiempo se les realizó la extracción del RNA mensajero (RNAm), para ello, se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió con un mililitro de RPMI o PBS y se vacía a un tubo eppendorf, se centrifugó para llevar a cabo el lavado, se decantó el sobrenadante. Se le agregó al botón celular 1ml de Trizol® (Gibco BRL, U.S.A.) el cual se resuspendió, la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y dejándolo actuar para que se lleve a cabo la reacción (lisado). Transcurrido el tiempo se agregaron 200µL de cloroformo, se agitó por inversión vigorosamente durante 15 segundos, incubando al final de la agitación 3 minutos a temperatura ambiente.

La muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4-8°C. Posteriormente, la fase acuosa (fase transparente) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se le agregó 500µL de isopropanol frío, centrifugando nuevamente para que se lleve a cabo la precipitación del RNA, para finalmente decantarlo y agregar 1mL etanol al 70% y dejarlo actuar por un lapso de 15 minutos para posteriormente desechar cuidadosamente el etanol con ayuda de una micropipeta para evitar pérdida del RNA.

El último paso es el secado de la muestra de RNA a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente. Ya libre de alcohol se resuspende en 20µL de agua dietilpirocarbonatada (DEPC) para hidratarlo y así obtener nuestro primer stock.

Se determinaron las concentraciones de cada una de las muestras realizando una segunda dilución 2/200 con agua DEPC (segundo stock), procediendo a su cuantificación en el espectrofotómetro (eppendorf, USA) a una absorbancia de 260nm, 280nm y la relación entre las absorbancias y así realizar los cálculos correspondientes para lograr una concentración en µg/µL, para ello se ocupó la siguiente fórmula:

$$\text{RNA} = (\text{Abs } 260\text{nm}) (40\mu\text{g}) (\text{Volumen de la dilución}) / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Electroforesis para la integridad del RNA

La integridad del RNA se determinó corriendo µl de la muestra en un gel de agarosa al 1.5%. La agarosa se mezcló con el TBE en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se calentó durante 1 minuto y se agregó el bromuro de etidio para visualizar los productos de la extracción se usó TBE 0.5 X (apéndice 1), como buffer de corrida una vez polimerizado el gel, se colocaron las muestras de RNA con una solución amortiguadora de carga y se observó el gel en un transiluminador (UV, USA) y se fotografió para observar la calidad del RNA.

Obtención del cDNA a partir de RNA total.

Retrotranscripción (RT)

De acuerdo a la concentración de RNAm obtenido se determinó el volumen de la solución necesaria para tomar $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNAm requerido en la técnica. Se procedió a la retrotranscripción de cada una de las muestras bajo condiciones determinadas (Tabla 5), se incubó en el termociclador durante 1 hora a 42°C . Obteniendo así el DNA complementario.

Los reactivos empleados en la RT son: $1\mu\text{l}$ de RNA, buffer amortiguador 5x, mezcla de nucleótidos dNTPS (adenina, timina, guanina y citocina a una concentración de 5mM), oligo dT, titiotreitol (0.1 M), retrotranscriptasa del virus de la leucemia de ratón y Agua libre de RNAsas (apéndice 1).

Reactivos RT	$\mu\text{l}/\text{RX}$
Amortiguador 5X	6
dTT 0.1M	2
dNTP'S 5 mM	4
Oligo (dT)	1
Enzima MMLV-RT	2
Muestra RNAm	1
H ₂ O libre de RNAsas	14
Volumen total	30

Tabla 5. Condiciones para RT.

Reacción en cadena de la polimera (PCR)

Los productos que se obtuvieron de la RT, se utilizaron para llevar a cabo la amplificación del cDNA utilizando primer para IL-2. Sentido 5' ACCTCAACTCCTGCCACAAT3' y como Antisentido 5' TCCTGGTGAGTTTGGGATTC3 y se utilizó β -actina como un control positivo con los siguientes primers sentido '5GGGTCAGAATTCCTATG'3 y como antisentido '5GGTCTCAAACATGATCTGGG3'. La amplificación se llevó a cabo bajo condiciones determinadas (Tabla 6).

Reactivos PCR	μ l/RX
Amortiguador 5X green	6
dNTP'S 10 mM	1
Oligo 1 (3' – 5')	1
Oligo 2 (5' – 3')	1
GoTaq polimerasa 5u/ μ l	0.15
Muestra cDNA	4
H ₂ O libre de RNAsas	6.85
Volumen total	20

Tabla 6. Condiciones para PCR

Para que la PCR se lleve a cabo en perfectas condiciones el termociclador lleva a cabo los siguientes pasos (Tabla 7). Se guardaron los productos del PCR en congelación a (-20° C) hasta su uso.

Ciclo	Pasos de temperatura y tiempo
1er ciclo	Paso 1 = 94°C 6 minutos
2do ciclo	Paso 2 = 55°C 2 minutos Paso 3 = 72°C 2 minutos Paso 4 = 94°C 45 segundos Paso 5 = * Se repitió 29 veces el segundo ciclo (paso 2 al 4)
3er ciclo	Paso 6 = 55°C 2 minutos Paso 7 = 72°C 7 minutos Paso 8 = 20°C 30 minutos Paso 9 = 4°C por 1 hora

Tabla 7. Programa del termociclador para PCR.

Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron por medio de una electroforesis; en geles al 1.5% de agarosa con TBE (apéndice 1). La agarosa se mezcló con el TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se calentó durante 1 minuto y se agregó el bromuro de etidio para visualiza los productos. Una vez polimerizado el gel, se colocó en el primer pozo el control de pares de bases (escalera PB) para ubicar por su tamaño nuestra la citocina, posteriormente se colocaron 4µL de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Owl, USA), cubierto de TBE 0.5 % a 80–90 volts durante 60 min. Finalmente, se colocó el gel en un transiluminador (UVP, USA) que con ayuda de la luz ultra violeta se pudieron observar los productos y así lograr localizar las diferentes bandas para su propio análisis.

RESULTADOS

Se realizó el cultivo celular de cada una de las líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU). El número de las células se calculó por conteo en cámara de Neubauer de (American Optical, U.S.A.), se obtuvieron 1.5×10^6 células para cada extracción de RNA mensajero (RNAm) utilizando la técnica de trizol, se realizó la extracción de RNAm en dos tiempos 15 minutos y 2 horas, ya que en un ensayo previo se determinó que a los 15 minutos y 2 horas se detecta la aparición de proteínas como JAK y STAT (en un patrón diferente al conocido para los linfocitos de sangre periférica normales) involucradas en la vía de señalización del receptor para IL-2 presente en las líneas celulares. Una vez obtenido el RNAm total, este fue cuantificado en el espectrofotómetro, con el propósito de realizar la retrotranscripción de cada muestra a partir de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNAm.

Integridad del RNAm

Con la finalidad de conocer la integridad del RNAm extraído con trizol se realizó un gel de agarosa, en el cual se observa la expresión del RNA de las líneas celulares. Las muestras se colocaron por pares de tiempos 15 minutos y 2 horas en el siguiente orden: carril 1 y 2 INBL, carril 3 y 4 HELA, carril 5 y 6 CASKI, carril 7 y 8 C33A, carril 8 y 10 VIBO, carril 11 y 12 VIPA, carril 13 y 14 ROVA, carril 15 y 16 SIHA, carril 17 y 18 CALO (Figura 4).

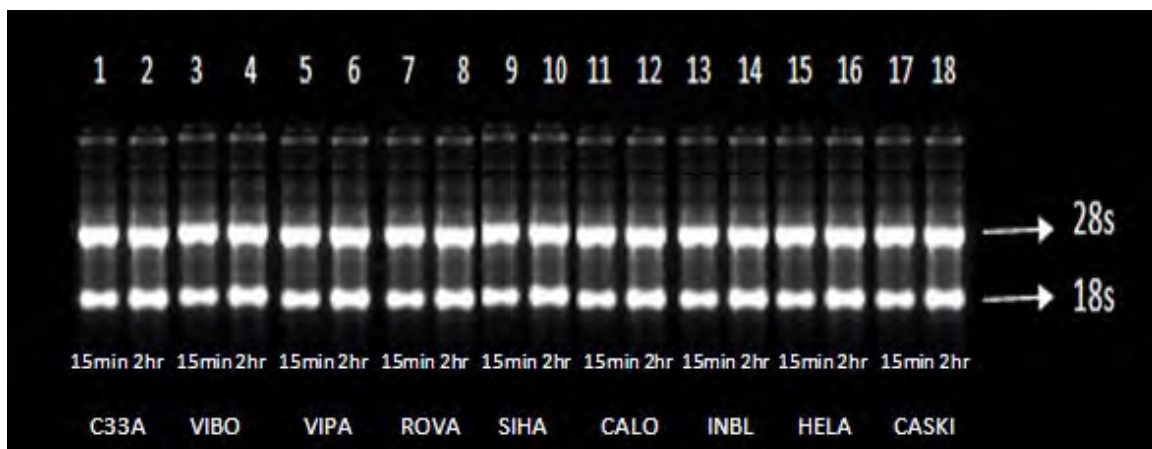


Figura 4. RNA mensajero extraído de las líneas de CaCU, que muestra las bandas 18s y 28s. En todos los casos se observan integras ambas bandas, que indica que se realizó una correcta extracción del RNA. Los RNAs fueron colocados por pares en tiempos de 15 minutos y 2 horas por línea celular. Carril 1 y 2 C33A. carril 3 y 4 VIBO, carril 5 y 6 VIPA, carril 7 y 8 ROVA, carril 9 y 10 SIHA, carril 11 y 12 CALO, carril 13 y 14 INBL, carril 15 y 16 HELA y por último carril 17 y 18 CASKI.

Una vez, confirmada la integridad del RNAm extraído, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) para cada una de las muestras de las líneas celulares, para ello se realizó la retrotranscripción bajo las condiciones descritas en la metodología.

DNA de linfocitos de Sangre periférica con IL-2.

Para comprobar que las condiciones de la técnica de PCR eran las adecuadas para la amplificación correcta de los primers para IL-2, se realizó la extracción de DNA de linfocitos de sangre y se llevó a cabo la amplificación utilizando los primers específicos para IL-2, carril 1 patrón de pares de bases, carril 2 DNA de linfocitos (Figura 5).

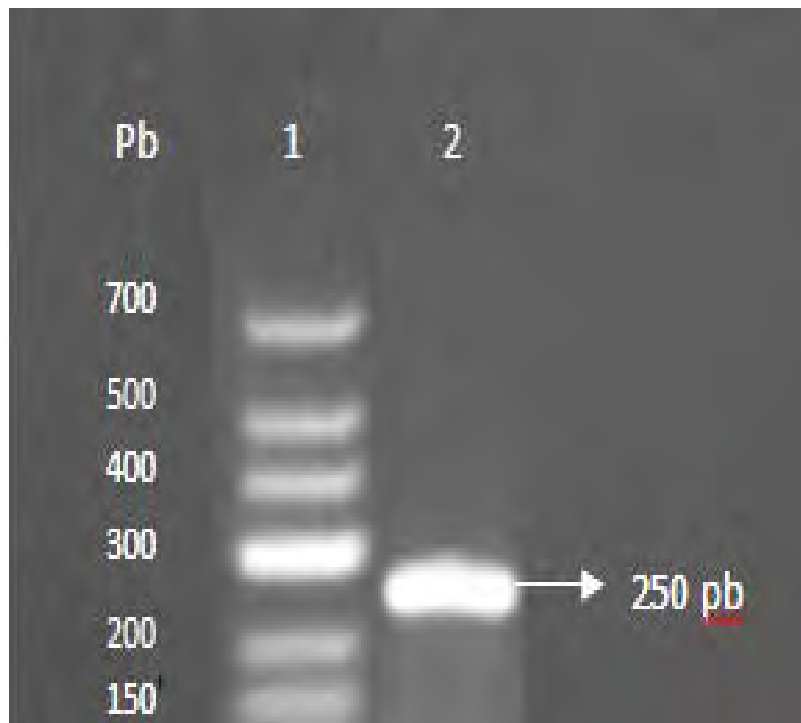


Figura 5. Producto de amplificación de DNA de linfocitos de sangre periférica, usando los primers para IL-2 diseñados. Carril 1 se observó una banda de 250pb que corresponden a los productos de amplificación esperados para esta citocina, lo cual indica que las condiciones de PCR son las adecuadas.

Líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino con β -actina.

Se corrobora que el cDNA para cada una de las líneas celulares, y para cada uno de los tiempos, estaba integro, por medio de la amplificación de β -actina (proteína constitutiva) cuyo producto se usa como control interno de la técnica.

Para las líneas celulares (C33A, VIBO, VIPA, ROVA, SIHA CALO, INBL, HELA, CASK), cultivadas a 15 min y 2 horas se obtuvieron productos de amplificación para β -actina los cuales muestran una banda de 300 pb que corresponden al tamaño del producto de amplificación esperado para esta proteína. Los productos de amplificación fueron colocados por pares de tiempos de 15 minutos y 2 horas por línea celular. Carril 1 y 2 C33A, carril 3 y 4 VIBO, carril 5 y 6 VIPA, carril 7 y 8 ROVA, carril 9 y 10 SIHA, carril 11 y 12 CALO, carril 13 y 14 INB, carril 15 y 16 HELA y por último carril 17 y 18 CASKI (Figura 6).

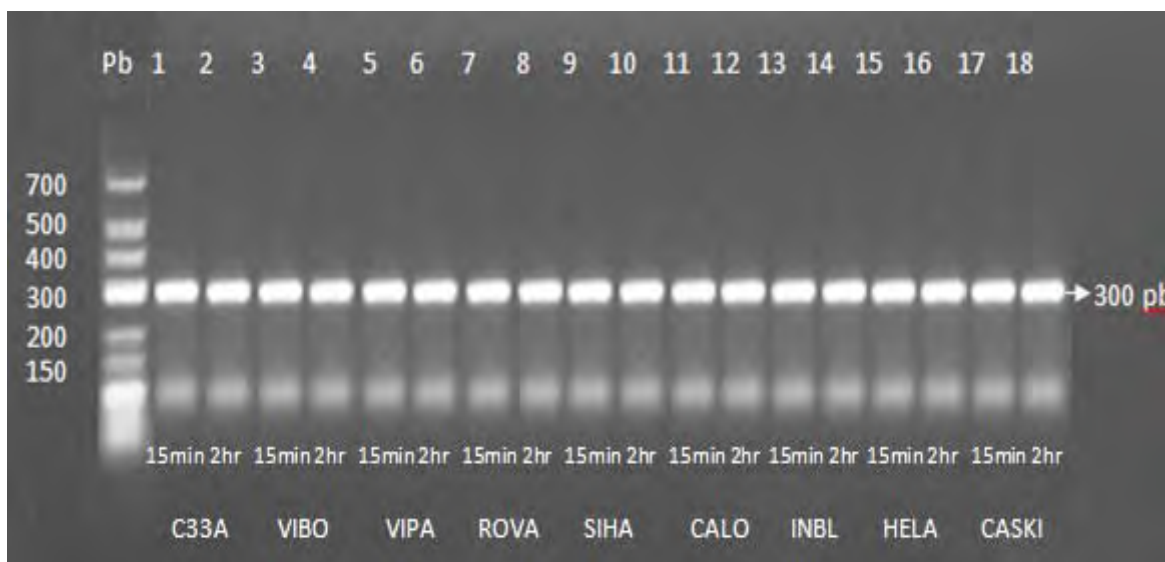


Figura 6. Productos de amplificación para β -actina de los cDNA de las líneas células de CaCU. Los productos de amplificación fueron colocados por pares en tiempos de 15 minutos y 2 horas por línea celular. Carril 1 y 2 C33A, carril 3 y 4 VIBO, carril 5 y 6 VIPA, carril 7 y 8 ROVA, carril 9 y 10 SIHA, carril 11 y 12 CALO, carril 13 y 14 INBL, carril 15 y 16 HELA y por último carril 17 y 18 CASKI.

Después de confirmar que los primer para IL-2 nos da un producto de amplificación de 250pb, el esperado para la citocina. Y que las condiciones para la amplificación de la técnica de PCR son las adecuadas para la amplificación, se procedió a amplificar el gen para IL-2 utilizando los cDNAs de las líneas celulares (C33A, VIBO, VIPA, ROVA, SIHA CALO, INBL, HELA, CASK), cultivadas a 15 minutos y 2 horas.

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio II cultivadas 15 minutos.

Para las muestras obtenidas de las líneas celulares de estadio II (VIPA, ROVA, SIHA y CALO) cultivadas por 15 minutos, observamos productos de amplificación para IL-2, mientras que para las líneas celulares C33A y VIBO no se detectó algún producto. De aquellas líneas que muestran producto de amplificación, CALO presenta la banda de mayor tamaño. En el gel los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA y carril 6 CALO (Figura 7).

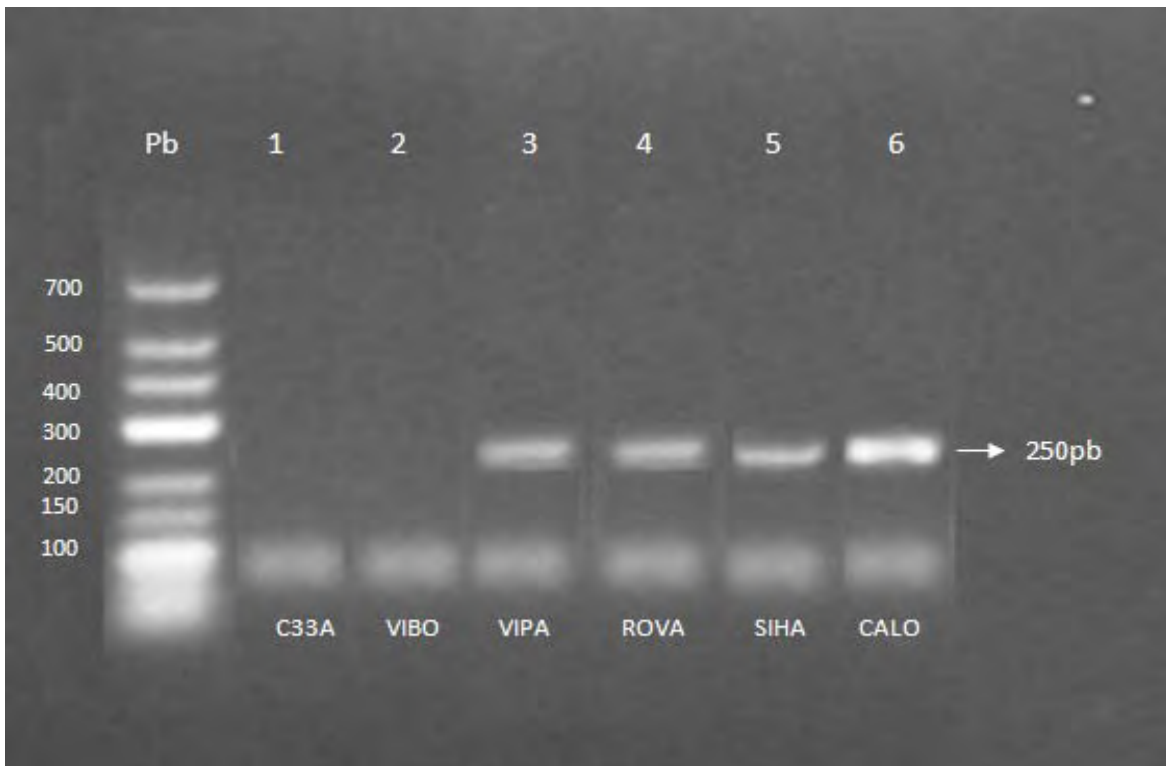


Figura 7. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II cultivadas a 15 minutos. Los productos de amplificación se encuentran colocados de la siguiente manera. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA y carril 6 CALO. Para 4 de las 6 líneas celulares observamos expresión de productos para IL-2 y de estas CALO muestra una mayor expresión de citocina. Mientras que C33A y VIBO no expresaron IL-2.

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio II cultivadas 2 horas.

En el caso de las líneas celulares estadio II (VIBO, VIPA, ROVA, SIHA Y CALO) que fueron cultivadas por 2 horas observamos productos de amplificación para IL-2, excepto C33A y VIBO, CALO presenta la banda de mayor tamaño. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA y carril 6 CALO (Figura 8).

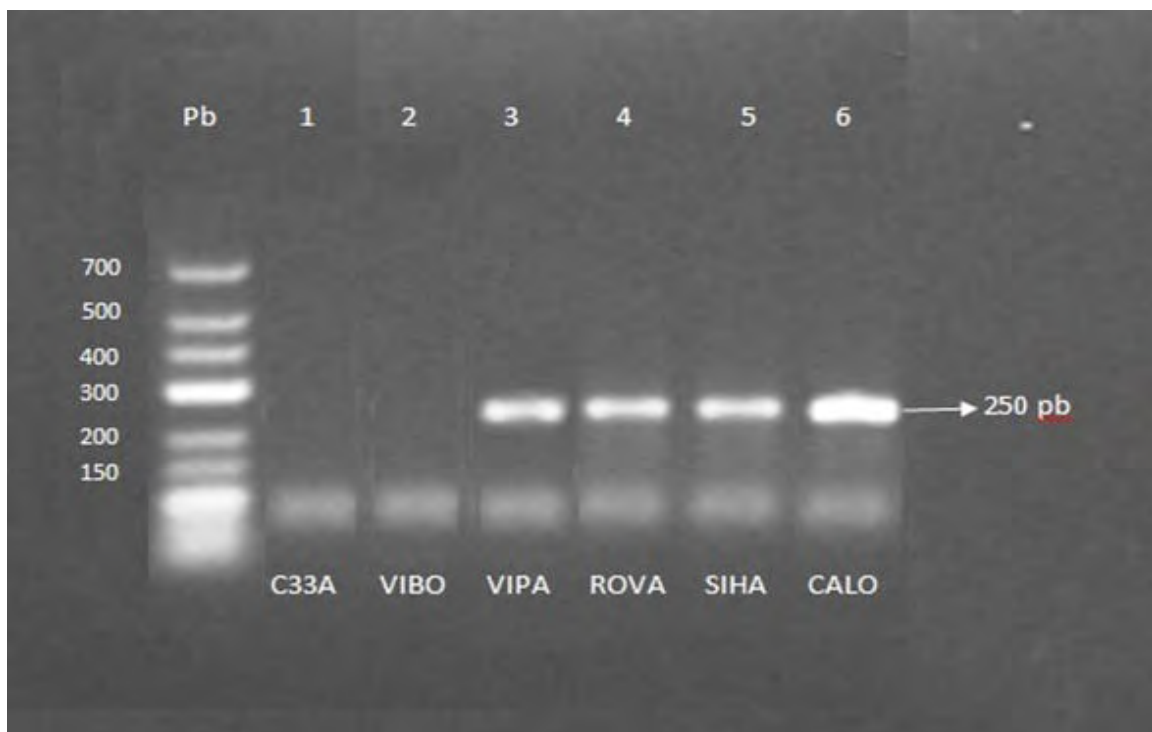


Figura 8. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II cultivadas a 2 horas. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA y carril 6 CALO. Para 4 de las 6 líneas celulares empleadas, observamos productos de amplificación para IL-2 y mientras que C33A y VIBO no muestra banda, el producto de mayor tamaño se encontró en la línea CALO.

Comparación de los productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio II cultivadas a 15 minutos y 2 horas.

Con el propósito, de comparar si existe diferencia entre los productos de amplificación para las muestras de cada línea celular en función del tiempo de cultivo. Se corrió un gel con los productos de amplificación obtenidos para todas las líneas celulares estadio II, cultivadas a 15 minutos y 2 horas. Las muestras se colocaron en el siguiente orden. Carril 1 y 2 C33A, carril 3 y 4 VIBO, carril 5 y 6 VIPA, carril 7 y 8 ROVA, carril 9 y 10 SIHA, carril 11 y 12 CALO.

En 4 de las 6 líneas celulares en estadio II, se observa un incremento de la expresión IL-2 con respecto al tiempo. Cabe resaltar que las líneas C33A y VIBO 15 minutos y 2 horas, no presentan producto de amplificación para IL-2 (Figura 9).

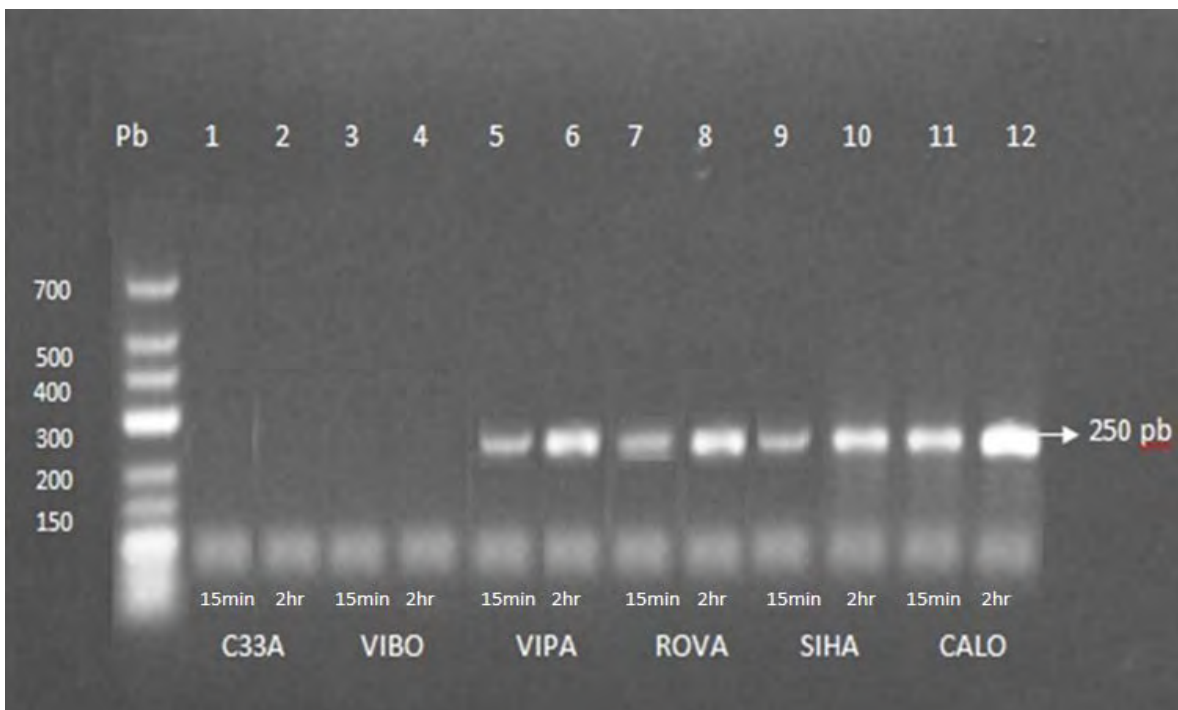


Figura 9. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio II a 15 minutos y 2 horas. Los productos de amplificación fueron colocados por pares de tiempos de 15 minutos y 2 horas por cada línea celular. Carril 1 y 2 C33A, carril 3 y 4 VIBO, carril 5 y 6 VIPA, carril 7 y 8 ROVA, carril 9 y 10 SIHA, carril 11 y 12 CALO. Para 4 de las 6 líneas celulares observamos un aumento en los productos de IL-2 en las muestras obtenidas a 2hrs. Mientras que C33A y VIBO no expresa IL-2.

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio IV cultivadas 15 minutos.

Para las líneas celulares estadio IV (INBL, HELA y CASKI) cultivadas por 15 minutos observamos productos de amplificación para IL-2, en CASKI se detectó un aumento considerable en la expresión para la citocina, mientras que INBL y HELA muestran una banda de menor tamaño. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 INBL, carril 2 HELA y carril 3 CASKI (Figura 10).

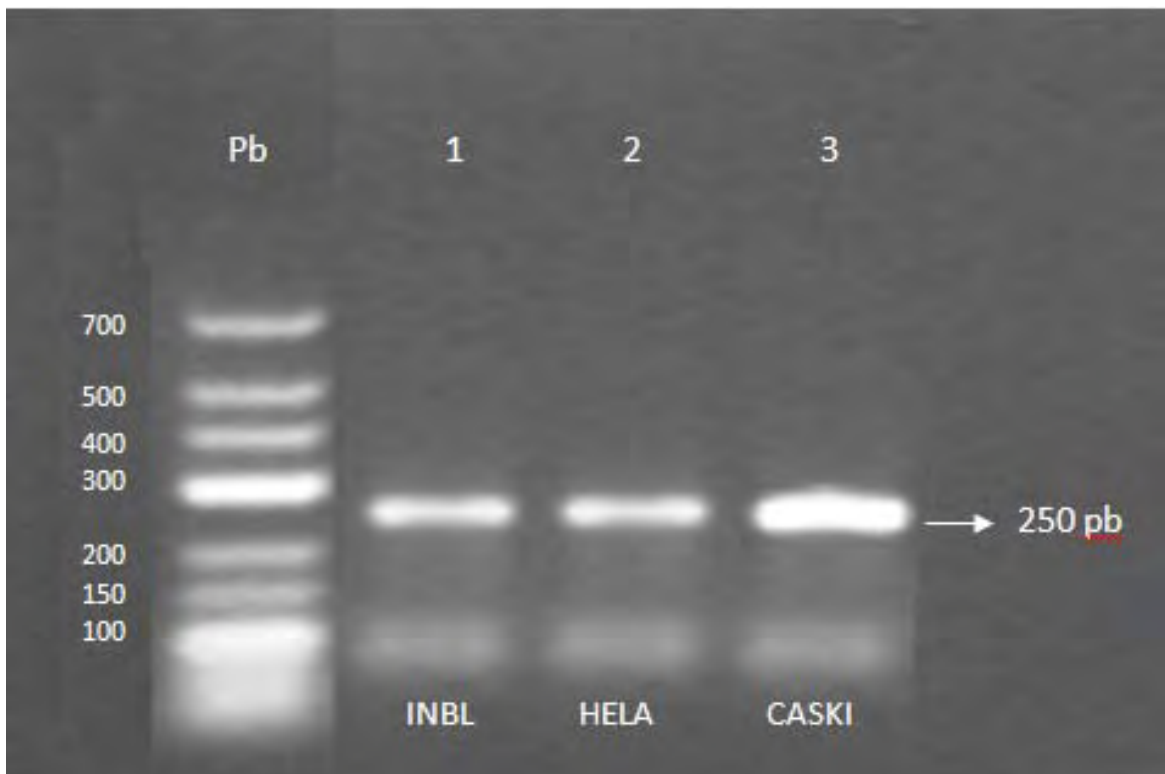


Figura 10. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio IV cultivadas a 15 minutos. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 INBL, carril 2 HELA y carril 3 CASKI, las 3 líneas celulares expresaron productos para IL-2, destacando CASKI que muestra un aumento considerable en el producto de amplificación.

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio IV cultivadas 2 horas.

En el caso de las líneas celulares estadio IV (INBL, HELA y CASKI) cultivadas durante 2 horas detectamos productos de amplificación para IL-2, nuevamente CASKI muestra un aumento considerable en su producto de amplificación, mientras que INBL y HELA muestran una banda relativamente más pequeña. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 INBL, carril 2 HELA y por último carril 3 CASKI. (Figura 11).

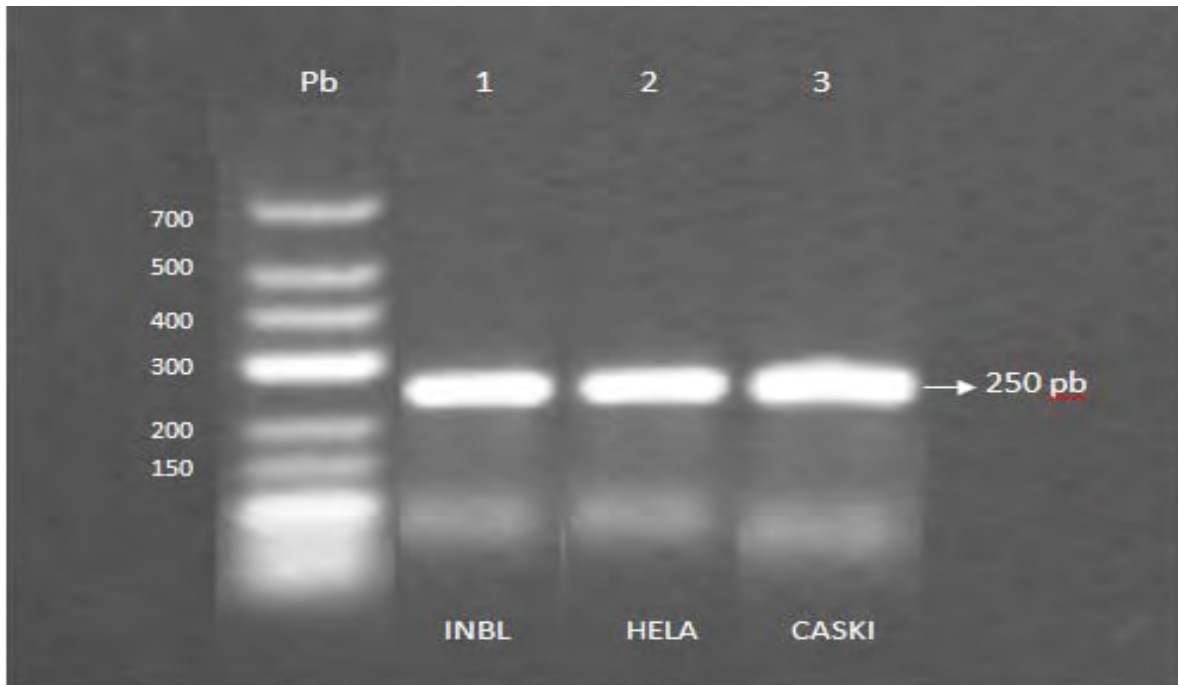


Figura 11. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio IV cultivadas a 2 horas. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 INBL, carril 2 HELA y por último carril 3 CASKI. Para las 3 líneas celulares observamos productos de amplificación para IL-2, en donde CASKI presenta la banda de mayor tamaño.

Comparación de los productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio IV cultivadas a 15 minutos y 2 horas.

En el caso de las líneas celulares de estadio IVB, observamos productos de amplificación para IL-2, los cuales aumenta con respecto al tiempo. Los datos indican que la muestra CASKI presenta un aumento considerable en la expresión de la citocina en comparación a INBL y HELA. Los productos de amplificación fueron colocados por pares en tiempos de 15 minutos y 2 horas por línea celular. Carril 1 y 2 INBL, carril 3 y 4 HELA y por último carril 5 y 6 CASKI (Figura 12).

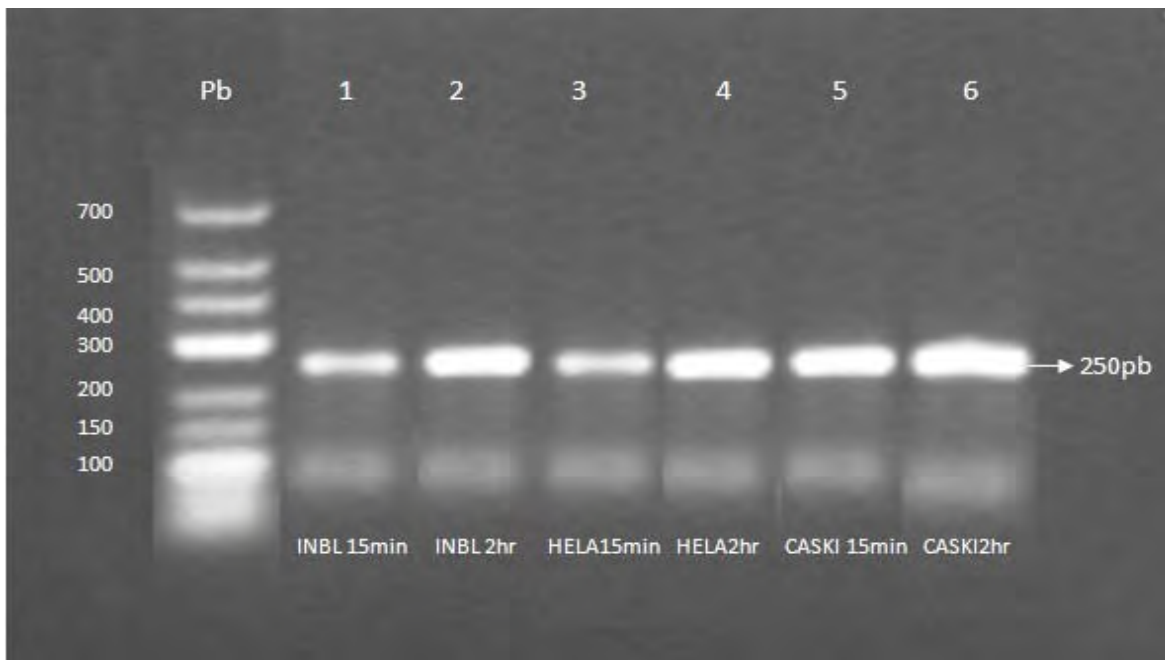


Figura 12. *Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU estadio IV cultivadas a 15 minutos y 2 horas. Los productos de amplificación fueron colocados por pares de tiempos de 15 minutos y 2 horas por línea celular. Carril 1 y 2 INBL, carril 3 y 4 HELA y por último carril 5 y 6 CASKI. Para las 3 líneas celulares observamos un aumento importante en los productos para IL-2 en las muestras obtenidas a 2hrs.*

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio II y IV cultivadas a 15 minutos.

Con la finalidad de realizar una comparación de la expresión de IL-2 entre las líneas celulares en diferentes estadios, cultivadas a 15 minutos se corrió un gel con los productos de amplificación de estas. De acuerdo a los resultados, parece no haber modificación en la expresión de IL-2 con respecto al estadio. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA, carril 6 CALO, carril 7 INBL, carril 8 HELA y por último el carril 9 CASKI (Figura 13).

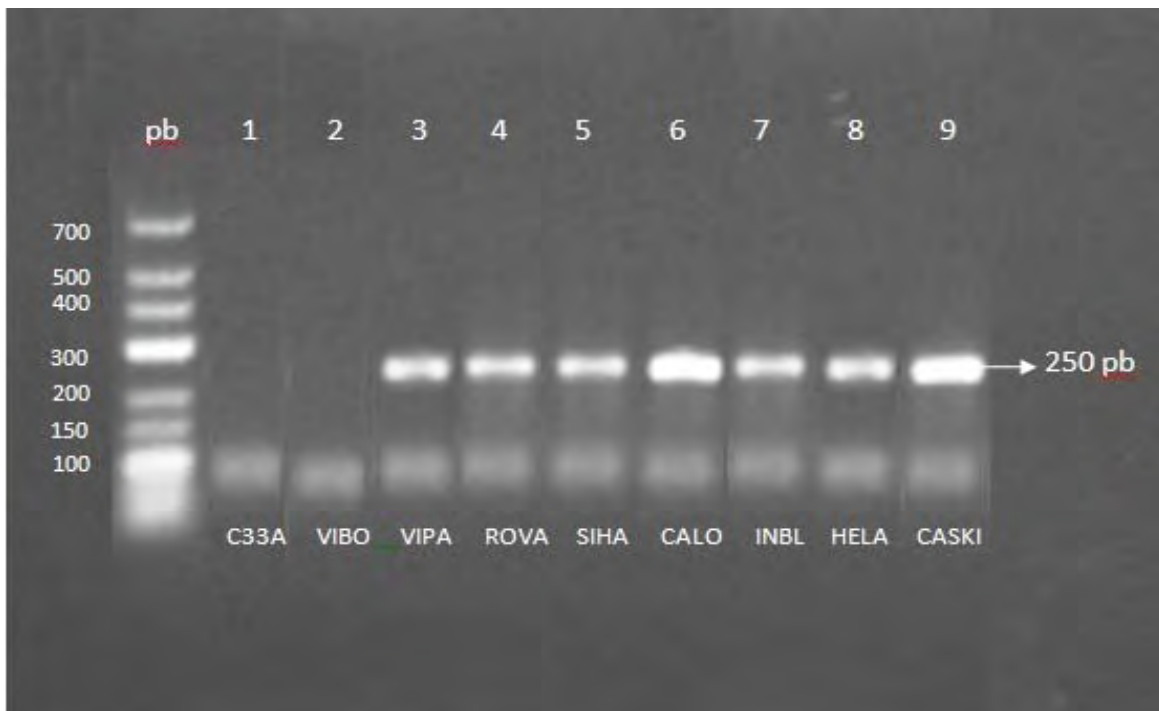


Figura 13. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio II y IV cultivadas a 15 minutos. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA; carril 6 CALO, carril 7 INBL, carril 8 HELA y por último el carril 9 CASKI. De las 9 líneas celulares 7 expresaron productos de IL-2, mientras que C33A y VIBO no expresa IL-2, así mismo, no se observó diferencias de expresión de la citocina dependiente del estadio.

Productos de amplificación para IL-2 de muestras de líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino estadio II y IV cultivadas a 2 horas.

Con el propósito de efectuar una comparación de la expresión de IL-2 entre las líneas celulares en diferentes estadios, cultivadas a 2 horas se corrió un gel con los productos de amplificación de estas. De acuerdo a los resultados obtenidos, las líneas celulares en estadio IV muestran un aumento considerable de expresión para IL-2 en comparación con las líneas celulares en estadio II. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA, carril 6 CALO, carril 7 INBL, carril 8 HELA y por último el carril 9 CASKI (Figura 14).

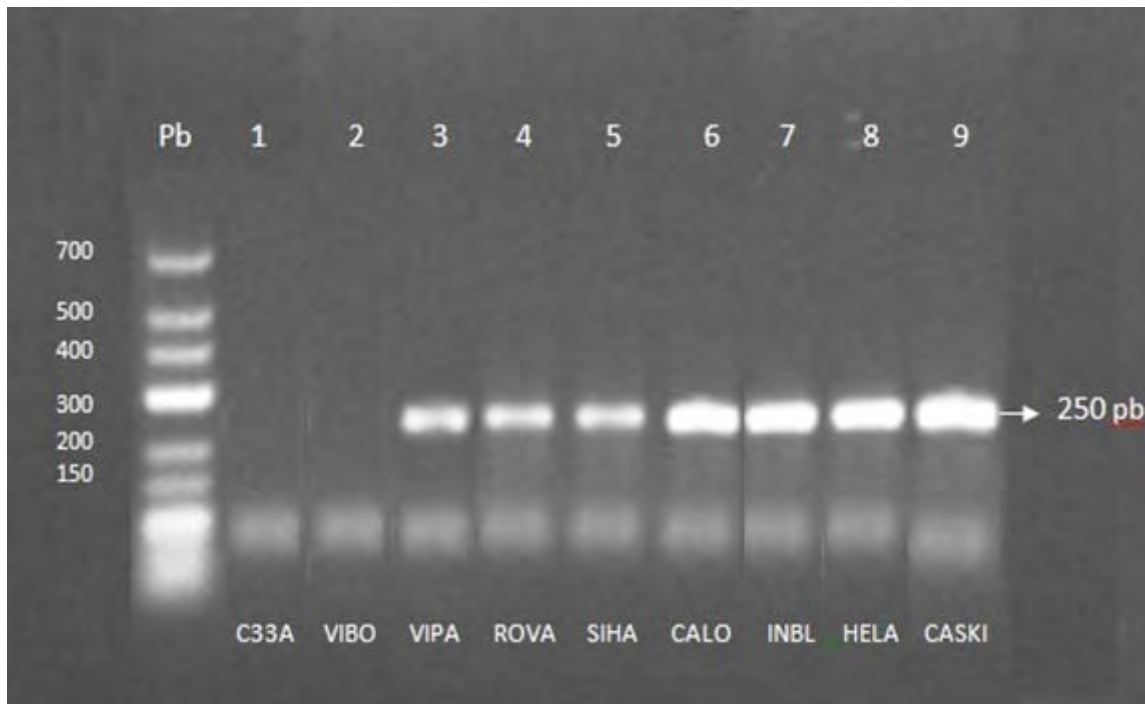


Figura 14. Productos de amplificación para IL-2 en células de CaCU, estadio II y IV cultivadas a 2 horas. Los productos de amplificación fueron colocados en el siguiente orden. Carril 1 C33A, carril 2 VIBO, carril 3 VIPA, carril 4 ROVA, carril 5 SIHA, carril 6 CALO, carril 7 INBL, carril 8 HELA y por último el carril 9 CASKI. De las 9 líneas celulares 7 expresaron productos de IL-2, mientras que C33A y VIBO no expresa IL-2. Se observa un aumento de expresión en las muestras de líneas estadio IV en comparación de las muestras en estadio II.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las interleucinas (ILs), juegan un papel muy importante en la respuesta inmune. Además, se conoce su importancia en la regulación de células no hematopoyéticas tanto normales como tumorales, controlando positiva o negativamente su proliferación. Recientemente, un miembro del laboratorio de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) proporciono datos que indican que las líneas de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) CALO e INBL secretan IL-2, IL-3 e IL-6 y que sugiere su participación en un sistema autócrino de regulación de la proliferación de estas células (Torres 2000). Un trabajo paralelo del laboratorio UIDCC apporto información acerca del papel de IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL, destacando que el efecto que produce la citocina depende de la concentración de la misma (Alvarado 1997). De este modo a bajas concentraciones se induce la proliferación de las células mientras que a altas concentraciones se inhibe. Por lo antes expuesto es importante determinar si las líneas de CaCU secretan IL-2 y si su expresión depende de su estadio.

Debido a que IL-2 juega un papel importante en la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T, en particular la de linfocitos T citotóxicos (CD8+), que se encargan de eliminar células tumorales. Y que IL-2 se administra vía sistema para activar la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales, en los pacientes con diferentes tipos de cáncer. Es importante determinar el efecto directo que IL-2 puede tener sobre las células neoplásicas y conocer si las células tumorales pueden secretar dicha citocina.

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la expresión de IL-2 en líneas celulares de CaCU. En este trabajo se utilizaron 9 líneas celulares que incluyen los estadios II y IV de evolución neoplásica. El RNA mensajero se obtuvo a 15 minutos y 2 horas. Se eligieron estos tiempos ya que en un ensayo previo se determino que a partir de 15 minutos se detecta la presencia de proteínas involucradas en la vía de señalización del receptor para IL-2 como JAK y STAT, también presente en las líneas CALO e INBL (Alvarado 2001). Se sabe que en el proceso de transformación neoplásica de las células del cérvix se encuentra involucrado, como principal agente etiológico el papiloma virus humano (VPH), Ya que en estudios epidemiológicos y por evidencia molecular se ha demostrado, que el ADN del virus papiloma está integrado en las células neoplásicas en más del 90% de los carcinomas cervicales (Alonso 2000). Además,

el ADN viral presente en los núcleos de las células infectadas, juegan un papel clave, ya que de esto depende la acción del virus en la célula ya que cuando la infección es por los subtipos 16 y 18 no hay expresión morfológica viral, porque partes del genoma viral (E6 y E7), se integran al DNA del huésped y tienen propiedades transformadoras (Alonso 2000).

También, se cuenta con evidencias que indican que esta inserción de las partículas virales produce modificaciones en la síntesis proteica de las células. Provocando que las células de CaCU adquieran un patrón alterado de síntesis, en el cual están involucradas vías de señalización anormal o la adquisición de procesos metabólicos primitivos, en los cuales pueden sobre expresar moléculas que les confieren sobrevivencia, las induce a proliferar o sintetizar moléculas que les permite evadir la respuesta inmunológica antitumoral.

Esta información puede explicar porque al analizar los datos obtenidos para las líneas celulares de CaCU C33A y VIBO a 5 minutos y 2 horas no se observaron productos de amplificación para IL-2 ya que éstas líneas no presentan inserción del DNA del VPH, por otro lado, las células (INBL, CASKI, HELA, CALO, SIHA, ROVA y VIPA) en las que se detecta la presencia de DNA viral también encontramos expresión de IL-2. Lo antes mencionado nos hace sugerir que la expresión de IL-2 en líneas de CaCU está directamente relacionado con la inserción del DNA de VPH. Esta no sería la primera vez que se asocia la presencia de VPH con la regulación de genes, ya que se ha descrito que la expresión de p53 en células neoplásicas se ve alterada por la presencia del DNA de VPH (Palsson, et al., 1999).

Evidentemente si consideramos que la expresión de IL-2 está influenciada por la presencia de DNA viral, entonces era de esperarse que las líneas de CaCU, VPH positivas VIPA, ROVA, SIHA, CALO, INBL, HELA y CASKI mostraran productos de amplificación para IL-2, tal y como lo reportamos en este trabajo.

Durante el curso de la transformación neoplásica las células afectadas sufren una serie de cambios sucesivos que culminan en metastasis. En el caso particular del CaCU estadio 0: las células anormales solo se encuentran en la primera capa de células que recubre el cuello uterino. Estadio IA: las células se localizan a no más de 5 mm de profundidad y 7 mm de ancho. Estadio IB: el cáncer se encuentra dentro del cuello uterino aproximadamente a 4 cm. Estadio II: cáncer diseminado más allá del cuello uterino sin alcanzar la pared pélvica. Estadio IIA: cáncer

diseminado a dos tercios superiores de la vagina. Estadio IIB: cáncer diseminado a los tejidos entorno al útero. Estadio III: cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina y tal vez haya alcanzado la pared pélvica y los ganglios linfáticos circundantes. Estadio IIIA: cáncer diseminado al tercio inferior de la vagina. Estadio IIIB cáncer diseminado a la pared pélvica y es lo suficientemente grande para bloquear los uréteres y puede haber alcanzado los ganglios linfáticos. Estadio IV: cáncer diseminado a la vejiga recto y otras partes del cuerpo. Estadio: IVA: cáncer diseminado a vejiga o pared del recto y puede que también en los ganglios linfáticos y en la pelvis. Estadio IVB: cáncer diseminado más allá de la pelvis y ganglios linfáticos y otros lugares en el cuerpo como abdomen, hígado, intestino y pulmones (Alonso 2000).

Estos cambios que sufren las células y definen los estadios de un proceso neoplásico pueden influir en la expresión de proteínas en dichas células. Por ejemplo, se ha reportado que las líneas de CaCU CALO e INBL, tienen una expresión diferencial del receptor para IL-2 dependiente del estadio de las células. En lesiones tempranas no se encuentra evidencia de los componentes del receptor, mientras que en células en estadio I se observa la cadena alfa y en estadio II y III se observan la subunidad beta y en estadios IV se expresa el receptor completo con sus tres subunidades alfa, beta y gamma (Rangel 1998). Suponemos que para el caso de la expresión de IL-2, puede estar sucediendo algo similar. Hecho que es muy evidente en los datos obtenidos en este trabajo para las líneas VIPA, ROVA, SIHA y CALO estadio IIIB cuyos productos de amplificación son superados por los obtenidos para las líneas celulares en estadio IV INBL, HELA y CASKI. Lo cual sugiere que la síntesis de IL-2 es dependiente del estadio y es consecuencia de la progresión del tumor.

Se sabe que cuando un ligando como IL-2 se une a su receptor desencadena la vía de señalización del mismo y la expresión de las proteínas que participan en dicha vía (Abbas 2004), En particular en trabajos previos demostramos que las líneas celulares de CaCU CALO e INBL, expresan el receptor para IL-2 y que este es funcional ya que al adicionar IL-2 exógeno se observa, a partir de los 15 minutos, la presencia de proteínas involucradas en la vía de señalización inducida por el receptor para IL-2 (Valle 2000). Además Torres 2000, evalúa la secreción de IL-3 e IL-6 en el medio condicionado de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL observando que dichas proteínas muestran su máxima concentración a las 72 horas, la cual decrece rápidamente teniendo su mínimo a las 168 horas, esto sugiere un mecanismo autócrino de regulación de la proliferación.

Los datos proporcionados en este trabajo indican que la IL-2 sintetizada por las líneas celulares tiene un comportamiento semejante a IL-3 e IL-6 ya que vemos que las células de las líneas cultivadas durante 15 minutos muestran una menor expresión del mensajero para IL-2 y que conforme pasa el tiempo observamos una mayor expresión de RNA mensajero, que sugiere que esta citocina también se está acumulando y se utiliza posteriormente por las propias células y que IL-2 también participa en este proceso de autócrino de regulación de la proliferación. Esta afirmación se apoya en los datos reportados por Alvarado 1997, quien indica que las líneas celulares de CaCU CALO e INBL proliferan en presencia de 10UI/ml de IL-2. Por lo que, de acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo, por lo tanto, pensamos que las células de CaCU producen IL-2 para auto consumo.

Por lo antes discutido nuestros resultados proporcionan información acerca de la biología de este tipo de tumor y confirmar que las líneas celulares de CaCU pueden crear mecanismos para proliferar a expensas del organismo, en donde las células tumorales serían más eficientes para utilizar las citocinas secretadas por ellas mismas en un mecanismo autócrino de proliferación.

Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo proporcionan información sobre los factores de regulación de la síntesis de la citocina IL-2, lo cual contribuye al conocimiento sobre la regulación y de la proliferación de estas células tumorales. Podemos postular un modelo de proliferación autócrino para las células de CaCU. Si tomamos en cuenta que *in vivo* las células de carcinoma de cérvix producen IL-2 y que también responden a IL-2 exógena, por lo que consideramos que pueden utilizar la IL-2 sintetizada por los linfocitos T en su proceso de activación. Podemos sugerir que el consumo de IL-2 por parte de las células tumorales puede ser una vía de escape inmunológico ya que las células de CaCU requieren bajas concentraciones de IL-2 exógeno para proliferar, (Alvarado 1997), demuestra que mientras los linfocitos requieren de 100UI/ml de IL-2 para proliferar *in vitro*, las células tumorales solo requieren de 10UI/ml. Por lo tanto, si las células de CaCU *in vitro* utilizan la IL-2 requerida para diferenciarse de las células citotóxicas, que serían las responsables de eliminar las células cancerosas, entonces el tumor crecería a expensas de la IL-2 secretada por los linfocitos.

CONCLUSIONES

- ❖ La línea celular de CaCU C33A y VIBO estadio IIA y IIB, a 15 minutos y 2 horas no expresaron IL-2.
- ❖ Las líneas celulares de CaCU estadio IVB, INBL, HELA, CASKI y en estadio IIIB VIPA, ROVA, SIHA y CALO a 15 minutos y 2 horas expresaron IL-2.
- ❖ Las líneas celulares estadio IVB (INBL, HELA y CASKI) cultivadas a 2 horas expresaron los mayores productos de amplificación para IL-2.
- ❖ Se observó una mayor expresión de IL-2 en los cultivos de células de 2 horas.

PERSPECTIVAS

1. En futuros experimentos sería conveniente analizar el sitio de inserción del VPH en relación con el gen de IL-2.
2. Llevar a cabo la cuantificación de la citocina para cada una de las líneas celulares.
3. Evaluar la presencia de esta citocina en células de Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) de pacientes y poder comparar los resultados dependiendo a los estadios.
4. Con los datos presentados no podemos establecer si IL-2 se está acumulando o la están utilizando, por lo tanto, sería conveniente hacer una determinación de la expresión de la citocina a tiempos más largos para saber si es un proceso cíclico ya que el tiempo de duplicación de las líneas es de un rango de 32 a 34 horas, y así comprobar que la citocina se está utilizando.

REFERENCIAS

Abbas Abul K y Lichtman Andrew H (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. Editorial Elsevier. Madrid España, 563.

Aggarwal B y Gutterman J (1992). *Human cytokines: Handbook for basic and clinical research*. Blakwell Scientific Boston, 441.

Alonso de Ruiz Patricia, Lazcano Ponce Eduardo y Hernández Ávila Mauricio, (2000). *Cáncer Cérvico Uterino diagnóstico, prevención y control*. Editorial medica panamericana. México, 254.

Alvarado Moreno José Antonio (1997). *Presencia de la cadena alfa y beta del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico*. Tesis de Licenciatura. México, D.F; FES Zaragoza, UNAM.

Alvarado Moreno José Antonio (2001). *Determinar la presencia de c-kit en células de CaCU y su papel en la activación de la IL-2*. Tesis de Maestría, México, D.F; FES Zaragoza, UNAM.

Amezcu Bernal Selene, Figueroa Robles Víctor Hugo, Ansaldo María Luisa Arreygue García Naela Alejandra, Albarran Somoza Benibelks y Daneri Navarro Adrian (2006). *Tipificación de virus del papiloma humano (VPH) en pacientes con cáncer cervicouterino y lesiones precursoras procedentes del centro médico de occidente*, *Bioquímica*, 31:77-77.

Anderson P y Sorenson M (1994). *Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2*. *Clin Pharmacokinet*, 27(1):19-31.

ATCC: The Global Bioresource Center; <http://www.atcc.org>. 2008.

Bañuelos Adriana, Reyes Elba, Ocadiz Rodolfo, Álvarez Elizabeth, Moreno Martha, Monroy Alberto y Gariglio Patricio (2003). *Neocarzinostatin Induces an Effective p53-Dependent Response in Human Papillomavirus-Positive Cervical Cancer Cells*. *México*, 306(2):671-680.

Bermúdez Morales Víctor Hugo, Peralta Zaragoza Oscar y Madrid Marina Vicente (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública de México*, 47(6):458-468.

Boni L, Batenjany M, Neville E, Guo Y, Xu L, Wu F, Mason J, Robb R y Popescu M (2001). Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *Elsevier Science B.V*, 1514:127-138.

Cáceres C. R, Alvarado M. J, Waga K, Rangel C. R, Monrroy G. A, Rocha Z. L, Urdiales R. J, Weiss S. B y Haman A (2001). Implication of tyrosine kinasa receptor and steel factor in cell density dependent growth in cervical cancer and leukemias cancer research, 51:6281-6289.

Castellanos Morales Martha Rocío (2004). El virus del papiloma humano y el cáncer cervicouterino. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 47(1):35-36.

Chang Ysis, Martínez Margarita y Nápoles Miguel (2006). Manejo de las adolescentes con neoplasia intraepitelial cervical. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(1):1-15.

Chávez García Víctor Manuel, Zonana Nacach Abraham y Duarte María Eugenia (2007). Autopsia verbal en cáncer cervicouterino. *Revista Médica del IMSS*, 45(2): 199-204.

Consuegra Mayor Claudia Patricia, Molina Ocampo Diana, Egea Eduardo y Garavito de Egea Gloria (2004). El virus del papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical, 19:3-13.

Cruz Evelio Cabezas (1998). Conducta Frente a La Neoplasia Intraepitelial Cervical (Nic). *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 24(3):156-165.

De Vita Vincent, Hellman Steven Samuel y Rosenberg (1989). *Cáncer Principles and practice of oncology*, 4a edition, Lippincott company, Philadelphia Toronto, 1168-1181.

Dell Ghislaine, Wilkinson W y Tranter R (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a Non-oncogenic Human Papillomavirus. *Journal of Molecular Biology*, 334(5):979-991.

Flores Marroquin Carolina (2000). Estudio de la hidrocortisona sobre la expresión de moléculas clase I del MHC y del procesamiento antigénico en líneas celulares de cáncer cervical positivas y negativas al HPV.

Frías G y Zentella D (2005). Caracterización de la adhesión de células metastásicas humanas a cultivos endoteliales humanos activados por factores derivados de células tumorales. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. Oaxaca México.

García Noriega José y Noriega Limón José (2008). El tratamiento actual del cáncer cervicouterino. Revista Ginecología y Obstetricia de México, 76(2):131–139.

Hassuneh M, Nagarkatti P y Nagarkatti M (1997). Evidence for the participation of Interleukin-2 (IL-2) and IL-4 in the regulation of autonomous growth and tumorigenesis of transformed cell of lymphoid origin. Blood, 89:610–620.

Kendall A. Smith, Helen L. Henry y Anthony W. Norman (2002). Interleukin 2 (IL-2), of encyclopedia of hormones. Division of Immunology, Departamento of Medicine Weil Medical College of Cornell University, New York, NY, 1:7

Hernández J, Corona O, Ibáñez H, Baeza R, Leyva S, Weiss S y Rancel C (2005). Caracterización de liposomas catiónicos como acarreadores de interleucina 2 (IL2). Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.

Palsson Bernhard, John R. W y Masters (1999). Human Cell Lines, Cancer Cell Lines Part 2, Kluwer Academic Publishers, (2)55–69.

Kaplan D (1996). Autocrine Secretion and physiological concentration of cytokine, 17:304–315.

Lazcano E, Najera A, Lonso R, Buiatti E y Hernandez A (1996). Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. Revista Instituto Nacional de Cancerología, 42:123.

Maczy González Rincón, Arteaga de Vizcaíno Melvis. Medina Ana Ruiz y Weir Medina Jesús (2007). Interleucina 2 y su receptor soluble en cirugía. Universidad del Zulia (Luz) Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Condes (Venezuela), Revista Cubana, (1)46.

Margani Anibal R (1996). Inmunología a Inmunoquímica, 5ª ed. España, Panamericana, 240–244.

Marie Knaul Felicia, Arreola Ornelas Héctor, Velázquez Enrique, Dorantes Javier, Méndez Óscar y Ávila Burgos Leticia (2009). El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. Salud pública de México, (51)286–295.

Martínez M Francisco Javier (2004). Epidemiología del cancer del cuello uterino Medicina Universitaria, 6(22):39–46.

Meager A (1991). Cytokines, Prentice Hall Advanced Referente Series. New Jersey. USA, 14–109.

Monroy Garcia A, Weiss Steider B, Hernandez Montes J, Ortiz Navarrete, Bañuelos Panuco, Acosta Araujo, Diaz Quiñonez, Lopez Graniel, Granados Herbert J, López Silva y Mora Garcia L (2002). Identification of two homologous antigenic peptides derived from L1 HPV-16 and 18 proteins specific for the HLA-B*3901 allele. Arch Virol México, (147)1933–1942.

Monroy García Alberto (1991). Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico uterino en presencia de interlucina-2 recombinante humana. Tesis de Maestría México, D.F; ENEP, Zaragoza - UNAM.

Montoya Fuentes H, Suárez Rincón A, Ramírez Muñoz, Arévalo Lagunas, Morán Moguel, Gallegos Arreola, Flores Martínez y Rosales Quintana (2001). Ginecología y Obstetricia de México, 69(4):137–146.

Morgan D, Ruscetti F y Gallo R (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal bone marrows. Science, 193:1007–1008.

Murillo Vitelio Velasco (2001). El cáncer cervicouterino. Revista Medica del IMSS, 39(6):509–517.

Nápoles Miguel R y Sarduy (2008). Neoplasia Intraepitelial Cervical. Preámbulo del cáncer cérvicouterino. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología, 34(2):24–31.

Panduro Arturo, Armendáriz Borunda J, Ramírez Bastidas B y Castro Chávez F (2000). *Biología Molecular en la clínica*. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana. México, 23-29.

Pontén J, Adami O, Bergstrom R, Dilliner J, Friberg G, Gustafsson L, Miller B, Parkin M, Sparen P y Trichopoulos D (1995). Strategies for global control of cervical cancer *int. J. cancer*, 60:1-26.

Rangel Corona R, Rodríguez Cruz, Flores Flores, Gómez Ruiz, Soto Cruz, Mendoza Rincón y Weiss Staidler (1998). Differential expresión of the two components of the interleukin-2 receptor in cervical cáncer cell ed. Monduzzie, editor Italy, (3):1239-1243.

Regueiro González J, López Larrea, González Rodríguez, Martínez Naves y López Vázquez A (1996). *Inmunología biología y patología del sistema inmune*. Editorial medica panamericana. Madrid España, 178.

Regueiro González J, López Larrea, González Rodríguez, Martínez naves y López Vázquez A (2002). *Inmunología biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. Editorial medica panamericana. Madrid España, 217.

Rocha C, Acevedo Álvarez, De la Rosa, Zafra G. Navarro, Álvarez M y Gariglio P (2007). Microarreglos de ADN y cáncer cervicouterino: identificación de marcadores tumorales. *Ginecología y Obstetricia de México*, 75(4):205-213.

Rocha Zavaleta Leticia, Mora Garcia Maria de Lourdes, Fernando Cruz Talonia, Hernandez Montes Jorge, Weiss Steider Benny, Ortiz Navarrete Vianney y Monroy Garcia Alberto (2004). Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *Journal of General Virolog México*, 85:2643-2650.

Rojas Espinosa (2001). *Inmunología de memoria*. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, 34(56):134-189.

Spinelli Osvaldo M y Altamirano Eugenia M (2003). Efecto citopático por el virus del papiloma humano (HPV), *Revista Facultad de ciencias Médicas, Buenos Aires Argentina*, 1(1):40-41.

Tirado Gómez Laura Leticia, Mohar Betancourt Alejandro, López Cervantes Malaquías, García Carrancá Alejandro, Franco Marina francisco y Borges G (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres Mexicanas. *Salud Pública de México*, 47(5):342–350.

Torres Guaneros C (2000). Las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL secretan las citocinas IL-2, IL-3, IL6, en la fase G1 del ciclo celular, y estas citocinas son utilizadas por ambas líneas para inducir su proliferación. Tesis de Licenciatura. México, D.F. FES Zaragoza, UNAM.

Tovar Guzmán Víctor José, Contreras Fernando Ortiz, Jiménez Gauna Francisco R y Vázquez Valencia Guillermo (2008). Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México (1980–2004). *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 51(2):47–51.

Valdespino Gómez Víctor M y Valdespino Castillo Victor E (2004). Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes con cáncer cervicouterino. *Ginecología y Obstetricia de México*, 72(1):29–38.

Valle Mendiola Arturo (2000). Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL en comparación con linfocitos normales Tesis de licenciatura. México, D.F. FES Zaragoza, UNAM.

Vella T, Dow S, Potter A, Kappler J y Marrack P (1998). Cytokine-induced survival of activated T cell in vitro and in vivo. *Immunology*, 95(7):3810–3815.

Weiss S y Valle M (2003). *Molecular Origin of cancer*, Vertientes, 6:3–7.

Wyke J. A (1986). Viruses and cancer in, *Introduction to the cellular molecular biology of cancer* Franks, L. M, Feich Editors ox v.k, 3–20.

APENDICE 1

LISTA DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

- RPMI-1640/10% SFB
- Solución Fisiológica de Verseno
- H₂O bidestilada
- H₂O libre de RNAsas
- Alcohol isoamílico
- Alcohol Isopropílico
- Trizol
- Cloroformo
- Etanol 70%
- PBS
- Gel de Agarosa 1.5%
- Buffer de carga 6X
- Marcador de peso molecular 100 -700 Pares de bases (pb)
- Enzima MMLZ RT
- Enzima Taq Polímerasa
- DNTP'S (5 y 10 mM)
- Amortiguador 5X y 10X
- DTT
- Oligo DT
- Primers (IL-2, β -actina)
- Bromuro de etidio
- TBE 10X, 1X y 0.5X

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Reactivos para (RT)

Amortiguador 5X (Invitrogen)
DTT 0.1M (Invitrogen)
Enzima MMLV-RT (Invitrogen)
DNTP´S 5mM (Fermentas)
Oligo dT (Promega)

Reactivos de (PCR)

Amortiguador 5X Green GoTaq
(Promega)
DNTP´S 10 mM (Fermentas)
Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L
(Promega)
Primers (Invitrogen)

Primers

β -actina (1:10)
IL-2 (1: 5)

Reactivos para electroforesis

Agarosa (Invitrogen)
Gel de agarosa al 1.5%
Marcador de peso molecular
100-700 pb (promega)
Buffer de carga Blue/Orange 6X
(promega)

Soluciones

RPMI-1640/10% SFB
Solución fisiológica de verseno
Tripsina
H₂O libre de RNAsas
Alcohol isopropanol
Trizol
Cloroformo
Etanol 70%

DNTP'S (MIX)

Todos los DNTP'S se encuentran en una concentración de 100mM, se tuvieron que diluir 100µL de cada uno en 600µL de agua libre de RNAsas para que quedara un mix de los cuatro DNTP'S a una concentración de 10Mm.

DCTP 10 mM

DATP 10 mM

DTTP 10 mM

DGTP 10 mM

600 µl de agua libre de RNAsas

TBE 10X

108 gramos de Tras base

55 gramos de Acido bórico

40 mililitros de EDTA 0.5 M

Nota: llevar a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Guardar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M

186.1 gramos de EDTA

1000 mililitros de agua destilada

Nota: El EDTA se afora a 1 litro de agua destilada y llevar a pH 8

TBE 1X

100 mL TBE 10X

900 mL H₂O destilada

Medir el pH 8.0 (use NaOH ó HCl para regularlo). Nota: Guardar a temperatura ambiente ó a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

TBE 0.5X, pH 8.0

500 mL TBE 1X

500 mL H₂O dd

Mida el pH 8.0 (use NaOH ó HCl para regularlo).

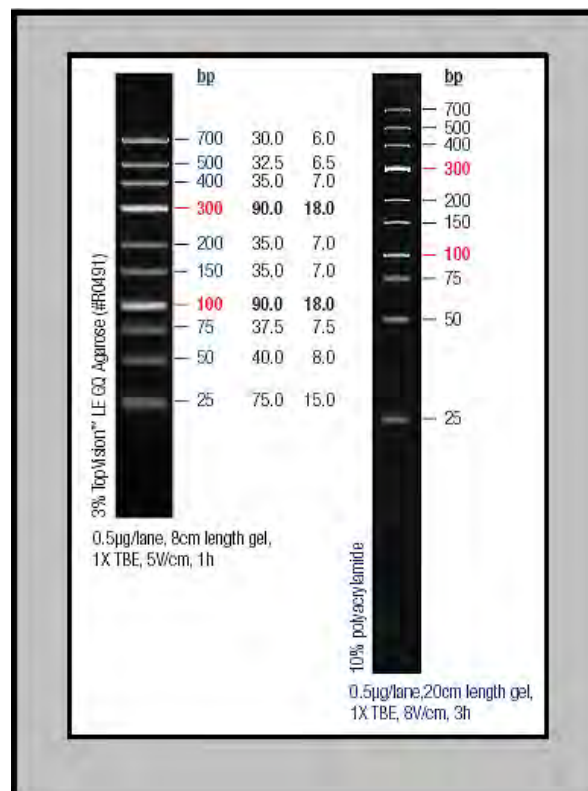
Gel de agarosa 1.5 %

1.5 gramos de agarosa en 100 mililitros de TBE 1X

Escalera

Marcadores de pesos moleculares ó escalera, utilizados en la electroforesis

Marcador de peso molecular 25 -700 pb (Fermentas): 1 μL marcador, 1 μL buffer de 6X blue green,



APENDICE 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Desactivación de suero fetal bovino (SFB)

La botella de suero fetal bovino (SFB), (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en un baño maría a 56°C durante 30 minutos, con el propósito de eliminar algunas proteínas de bajo peso molecular como son las proteínas del complemento, así como inactivar otras para mayor eficacia en la nutrición celular, posteriormente se prepara en alícuotas de 50 ml para mejor manipulación, conservándose a una temperatura de 4°C.

Solución Fisiológica de fosfatos y/o Verseno

Se emplea para despegar células tumorales adherentes y funciona como un agente quelante que secuestra iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizaron los siguientes reactivos.

3.04 gramos de Tris base (Sigma, Chem, USA)

8.00 gramos de Cloruro de sodio (Sigma, Chem, USA)

0.40 gramos de Cloruro de potasio (Sigma, Chem, USA)

0.20 gramos de Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) (Sigma, Chem, USA)

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

Soluciones enzimáticas. Cuando las células se adhieren fuertemente a la superficie de cultivo se requiere de una solución de Tripsina al 0.25% esta solución debe ser preparada en solución fisiológica de verseno, para tener una actividad más fuerte.

Solución de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio (Sigma, Chem, USA) 8.0 gramos

Fosfato de sodio monobásico (Sigma, Chem, USA) 2.88 gramos

Fosfato de potasio (Sigma, Chem, USA) 0.4 gramos

Cloruro de potasio (Sigma, Chem, USA) 0.20 gramos

Nota: El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 N, se afora a 1L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Azúl tripano. Es un colorante que se incorpora en el citoplasma celular cuando la célula se encuentra dañada en su membrana, se utiliza comúnmente para determinar la viabilidad celular. Comercialmente es disponible en solución al 0.4% y se prepara en proporción 1:1.

Dimetil Sulfóxido. Es un solvente orgánico que se utiliza para criopreservar las células en una proporción 1:10 con suero fetal bovino.

Criopreservación. Con el fin de tener células tumorales disponibles para subsecuentes experimentos, se utilizó la técnica de criopreservación, la cual consiste en utilizar las células en fase exponencial, sin llegar a la saturación, las cuales fueron removidas de la superficie dejándolas con 5 ml de verseno por 5 minutos en la incubadora posteriormente se vaciaron a un tubo (Falcon, U.S.A.) para centrifugar a 1500 rpm, una vez obtenido el botón celular se coloca 900ml de SFB y 100ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (sigma Chemical Co.U.S.A.) y con el pipetero se toma el botón celular t se coloca en pequeñas ampolletas (Cooke Laboratory Products, U.S.A.) de 1ml y se congelaron inicialmente a -70°C para posteriormente ser introducidas en nitrógeno líquido a 190°C para su preservación indefinida.

