



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Determinación de la expresión de ARNm para  
caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas  
celulares de Cáncer Cérvico Uterino: HELA, INBL  
y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes  
tiempos**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**  
**ANA LUZ MARTÍNEZ FERNÁNDEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA**



**OCTUBRE 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **MARTÍNEZ FERNÁNDEZ ANA LUZ**, con número de cuenta **301698344**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **18** del mes de **octubre** de 2011 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. C. RAÚL ZAVALA CHAVERO

VOCAL M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA

SECRETARIO DRA. ELIA ROLDÁN REYES

SUPLENTE DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Determinación de la expresión de ARNm para caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de Cáncer Cervico Uterino: HELA, INBL y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes tiempos.**

Opción de titulación: tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 13 de septiembre de 2011.

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ  
JEFE DE CARRERA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en la UIDCC en el laboratorio de oncología celular L-4 PB, de la Unidad multidisciplinaria de investigación experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM". Dirigido por la M. en C. Rosalva Rangel Corona y asesorado por el Dr. Benny Weiss Steider.

Durante la realización del presente trabajo se conto con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, mediante el programa de becas para tesis de licenciatura, convenio: IN-220108

MÉXICO D.F. OCTUBRE DEL 2011

# AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y directora de tesis, la M. en C. Rosalva Rangel Corona por el tiempo dedicado, ayuda, apoyo y sugerencias para la elaboración de este proyecto y toda mi estancia en el laboratorio, la estimo y admiro.

Al Dr. Benny Weiss Steider

A los miembros del jurado: M. C. Raúl Zavala Chavero, Dra. Elia Roldán Reyes, Dr. Juan José Rodríguez Mercado, Biól. Reynalda Roldán Pérez por su tiempo, sugerencias y contribuciones para la elaboración de este escrito.

A Itzel Del Río Ortiz por compartirme y trasmitirme sus conocimientos y experiencias en el trabajo experimental, así como a la Dra. Teresa Corona, Arturo Valle, Octavio Zerón y Evelin Nieves por su valioso conocimiento y consejos dados.

Al Sr. Don José Chavarría por la convivencia y el mantenimiento de los materiales del laboratorio.

A todos mis amigos del laboratorio: **Tania, Leo, Chéncho, profe Juan Carlos, Dany, Edith, José Luis, Karla, Miriam, Edgar** y aquellos más que han pasado por el IL-4: **Anayeli, Cintia, Marlene, Beca, Robert, Rodrigo**, gracias por hacer de esta estancia amena y llena de aprendizaje, risas y aventuras dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos de la carrera: **Chio, Beca, Gaby, Comis, Lalis, Karlita, Norma, Mike, Perla**, a los chicos del cubo **Memo, Chuy y Javier** por vivir momentos inolvidables con cada uno de ustedes llenos de felicidad a lo largo de esta maravillosa experiencia llena de historias que contar.

A mis amigas de toda la vida: **Indira, Eva, Edna y Jacky** por conservar nuestra amistad y acompañarnos en este gran camino.

Gracias Dios por llenarme de oportunidades y permitirme haber llegado hasta este momento de mi vida.

# DEDICATORIAS

Con todo mi amor a mis padres: María de los Ángeles Fernández y Celso Martínez, por forjar a la persona que ahora soy, gracias por su inmenso amor que hizo romper obstáculos para darme lo mejor de ustedes para mi educación y en todas las formas posibles, gracias por crecer en mi respetando mis decisiones, por su comprensión y apoyo sin condición ni medida y por abrirme camino a la vida, siempre estaré infinitamente agradecida con ustedes, los amo.

A mi hermano Juan Carlos, gracias por existir, mi vida no hubiera sido igual sin ti, aunque a veces no compartamos muchas palabras sé que estoy en tu corazón y tú en el mío, siempre has sido mi ejemplo a seguir, te quiero y admiro.

A Diana, cuñada y amiga, gracias por tu apoyo, consejos y ánimos, haber que día me invitas un pollo a la Diana.

A mi sobrino Santiago que adoro y llena de alegría a todos los integrantes de esta familia, gracias por traernos una gran bendición a nuestras vidas.

A mi amado Javi por tu amor incondicional, respeto y apoyo en momentos alegres y difíciles que nos hicieron crecer como personas, gracias por comprender siempre mis necesidades, darme mi espacio y ánimos para cumplir mis metas, me siento afortunada de tenerte a mi lado, soy muy feliz contigo, te amo.

---

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	3
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>MARCO TEÓRICO</b>	
Cáncer.....	8
Cáncer Cérvico Uterino.....	9
Citocinas.....	12
Interleucina 2.....	14
Apoptosis.....	17
Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis.....	20
Vías de apoptosis.....	23
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares.....	29
<b>MATERIAL Y MÉTODO.</b>	
Material biológico.....	30
Método experimental.....	31
Proliferación de líneas celulares.....	31
Cultivo de células en presencia de IL-2.....	31

---

Cultivo de células en presencia de DMSO.....	32
Obtención de ARN Total.....	32
Cuantificación de ARNm.....	32
Retrotranscripción.....	33
Reacción en cadena de la polimerasa.....	34
Electroforesis.....	36
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1: Reactivos y soluciones.....	66
Anexo 2: Preparación de reactivos y soluciones.....	68

---

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>CaCU</b>	Cáncer Cérvico Uterino
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleótidos de trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>MMLV R-T</b>	Retrotranscriptasa del virus de leucemia murina
<b>NK</b>	Células asesinas naturales ( <i>Natural Killer</i> )
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RPMI-1640</b>	Medio de cultivo celular RPMI-1640
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>Rx</b>	Reacción
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TBE</b>	Amortiguador tris ácido bórico-EDTA
<b>UIDCC</b>	Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer
<b>UI/mL</b>	Unidades internacionales por mililitro
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano

## RESUMEN

En México el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) ocupa el segundo lugar, en frecuencia, entre las neoplasias malignas femeninas. Por esta razón, actualmente diferentes grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para este tipo de cáncer, una de ellas es el uso de citocinas, como interleucina 2 (IL-2), que juega un papel importante en la respuesta inmunológica de rechazo tumoral. Recientemente se ha descrito el papel de esta citocina en la regulación de la proliferación de células no hematopoyéticas tanto normales como tumorales. En particular en el CaCU se ha reportado que IL-2 tiene un efecto positivo o negativo sobre la proliferación celular dependiendo de la concentración usada, por lo cual es importante determinar la dosis a emplear si se desea usar como tratamiento terapéutico.

Al respecto nuestro equipo de trabajo ha demostrado que a 10 UI/mL IL-2 induce la proliferación de células de CaCU, mientras que a 100 UI/mL IL-2, inhibe la proliferación e induce la muerte de células de CaCU. Sin embargo se desconoce si dicha muerte es inducida por apoptosis.

La muerte por apoptosis es mediada por un grupo de enzimas de degradación, denominadas caspasas, cuya activación es crucial para desencadenar la cascada de señalización que finaliza con la degradación del ADN y la presencia de cuerpos apoptóticos característicos del proceso apoptótico.

Por esta razón, en el presente trabajo se determinó, por medio de la técnica RT-PCR, la expresión del ARN mensajero (ARNm), para caspasa 9 y 3 en las líneas de CaCU; HELA, INBL y CALO cultivadas a 5, 10, 15, 20, 30 min; 1 y 2 hrs; 1, 2 y 3 días, en presencia de 100 UI/mL de IL-2. Para determinar si IL-2 regula la expresión del mensajero para las caspasas 9 y 3 en función del tiempo de cultivo en presencia de esta citocina.

Nuestros resultados indican que 100 UI/mL de IL-2 interviene en la regulación de los mensajeros para caspasa 9 y 3, ya que las células cultivadas con esta citocina presentan mayor producto de amplificación para caspasa 9, lo cual indica que IL-2 activa la síntesis de caspasa 9 y esta a su vez induce la síntesis de caspasa 3. Los resultados de este trabajo proporcionan información sobre las condiciones de un modelo de inducción de muerte por apoptosis, regulado por IL-2, en células de CaCU.

Asimismo, demostramos que la susceptibilidad de las células a IL-2 depende del estadio del tumor. En donde, las células de estadios tempranos son más vulnerables al efecto de IL-2 por lo cual, este tipo de tumores serían mejores candidatos para recibir una terapia con la citocina.

Esta información es relevante ya que este modelo de inducción de apoptosis se puede proponer como una alternativa terapéutica para pacientes con CaCU.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es el conjunto de enfermedades, se caracteriza por el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión generando metástasis. Todos los tipos de cánceres comparten esta característica en común, entre estos se encuentra el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU), que es una alteración celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino. Este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo.

En los últimos años se han administrado tratamientos con diversas citocinas (interferones e interleucinas), que tienen como objetivo principal aumentar la respuesta inmunológica del paciente para eliminar el crecimiento tumoral, con lo cual se proporciona una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

Al respecto una investigación previa llevada a cabo por Alvarado Moreno en 1997, donde evaluó el papel de IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL, demostró que el efecto de esta citocina, sobre la proliferación de las células de CaCU, depende de la concentración usada, ya que a altas concentraciones (100 UI/mL) se presenta una inhibición de la proliferación, mientras que a baja concentración (10 UI/mL) las células responden positivamente a la proliferación. Asimismo, menciona que la respuesta de inducción o inhibición de la proliferación de las células es regulada por el tiempo que están en presencia de la citocina. (Alvarado, 1997).

Datos recientes de Del Rio Ortíz 2010, indican que IL-2, además de inhibir la proliferación también induce a muerte a las células de las líneas e CaCU CALO e INBL. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual ocurre dicha muerte.

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la regulación del ARNm para caspasa 9 y 3, enzimas involucradas en la muerte por apoptosis, en células de las líneas HELA, INBL y CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos. Se trabajo con estas caspasas ya que caspasa 9 (iniciadora) es indispensable para la formación del apoptosoma que conlleva a la activación de caspasas 3 (ejecutora) responsable de inducir la fragmentación del ADN.

Para ello se utilizó la técnica de RT-PCR en la cual se aisló ARNm de células de CaCU, el cual fue retrotranscrito usando la enzima transcriptasa reversa obteniendo como productos el ADN complementario (ADNc) que se utilizó para llevar a cabo la amplificación de los genes para caspasa 9 y 3, por la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR; de sus siglas en inglés) para obtener los productos de amplificación para cada una de las caspasas mencionadas.

## MARCO TEORICO

### Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades, en las cuales el organismo produce un crecimiento anormal y diseminado de células cancerígenas que al desarrollarse en forma incontrolada avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alternando así el funcionamiento del organismo (Alonso, 2000). El termino cáncer se usa de manera común para designar a todos los tumores malignos, en estos últimos las células normales se transforman en células cancerosas por la adquisición de mutaciones, las cuales acarrear como consecuencia el daño del genoma. Este daño puede ser el resultado de un proceso endógeno ó por ataques exógenos (Martínez, 2004).

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, contaminación, alimentación), físicos (como las radiaciones ultravioleta) y biológicos (principalmente por virus y bacterias). Algunos de ellos principalmente los agentes químicos y físicos, junto con el envejecimiento y procesos inflamatorios, ocasionan daño al material genético a través de la generación de radicales oxidantes (Graham *et al.*, 2006). Un tumor maligno es capaz de invadir los tejidos adyacentes y diseminarse por todo el organismo a través del sistema linfático ó vascular mediante un proceso denominado metástasis; esta capacidad del tumor es el principal problema para su erradicación (Frías y Zentella, 2005).

La acumulación de alteraciones genéticas, en la que se incluyen la inactivación de genes supresores de tumores, la activación de oncogenes, cambios en los mecanismos de apoptosis y la adhesión celular, contribuyen a la base molecular para la progresión del cáncer (Archibal, 1997).

Efectivamente, todos estos cambios que conllevan la transformación neoplasica tienen una causa genética, es decir aparecen cuando ocurren alteraciones, que no son

corregidas, en los genes. Para que la célula mantenga sus características normales los genes deben funcionar de manera ordenada y regulada, si alguno de estos genes se altera en su estructura ó función ocurre su pronta detección y reparación, usualmente a través de proteínas codificadas por otros genes. Algunas veces estas alteraciones en los genes activos no son detectadas y los genes afectados dejan de funcionar ó funcionan de una manera anormal, produciendo cantidades anormales de proteínas, ó produciendo proteínas anormales sin actividad fisiológica definida (Panduro *et al.*, 2000). Este funcionamiento anormal de los genes caracteriza a las células cancerosas (Peto, 2001). Una vez que la célula cancerosa ha perdido sus mecanismos de regulación normales la célula prolifera generando una clona de células anormales; estas células continúan reproduciéndose llegando a formar un tumor (Rojas, 2001). Tal es el caso del Cáncer Cérvico Uterino que es un grave problema de salud pública en el México.

### **Cáncer Cérvico Uterino (CaCU)**

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es una alteración celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino o cérvix que es la abertura del útero o matriz que a la vez se conecta con la vagina. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa; evolucionando a cáncer *in situ*, en grado variable, cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando las células modificadas traspasan la membrana basal del tejido epitelial, salen de los vasos sanguíneos y colonizan nuevos tejidos (Figura 1) (Ministerio de Salud, 2004). Se reconocen dos tipos histológicos principales: el epidermoide, espinocelular o de células escamosas, y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical (Alonso, 2000).

El CaCU, es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, pues se estima que produce alrededor de 231,000 muertes por año, 80% de las cuales ocurre

---

en países en vías de desarrollo, presentándose como la primera o segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres. La incidencia mundial en el mundo es de 466,000 casos nuevos con un estimado de 370,000 casos en países en vías de desarrollo (Tovar *et al.*, 2008). En México, se ha mantenido como la segunda neoplasia más importante entre la población mexicana registrándose 4,000 muertes por año. Tan sólo en 2008 se registraron 4,036 con una tasa de 9.8 por 100,000 mujeres (INEGI, 2008), con edad promedio al momento del diagnóstico de 45 años, pero la enfermedad puede ocurrir incluso en la segunda década de la vida (Sánchez *et al.*, 2005).



**Figura 1. Etapas de evolución del CaCU.** El carcinoma in situ es un cáncer muy temprano, las células anormales se encuentran sólo en el exocervix. En etapas intermedias o cáncer microinvasor se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún en el cérvix y en etapas avanzadas o invasor se disemina a toda el área pélvica y alrededores e incluso a órganos distantes.

(Imagen tomada de la página <http://cancercuellouterino.com/2011/06/estadios-del-cancer-de-cuello-uterino.html>).

Estudios sobre la epidemiología del CaCU han demostrado que esta entidad se comporta como una enfermedad de transmisión sexual, y diversos factores de riesgo parecen estar involucrados en su desarrollo (Carrillo *et al.*, 2004). Los de mayor asociación son; inicio temprano de relaciones sexuales, promiscuidad, persistencia de infecciones virales y bacterianas, coinfección con otros virus, uso prolongado de

anticonceptivos orales, hábitos dietéticos, deficiencias de vitaminas A, E y C,  $\beta$ -carotenos, tabaquismo, entre otros (Mohar y Frías, 2000, López y Lizano, 2006).

Múltiples estudios epidemiológicos han concluido que el factor definitivo en la etiología del CaCU es la infección del cérvix por algunos tipos del virus del papiloma humano (VPH) (Zur Hausen, 2000). El VPH es un grupo de virus que infecta epitelios y mucosas del ser humano y se clasifica en tipos de acuerdo con homologías en su material genético (Chen y Hunter, 2005). En la actualidad, se reconocen más de 200 tipos diferentes variando el comportamiento de los mecanismos efectores según el estadio y el tipo de VPH que infecta (Tovar *et al.*, 2008).

Este virus ha sido clasificado en cepas de alto y bajo riesgo, según el grado de transformación maligna que ocasiona en la célula infectada (Vázquez *et al.*, 2005). Entre los virus de papiloma humano más comunes, los que representan al grupo de bajo riesgo incluyen a los tipos 6, 11, 42, 43 y 44 que muestran una débil asociación con CaCU, usualmente causan verrugas benignas que ocasionalmente se asocian a lesiones invasivas; mientras que los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 corresponden a los virus de alto riesgo por su gran potencial carcinogénico y que se encuentran asociados al CaCU en más de 95% de los casos (Tirado, *et al.*, 2005). El VPH-16 es el tipo que aparece, fundamentalmente, en los tumores invasivos y en los de alto grado de malignidad; el VPH-18 se relaciona con el carcinoma pobremente diferenciado y con un mayor compromiso de los ganglios linfáticos, lo cual puede variar en dependencia de la localización geográfica. Los tumores VPH-18 progresan más rápidamente que los relacionados al VPH-16 (Jastreboff, 2002).

Los virus o cualquier antígeno que invade el organismo pueden ser reconocidos y destruidos por el sistema inmune. Para que la respuesta inmune sea selectiva es decisivo que las células que intervienen en ella reconozcan con seguridad los antígenos y proteínas extraños al organismo. Por eso las células poseen receptores antigénicos sobre su superficie, así como correceptores, que facilitan este

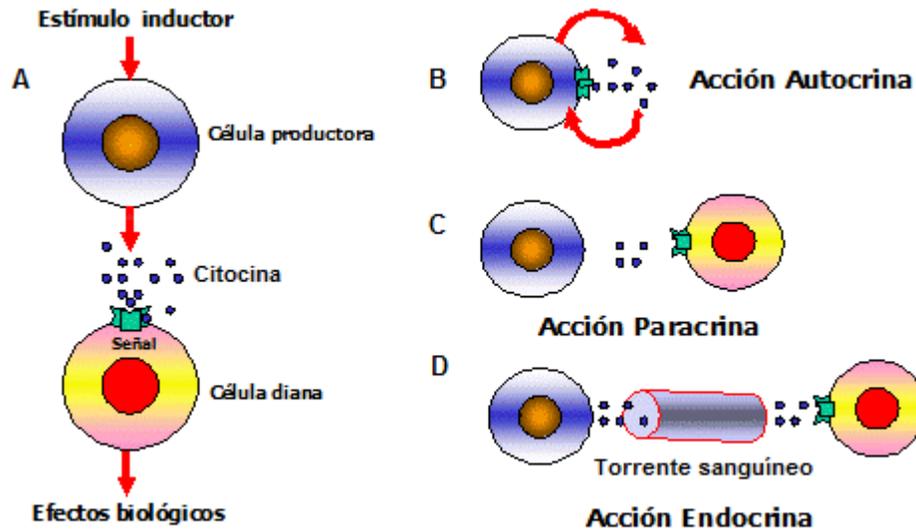
reconocimiento, desafortunadamente no todas las células tumorales son antigénicas por tanto el sistema inmune no las reconoce (Koolman, 2004). El mayor conocimiento de la inmunobiología tumoral, así como el gran desarrollo alcanzado en los métodos de manipulación de la respuesta inmune ha permitido que la inmunoterapia se proyecte como una vía promisoriosa para el tratamiento exitoso del cáncer, convirtiéndose en el cuarto pilar de tratamiento para los pacientes con cáncer, que en ocasiones se administra conjuntamente con la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La inmunoterapia puede ser pasiva no específica y consiste en la administración de elementos del sistema inmune (moleculares o celulares) procedente de otro organismo, que logran una estimulación inmunológica no antígenoespecífica en el portador de un tumor maligno, un ejemplo de células utilizadas en la inmunoterapia son células asesinas naturales (NK) activadas a matar por citocinas entre las que se encuentran IL-2, TNF, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  y factores de crecimiento hematopoyéticos (Batista, 2003).

## **Citocinas**

Muchos de los eventos de la respuesta inmune están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares que ejercen efectos específicos en sus células blanco. (Bermúdez *et al.*, 2005).

Las citocinas son sustancias solubles, péptidos o glicoproteínas con bajo peso molecular desde 5 hasta 70000 Da, constituidas por 120 - 180 aminoácidos pueden secretarse ó permanecer unidas a la membrana celular. Ellas actúan como moléculas de señalización a muy bajas concentraciones a niveles de nanogramos o picogramos. Algunas citocinas funcionan como hormonas del sistema inmunológico local. Sin embargo, las de mayor importancia clínica actúan a nivel sistémico sobre receptores específicos como factores pleyotrópicos, es decir, que tienen efecto sobre diferentes tipos celulares en los que inducen múltiples efectos contradictorios (Rangel, 1999).

Las citocinas ejercen efectos específicos en sus células diana y actúan de diferentes formas (Figura 2), autócrina al modular la actividad celular (cuando la propia célula productora es a la vez diana), de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares (cuando la célula productora y la célula diana son distintas), ó de manera endocrina (cuando de la célula productora viaja por el torrente sanguíneo hasta su célula diana) (Regueiro *et al.*, 2002).



**Figura 2. Acciones de las citocinas.** (A) Las citocinas regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico de su célula diana generando cascadas de señalización celular que dan como resultado efectos biológicos. De acuerdo a sus funciones se clasifican en (B) autócrina, si la citocina actúa sobre la célula que la secreta; (C) parácrina, si la acción se restringe al entorno inmediato del lugar de secreción y (D) endocrina, si la citocina llega a regiones distantes del organismo mediante el torrente sanguíneo para actuar sobre diferentes tejidos.

(Imagen tomada de la página <http://epidemiologiamolecular.com/14/02/2009/citocinas/>).

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. Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de estímulos como estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos, infecciones o inflamación. En este contexto, las citocinas estimulan la respuesta del huésped al controlar el estrés y la homeostasis celular por lo cual el perfil de expresión de

citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune que se genere (Bermúdez *et al.*, 2005).

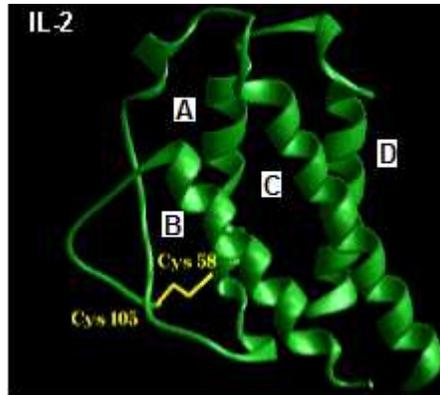
Dentro de las propiedades generales de las citocinas se encuentra la regulación de la división celular, el control del crecimiento y la diferenciación de linfocitos estimulados, la modulación de la inmunidad natural; participación en respuestas inflamatorias no específicas además de la estimulación del crecimiento y la diferenciación de células inmaduras (Meager, 1991, Regueiro *et al.*, 2002).

De acuerdo a los tipos celulares que las producen estas reciben nombres diferentes; las producidas por macrófagos (monocinas), por granulocitos (GMSFs, quimiocinas), por linfocitos (linfocinas), entre estas últimas se encuentran las interleucinas (Regueiro *et al.*, 2002).

### **Interleucina 2 (IL-2)**

La IL-2 inicialmente denominada factor de crecimiento de células T es descubierta en 1976. Su gen fue clonado en 1984 lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se han desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 (González y Grañena 1996).

La IL-2 humana es una proteína monomérica con un PM de 15.5 KDa con 133 aminoácidos, tiene una remarcada hidrofobicidad la cual es estable en pH bajo; compuesta por la unión de cuatro hélices  $\alpha$ . 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, en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula (Figura 3). IL-2 ejerce numerosos efectos inmunitarios al estimular la proliferación y síntesis de linfocina por células T, B y NK (Stites y Terr, 1994, Kendall *et al.*, 2002).



**Figura 3. Estructura tridimensional de IL-2.** Compuesta por 133 aminoácidos. Formada por la unión de cuatro hélices  $\alpha$  (A-D) contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125, en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula.  
(Imagen tomada de Arkin *et al.*, 2003)

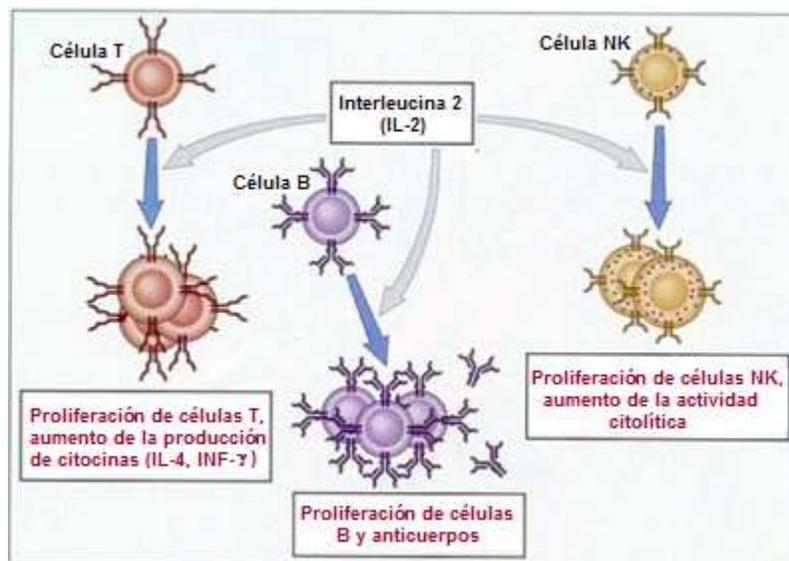
### Efectos biológicos de IL-2

La IL-2 estimula la secreción de otras citocinas y sustancias con actividad biológica que median efectos secundarios, también estimula la proliferación de todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G0 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 entre las que se encuentran IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  (Anderson y Sorenson, 1994, Hassuneh *et al.*, 1997, Kendall *et al.*, 2002).

Los principales efectos de IL-2 sobre linfocitos son:

- Estimular el crecimiento autócrino para linfocitos T e inducción de síntesis de IL-2 por las células TCD4<sup>+</sup> activadas, la cantidad de IL-2 es un determinante importante de la intensidad de las respuestas inmunitarias medidas por células T. IL-2 estimula también la síntesis de otras citocinas en células T, como IFN- $\gamma$  y IL-4 (Figura 4).

- Inducir la proliferación de las células NK (natural killer ó citotóxicas naturales) y potenciar su función citolítica, produciendo las llamadas células citotóxicas activadas por linfocinas (LAK). Las células NK, al igual que las células T en reposo, expresan IL-2R  $\gamma\beta\alpha$  y pueden ser estimuladas por niveles altos de IL-2 (Figura 4). Así, sólo concentraciones elevadas de IL-2 dan lugar a la formación de células LAK.
- Actúa como factor de crecimiento de las células B del ser humano estimulando la síntesis de anticuerpos (Figura 4).
- También puede actuar como factor de muerte para las células T activadas por antígeno, favoreciendo la apoptosis. Puede parecer paradójico que IL-2 sirva a la vez como factor de crecimiento y como factor de muerte para las células T, pero estas acciones se dan sobre las células T en diferentes estadios de diferenciación, y el efecto global de IL-2 depende igualmente de la presencia de otras señales. El fracaso en la eliminación de células mediante la muerte celular inducida por activación depende de IL-2 (Abbas *et al.*, 2004).



**Figura 4. Acciones biológicas de IL-2.** La interleucina 2 estimula la proliferación y diferenciación de los Infocitos T y B y de las células citotóxicas naturales (NK) (Tomado de Abbas *et al.*, 2004).

## Importancia médica y toxicidad de IL-2

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 (Ben, 1999).

IL-2 ha cobrado gran interés en el estudio de la biología de algunos tumores ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres (Dutcher, 2002). Ha sido utilizada sola ó en combinación con otros fármacos en la inmunoterapia adoptiva, tanto en animales como en humanos, para producir regresión de tumores en estados avanzados; donde se ha demostrado que tiene una respuesta antitumoral (Mavroukakis *et al.*, 2001). La administración sistémica de IL-2 administrada *in vivo* es sumamente tóxica. Altera vías hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios como el síndrome de goteo-capilar, fiebre, dolor de cabeza, edema, hipotensión, entre otros (Schawartzentruber, 2000, Hernández *et al.*, 2005). 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.

IL-2 se ha utilizado para inhibir la proliferación de células tumorales, en particular se ha reportado que IL-2 induce la muerte de células de CaCU (Rangel *et al.*, 2010), sin embargo, no se tiene claro si esta muerte es por apoptosis.

## Apoptosis

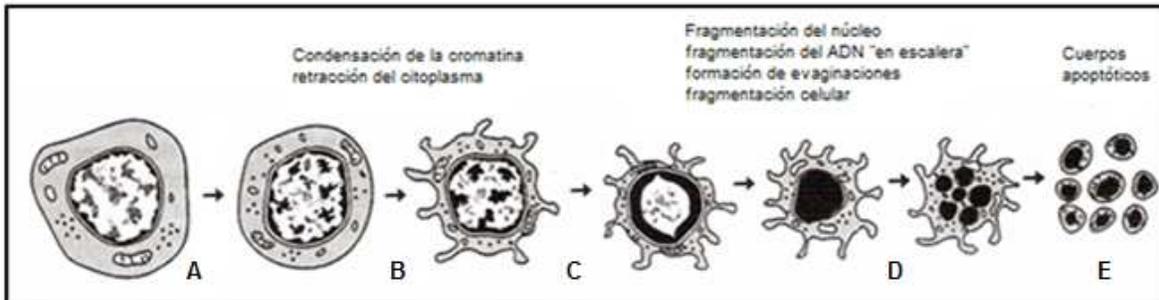
La señalización celular también regula un tipo programado de muerte celular llamada apoptosis, del griego apo-TOE-sis, que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. La apoptosis es un evento clave en muchos procesos biológicos, requiere de un gasto de energía que es necesaria para la activación de mecanismos intracelulares letales y la inactivación de mecanismos intracelulares protectores (Casadelvalle,

2006). Se presenta en células sometidas a recambio como en la embriogénesis (eliminación de membranas entre dedos de manos y pies durante su desarrollo), en la metamorfosis (reabsorción de la cola de los renacuajos), durante la involución del seno lactante, cuando hay carencia de los factores de crecimiento, por activación de los llamados receptores de muerte; en células sometidas a estrés por radiación ionizante o por compuestos químicos mutagénicos, por mencionar algunos. (Ortiz *et al.*, 2003).

En humanos adultos, la apoptosis ocurre de manera continua, por ejemplo en células infectadas por patógenos o cuando los leucocitos alcanzan el final de sus ciclo de vida. Como consecuencia de este proceso, en el cuerpo humano mueren millones de células cada minuto. Cuando las células que deberían morir por apoptosis no lo hacen las consecuencias pueden ser catastróficas (Jordán, 2003). Se ha observado que este tipo de muerte celular es vital en la homeostasis tisular porque cuando se altera se producen enfermedades degenerativas como el Alzheimer, Huntington, daño isquémico, desórdenes autoinmunes y varios tipos de cáncer. Ahora se sabe que las mutaciones en algunas proteínas que participan en la regulación de la apoptosis pueden producir cáncer; frecuentemente el melanoma se produce a partir de una mutación en Apaf-1, una proteína que participa en dicho proceso (Ortega *et al.*, 2001).

Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica, como un estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones de las moléculas de adhesión en la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmentan al ADN en segmentos específicos en múltiplos de 200 pares de bases (Becker y Kleinsmith, 2007). Asimismo, el citoplasma se condensa y se forman vesículas; denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo, retículo endoplásmico y los demás organelos celulares rodeados por membrana citoplasmática (Figura 5). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados inmediatamente por las células aledañas o por fagocitos profesionales, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material

genético queden libres entre las células. Se ha encontrado que la fagocitosis rápida de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento en la membrana celular de la N-acetilglucosamida y de la fosfatidilserina, que son señales para la fagocitosis (Enid y Diosdado, 2003).



**Figura 5. Morfología de la apoptosis.** (A) La célula individual, embebida en el tejido, pierde contacto con las células que la rodean; (B) la cromatina nuclear se condensa y fragmenta; (C) el volumen citoplasmático disminuye por pérdida de agua y condensación de las proteínas; (D) deformación de la membrana plasmática, que acaba fragmentándose y (E) la aparición de los llamados cuerpos apoptóticos que son material nuclear y citoplasmático englobado por fragmentos de membrana (Tomado de Gómez, 2003).

## Inducción de la apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células (Strasser *et al.*, 2000).

Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas como: 1) elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos; 2) moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el  $\text{TNF}\alpha$  que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas,

denominado también CD95 (Gómez, 2003). Cuando es recibida una señal de muerte celular y la gravedad del daño es tal que la célula no puede repararse, se activan mecanismos que dirigen a la muerte celular a través de un grupo de moléculas denominadas caspasas (Jiménez y Merchant, 2003).

### **Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis**

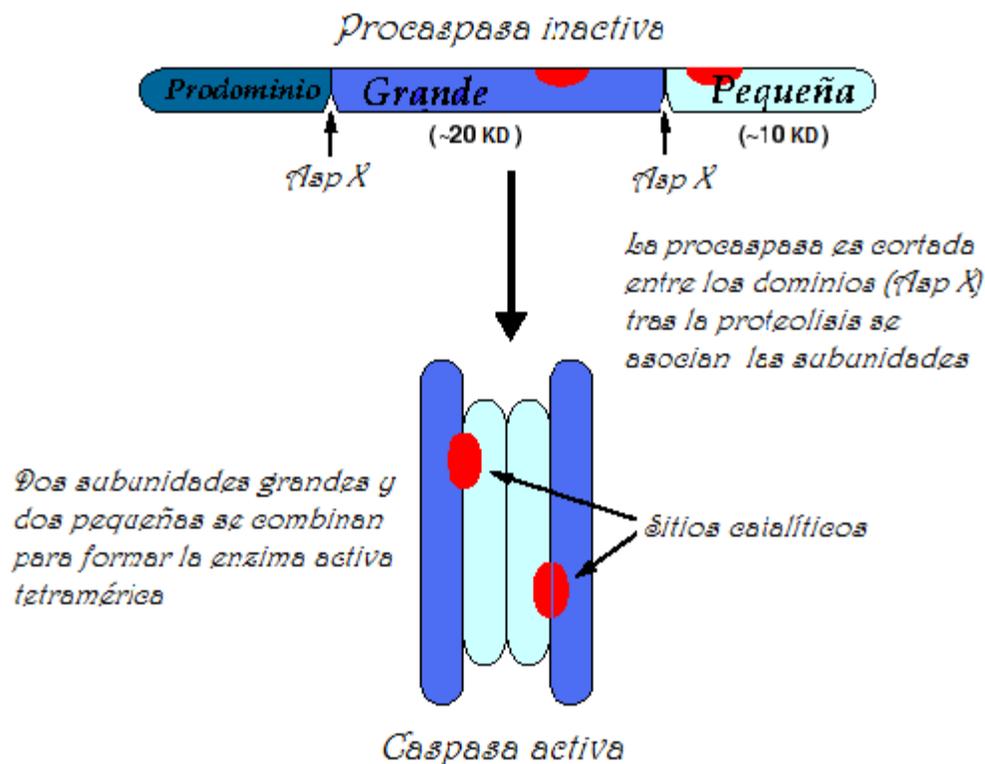
Las caspasas, son **cisteín aspartato proteasas** que se expresan como zimógenos o precursores enzimáticos inactivos. La apoptosis es medida por dos clases de proteasas especializadas, las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Para activarse necesitan de un cambio bioquímico en su estructura que lleve a conformar un centro activo donde poder realizar la proteólisis. Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo (Elinos *et al.*, 2003).

Las caspasas son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las siguientes características:

- Son cisteína proteasas específicas de aspartato porque tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (Asp) de sus sustratos que los rompen en los enlaces Asp-X.
- Son sintetizadas como proenzimas (procaspasas) que adquieren su actividad por proteólisis.
- Efectúan la proteólisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible.
- Las caspasas y sus inhibidores (IAPs <proteínas inhibidoras de apoptosis>, las proteínas miembros de la familia Bcl-2, FLIP <proteínas inhibidoras de caspasa 8>) siempre coexisten en las células normales (Cascales, 2003).

Las procaspasas contienen tres dominios: un prodominio N- terminal implicado en la regulación de la activación, una subunidad grande (20 K Da) y una subunidad pequeña (10 K Da).

La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan sus tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. Dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos independientes. Dentro de cada sitio catalítico ambas subunidades (grande y pequeña), íntimamente unidas, contribuyen a la unión del sustrato y a su catálisis (Figura 6) (Thompson, 2005).



**Figura 6. Activación de procaspasas.** Las caspasas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad larga (20 KD) que contiene el centro activo con cisteína y una subunidad pequeña (10 KD) en el C-terminal. Las caspasas cortan después de un residuo de ácido aspártico (Asp) tras la proteólisis se asocian las subunidades para autoactivarse. (Imagen tomada de la página <http://www.oocities.org/hmontoliu/caspase/caspase-1.html>).

Las caspasas iniciadoras poseen prodominios N-terminales largos. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). El DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD) y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan un importante papel en la activación de las procaspasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas (Earnshaw *et al.*, 1999).

Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos. En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas 2, 8, 9, 10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las caspasas 3, 6, 7 (Becker y Kleinsmith, 2007).

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las siguientes misiones:

- Cortar contactos con células vecinas
- Reorganizar el citoesqueleto
- Condensación de la cromatina nuclear
- Activar las endonúcleasas (fragmentación del ADN)
- Expresar señales de fagocitosis con ayuda de la fosfatidilserina. Durante la apoptosis, ocurre una pérdida de la asimetría de la membrana y por tanto descubriendo la fosfatidilserina que es el mejor marcador caracterizado para la fagocitosis de las células apoptóticas, ya que los macrófagos presentan receptores para esta proteína.
- Activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas (Howard y Xiaolu, 2000).

En el caso de las caspasas iniciadoras la 9 es la más estudiada.

## **Caspasa 9**

El mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa 9. Al contrario que en otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la procaspasa 9 tiene un efecto mínimo en su activación (Keisukek, 2000). El requerimiento clave para la activación de la caspasa 9 es su asociación con un cofactor de proteínas, Apaf-1. También, es necesario el citocromo c liberado por la mitocondria. El citocromo c y Apaf-1 se asocian en un proceso ATP dependiente. La oligomerización de Apaf-1 recluta procaspasas-9 formando el apoptosoma. La activación de la caspasa 9 es da por el reacomodo de las subunidades generadas por proteólisis de la pro-caspasa 9 (Guohua *et al.*, 2000).

Dentro de las caspasas efectoras la caspasa 3 es la más estudiada por su papel en la inducción de la fragmentación del ADN.

## **Caspasa 3**

Independiente a la vía de activación de la apoptosis, existe un componente final común, la caspasa 3. La activación secuencial de esta caspasa desempeña un papel fundamental en la fase de ejecución de apoptosis de la célula. Es esencial para algunos de los cambios característicos en la morfología celular y ciertos eventos bioquímicos asociados a la finalización de la apoptosis como es la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (Porter y Jänicke, 1999). El papel de la mitocondria en la apoptosis fue descubierto cuando se supo que uno de los factores críticos de la activación de la caspasa 3 es el citocromo c liberado por dicho orgánulo (Zheng *et al.*, 2010).

## **Vías de apoptosis**

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la

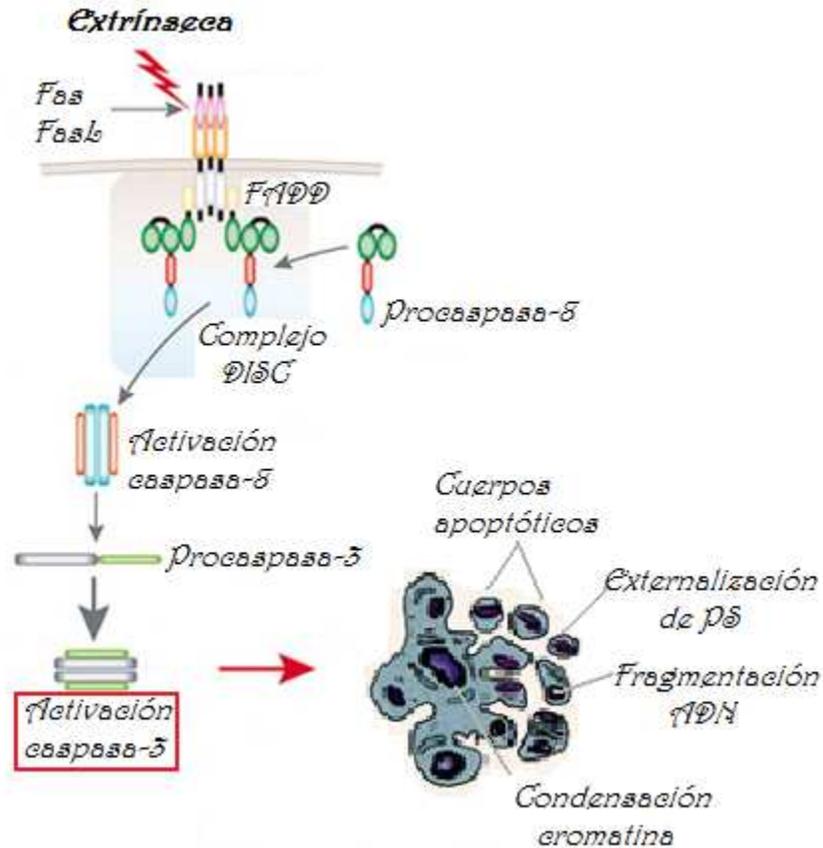
mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías, también, denominadas extrínsecas e intrínsecas, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente (De Robertis, 2000).

### **Vía extrínseca o de receptor de muerte**

Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen a TNFR1 y Fas, siendo los más conocidos. Son proteínas transmembrana que poseen un dominio receptor intracelular en el C-terminal del receptor llamado dominio de muerte (DD). Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula que los posee (Figura 7). Estos receptores juegan un papel importante en la apoptosis ya que pueden activar la cascada de caspasas en pocos segundos después de la unión de ligando y receptor (Olivier y Jürg, 2003).

La trimerización, de Fas tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. Un complejo de proteínas se asocia con Fas activado, este complejo de iniciación de señalización de muerte (DISC) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. Primero, el adaptador (FAD) se une a través de su dominio de muerte al dominio de muerte de Fas. FADD (de sus siglas en inglés Fas-associated death domain) también presenta el denominado dominio efector de muerte (DED), y de nuevo por interacciones homólogas, recluta en el DISC la procaspasa-8 que contiene un DED, después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa es liberada del DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes. La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular (Fadell y Orrenius, 2005).

Sin embargo, paralelamente, la caspasa-8 puede activar la vía apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria y activar la caspasa 9 (Figura 7) (Schafer y Kornbluth, 2006).



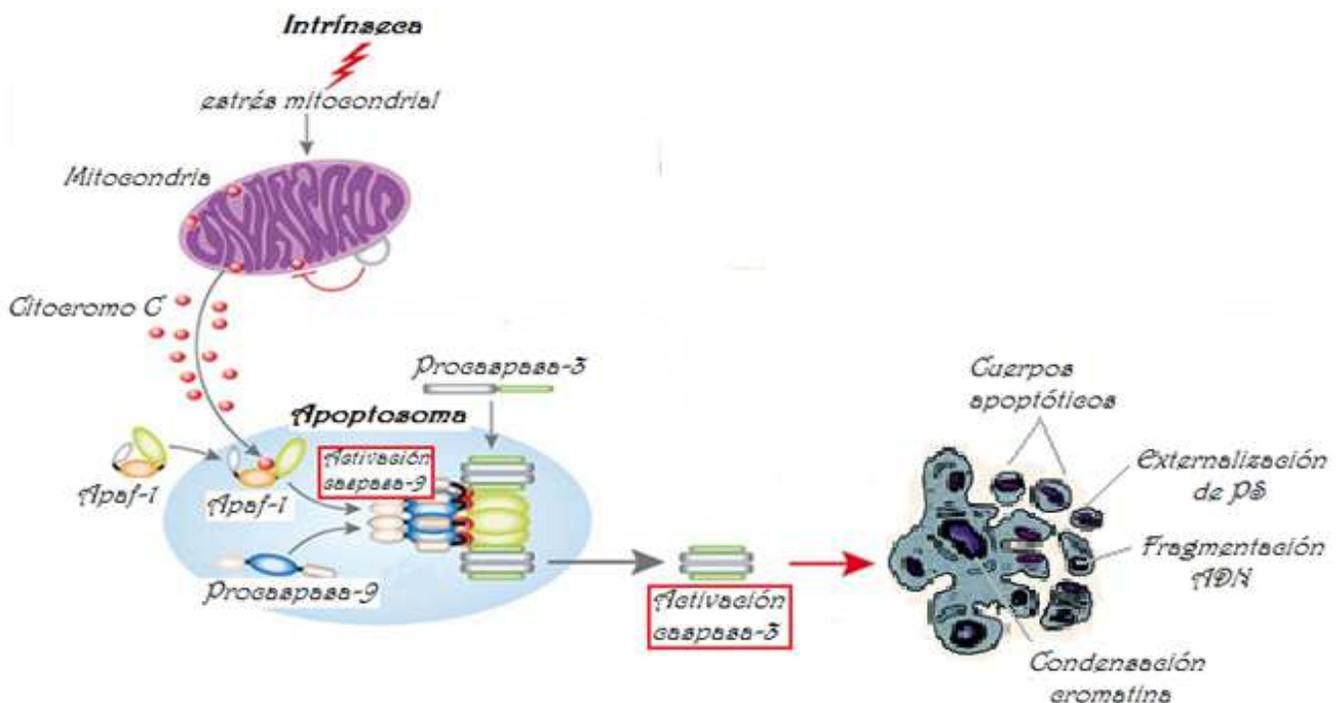
**Figura 7. Vía extrínseca o de receptor de muerte, señalando la función de caspasa 3 en el proceso apoptótico.** El FasL se une al Fas agrupando tres moléculas de Fas. Los dominios de muerte intracelulares agrupados se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico denominado FADD. Un complejo de proteínas se asocia con el Fas activado. Este complejo de señalización inductor de muerte (DISC) se forma en el segundo de los receptores trimerizados. El FADD se une a su vez al prodominio de la caspasa 8, la cual experimenta una activación autocatalítica. La caspasa-8 activa rompe la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular (Imagen modificado de Calvino y Parra, 2010).

### Vía intrínseca o mitocondrial

La vía mitocondrial se ejecuta en respuesta a señales externas y a daño en el ADN. Las distintas vías de respuesta convergen en la mitocondria, a menudo a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2. Los miembros pro y antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria donde regulan la salida del citocromo c. Si los miembros proapoptóticos ganan, una

gran cantidad de moléculas son liberadas desde la mitocondria (Olson y Kornbluth, 2001). La principal de estas moléculas liberadas es el citocromo c, que se asocia con Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) y después con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma (Riedl y Salvesen, 2007).

El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 que se encarga de ejecutar la apoptosis dando como resultado el desmantelamiento ordenado y en la muerte de la célula (Figura 8) (Yin *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Vía intrínseca o mitocondrial, señalando la función de caspasa 9 y 3 en el proceso apoptótico. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación del citocromo C, que se asocia con Apaf-1 y después con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. El apoptosoma hidroliza la procaspasa-3 a caspasa-3 que se encarga de ejecutar la apoptosis (Imagen modificada de Calvino y Parra, 2010).

## JUSTIFICACIÓN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) representa un grave problema de salud pública y es una de las causas más importantes de morbilidad, ocupando el segundo lugar entre las neoplasias malignas femeninas. Por este motivo, en nuestro país existen algunas instituciones que se dedican a estudiar las causas y factores que causan esta enfermedad, así como las posibles curas que permitan disminuir su frecuencia y eliminarlo.

Actualmente, diferentes grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para este tipo de cáncer. Al respecto el laboratorio de Oncología de la UIDCC (Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer), se estudia el efecto de IL-2 sobre la proliferación de células de CaCU, los resultados obtenidos hasta el momento, indican que al trabajar con esta citocina se debe tener cuidado con la dosis a emplear ya que nuestro equipo de trabajo ha demostrado que a bajas concentraciones (10 UI/mL) ayuda a la proliferación celular y a altas concentraciones (100 UI/mL) de IL-2 induce la muerte de células de CaCU. Sin embargo, se ignora si dicha muerte es por apoptosis, la cual se sabe es mediada por un grupo de enzimas de degradación de proteínas denominadas caspasas como la, 9 y 3. Por lo antes mencionado, en este proyecto se determinó por medio de la técnica de RT-PCR, la expresión del mensajero para caspasas 9 y 3 en células de las líneas de CaCU: HELA, INBL y CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 a 5, 10, 15, 20 y 30 min; 1 y 2 hrs; 1, 2 y 3 días. Se utilizaron cultivos a diferentes tiempos para determinar si la expresión del mensajero, regulado por IL-2, es dependiente del tiempo de cultivo.

## HIPOTESIS

Al cultivar células de CaCU, a diferentes tiempos, en presencia de 100 UI/mL de IL-2 y utilizar el ARNm de estas células y primers específicos para caspasa 9 y 3, determinaremos la regulación, por IL-2, de la expresión del mensajero para estas caspasas en función del tiempo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión del ARNm para caspasa 9 y 3 en células de la línea de CaCU HELA, INBL y CALO cultivadas en presencia de IL-2 a diferentes tiempos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Diseñar los primers específicos para caspasa 9 y 3 para la técnica de PCR
- Cultivar células de las líneas de CaCU HELA, INBL y CALO en presencia y ausencia de IL-2 a 5, 10, 15, 20 y 30 min; 1 y 2 hrs; 1, 2 y 3 días.
- Extraer, purificar y retrotranscribir el ARNm de células de las líneas HELA, INBL y CALO cultivadas en presencia y ausencia de IL-2.
- Amplificar el ADNc por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Evaluar la presencia de las caspasas por medio de electroforesis en gel de agarosa.
- Determinar el tiempo en que IL-2 regula la expresión del mensajero para caspasas 9 y 3.

## MATERIAL y MÉTODOS

### Material Biológico

- **Líneas celulares:** Se utilizaron líneas celulares de CaCU, HELA, INBL y CALO (Tabla 1) de la reserva criopreservada en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Las líneas celulares se cultivaron en medio líquido RPMI-1640 (Gibco BRL, EUA) suplementado con 10% de SFB (Gibco BRL, EUA) desactivado.

El cultivo se mantuvo en incubadora (HyClone) a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37° C y un ambiente saturado de humedad.

**Tabla 1. Líneas celulares de CaCU empleadas en el proyecto**

Línea celular	Origen	Tipo de VPH	Estadio
INBL (Inés Blanco)	Adenocarcinoma metastásico	18	IVB
HELA (Henrietta Lacks)	Carcinoma epidermoide	18	IVB
CALO (Candida López)	Carcinoma epidermoide	18	IIIB

*Monroy, 1991; Cáceres, 2001; ATCC, 2009.*

- **IL-2:** Se utilizó IL-2 recombinante (R&D systems).
- **Oligonucleótidos Invitrogen:** Se diseñaron las secuencias de los oligonucleótidos ó primers utilizados para la amplificación de cada una de las caspasas (Tabla 2).

**Tabla 2. Secuencias y tamaños de los productos de los oligonucleótidos de caspasas 3, 9 y  $\beta$ -actina.**

<i>primers</i>	<i>Secuencias sentido/antisentido</i>	<i>Pares de bases (producto)</i>
$\beta$ -actina	GGGTCAGAAGGATTCCTATG GGTCTCAAACATGATCTGGG	PB = 234
CASPASA 9	CTAGTTTGCCACACCCAGT GCATTAGCGACCCTAAGCAG	PB = 172
CASPASA 3	TTTTTCAGAGGGGATCGTTG CGGCCTCCACTGGTATTTTA	PB = 151

## **Método experimental**

### **Proliferación de las líneas celulares**

Las células de las líneas celulares de CaCU HELA, INBL Y CALO se cultivaron en cajas de cultivo con 5mL de medio de cultivo (RPMI con 10% de suero fetal bovino), en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 37° C de temperatura y una atmosfera húmeda saturante. Estas se incubaron por 2 días, tiempo suficiente para que proliferaran y se obtengan un millón de células, por cada uno de los tiempos.

### **Cultivo de células en presencia de IL-2**

Se preparo medio de cultivo con IL-2 a una concentración de 100 UI/mL.

Obteniendo la cantidad de 1 millón de células por cada tiempo, se colocaron 5 mL de medio en presencia de IL-2 en cada caja de cultivo y se dejo incubar por 5, 10, 15, 20 y 30 min; 1 y 2 hrs; 1, 2 y 3 días.

### **Cultivo de células en presencia de DMSO**

Con el fin de contar con un control positivo a apoptosis, se proliferó un millón de células por línea celular, en presencia de DMSO (dimetilsulfóxido,  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ) (Sigma, Chem, EUA) al 60% con RPMI a un tiempo de 2 hrs, esto para asegurar la muerte celular, posteriormente se obtuvo el ARN total el cual fue retrotranscrito y amplificado con los primers diseñados.

### **Obtención de ARN total**

Una vez transcurrido el tiempo deseado, las células se centrifugaron durante 5 min a 2500 rpm, el sobrenadante se desechó, al botón celular se le agregaron 1 mL de Trizol (Invitrogen), se mezcló y se dejaron reposar 15 min, cumplido el tiempo se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo (Sigma, Chem, EUA), el tubo se agitó durante 3 min y se dejó reposar 3 min, posteriormente se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm y 4° C. La parte acuosa se recuperó y se pasó a otro tubo nuevo donde se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Isopropanol (Sigma, Chem, EUA), el cual se homogenizó y se dejó reposar 10 min en hielo, pasado el tiempo se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm y 4° C. Se guardó toda la noche a 20° C. Nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones y se retiró el isopropanol, al botón que se formó se le adicionó 1 mL de etanol (Sigma, Chem, EUA) al 70 %, se resuspendió y centrifugó 5 min a 7500 rpm y 4° C, se decantó el etanol y se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Evaporado el etanol se rehidrató con 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas para obtener el concentrado de la muestra principal.

### **Cuantificación de ARN**

Se tomaron 4  $\mu\text{L}$  de la muestra principal de ARN y se mezclaron en 196  $\mu\text{L}$  de agua inyectable, estos se colocaron en la celda del biofotómetro (Eppendorf, EUA) para determinar las concentraciones de ARN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se tomaron las absorbancias de 260nm que corresponde a la absorbancia máxima de la solución de ARN y 280 nm que corresponde a las proteínas. Dado que la solución de ARN absorbe parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los

valores obtenidos en la relación 260/280 proporciona una estimación del grado de pureza del ácido nucleído.

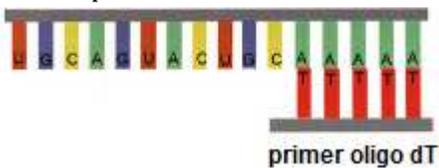
### Retrotranscripción (RT)

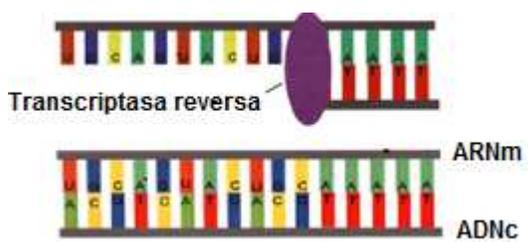
Para llevar a cabo la retrotranscripción se necesita tener la concentración de 1 µg/µl de cada muestra de ARNm, para llevar a cabo esta determinación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Absorbancia } 260\text{nm}) (\text{Volumen de la disolución}) (40)}{1000} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Teniendo los cálculos para el ARN de todas las muestras, se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx) (Tabla 3). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener.

**Tabla 3. Condiciones y funciones para 1 Rx de retrotranscripción para ARNm**

Reactivos	1 Rx	Función
Amortiguador 5x (Invitroyen)	4 µl	Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la enzima MMLV-RT (transcriptasa reversa)
0.1 MDTT (Invitroyen)	2 µl	Actúa como coestimulador de la enzima
Muestra	1 µl	Extracciones de ARNm 
dNTP's 5mM (Fermentas)	4 µl	Desoxinucleótidos trifosfato, que son el sustrato para polimerizar nuevo ADNc 
Oligo dT (Promega)	2 µl	Oligo iniciador de hibridación de cadenas, agrega nucleótidos al extremo 3' hibridando la cola poli (A) característica de los ARNm eucariotas sirviendo de plantilla 

Enzima MMLV-RT (moloney-murine leukaemia virus) (Invitoyen)	1 $\mu$ l	Enzima que va a llevar a cabo la unión de los DNTP's a la nueva cadena 
Agua libre RNAsas (Promega)	6 $\mu$ l	Proporciona un medio acuoso para que los componentes orgánicos se diluyan y complementa el volumen ideal de cada reacción
<b>Volumen Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

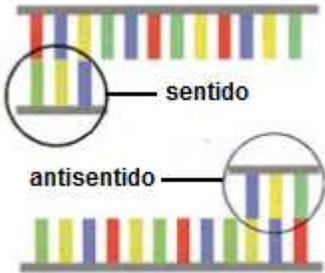
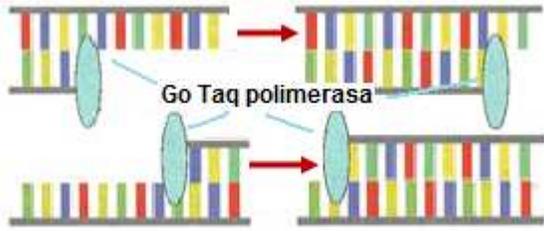
Por reacción se hizo una mezcla de los reactivos anteriores en un tubo y se adiciono a cada una de las muestras de ARNm, estas se colocaron en un termociclador (Eppendorf, EUA) que se programó por 1 hr a 37° C temperatura ideal para que pueda trabajar la enzima. Después de este tiempo se obtuvo el ADNc de cada una de las muestras.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para una reacción (1 Rx) (Tabla 4). Cada una de las cantidades por reactivo se multiplicó por el número de reacciones que se quisieron obtener.

**Tabla 4. Condiciones y funciones para 1 Rx de PCR**

Reactivos	1 Rx	Función
Amortiguador 5x Green (Promega)	6 $\mu$ l	Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la Go Taq Polimerasa, el cual tiene integrado un coestimulador de esta enzima ( $MgCl_2$ ).
Muestra ADNc	4 $\mu$ l	Retrotranscripciones de ARNm 
dNTP's 10 mM (Fermentas)	0.8 $\mu$ l	Desoxinucleótidos trifosfato, que son el sustrato para polimerizar nuevo ADN 

Primer 1 (Sentido) caspasa 9 ó caspasa 3 (Invitroyen)	1 $\mu$ l	Delimitan la zona de ADN a amplificar. Secuencia corta complementaria y específica al antisentido de la cadena de ADN. Reconocido por la enzima pegándose al extremo 5' para hibridar la cadena.
Primer 2 (Antisentido) caspasa 9 ó caspasa 3 (Invitroyen)	1 $\mu$ l	Secuencia corta complementaria y específica al sentido de la cadena de ADN. Reconocido por la enzima pegándose al extremo 3' para hibridar la cadena 
Go Taq Polimerasa (Promega)  Enzima extraída de bacterias termófilas, con propiedades termoresistentes.	0.15 $\mu$ l	Lleva a cabo la unión de los DNTP's para la hibridación de las nuevas cadenas de ADN. 
Agua libre RNAsas (Promega)	7.05 $\mu$ l	Proporciona un medio acuoso para que los componentes orgánicos se diluyan y complementa el volumen ideal de cada reacción
<b>Volumen Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

Estas reacciones se colocaron en el termociclador (Eppendorf, EUA) que se programó para que se efectúen los siguientes pasos:

- Paso 1 Desnaturalización inicial: 94° C 6 min
- Paso 2 Hibridación de los cebadores: 55° C 2 min
- Paso 3 Extensión de la cadena: 72° C 2 min
- Paso 4 Desnaturalización: 94° C 45 seg
- Paso 5: 30 veces el paso 2 al 4
- Paso 6 Hibridación Final: 55° C 2 min

- Paso 7 Elongación Final: 72° C 7 min
- Paso 8 Estabilización: 20° C 30 min

### **Electroforesis**

Por último, se llevó a cabo la técnica de electroforesis en gel de agarosa para observar la presencia o ausencia de cada uno de los amplificadores obtenidos de la PCR.

Se prepararon los geles de agarosa (Invitrogen) al 1.5 % en TBE 1X añadiendo 10 µL de bromuro de etidio. Ya polimerizado se colocó en el primer pozo del gel el marcador de pesos moleculares de 100 a 1000 pares de bases (Fermentas) para ubicar por su tamaño las caspasas, posteriormente se colocaron 4 µL de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Owl, EUA), cubierto de TBE 0.5 % a 80-90 volts durante 60 min. Finalmente se colocó el gel en un transiluminador (UVP, EUA) que con ayuda de luz ultra violeta se pudieron observar los productos de amplificación obtenidos.

Un campo eléctrico, con un extremo positivo y otro negativo, permitirá la separación de fragmentos de ADN en bandas características, en función de su tamaño y movilidad. El ADN, al estar cargado negativamente, migró del polo negativo hacia el positivo. De este modo se podrá apreciar las bandas en el tamaño de pares de bases que coincida con la del tamaño de los primers para caspasas.

La metodología se repitió una vez más para confirmar que los resultados fueran reproducibles.

## RESULTADOS

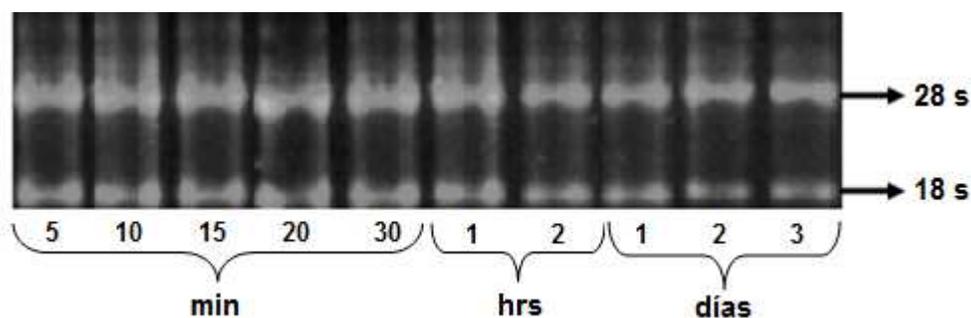
Con la finalidad de obtener un número de células suficiente para llevar a cabo la extracción de material genético de las líneas celulares de CaCU HELA, INBL y CALO. Se realizaron cultivos de cada línea para obtener  $1 \times 10^6$  de células por muestra. Las células fueron cultivadas para su proliferación a diferentes tiempos como: 5, 10, 15, 20 y 30 min; 1 y 2 hrs, así como 1, 2 y 3 días, en presencia de 100 UI/mL de IL-2.

Como control de los experimentos se utilizaron células de las mismas líneas cultivadas en ausencia de IL-2 a los diferentes periodos de tiempo.

Una vez transcurrido cada uno de los tiempos de cultivo, se llevo a cabo la extracción del ARN total de cada muestra, este se cuantificó utilizando un biofotómetro, los datos de absorbancia a 260 nm se utilizaron para calcular la concentración de ARN y los valores de la relación 260/280 determinaron la pureza de cada una de ellas. El rango de la relación 260/280 debe estar entre 1-2 unidades para que la muestra se considere aceptable para realizar la retrotranscripción.

Para confirmar la integridad del ARN obtenido, se realizó un gel de agarosa en el cual se corrieron todas las muestras de ARN obtenidas para cada línea celular.

Para las muestras obtenidas se observaron las fracciones de ARN ribosomales 28s y 18s con claridad, a continuación se muestra un gel representativo que corresponde a la integridad del ARN, para la línea celular INBL (Figura 9).

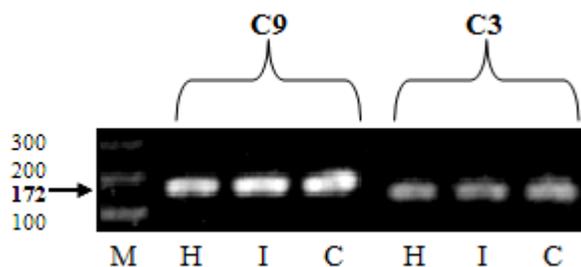


**Figura 9. ARN total extraído de las líneas de CaCU, mostrando las bandadas 28 s y 18 s. En todos los casos se observan integras ambas bandadas, lo cual indica que se realizó una correcta extracción de ARN.**

Una vez confirmada la integridad del ARN total extraído para cada una de las muestras celulares, se obtuvo el ADN complementario (ADNc) por medio de una retrotranscripción.

Posteriormente, se diseñaron los primers para caspasas 9 y 3. Dichos primers fueron utilizados para llevar a cabo la PCR.

Para confirmar que los primers diseñados para caspasas 9 y 3 reconocían al gen para estas caspasas, estos fueron probados con un control positivo, que consistió en células inducidas a muerte por DMSO (dimetilsulfóxido,  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ ) en un tiempo de 2 horas. Dado que DMSO induce la muerte de las células, los cultivos en presencia de este solvente son una fuente perfecta para obtener el mensajero de proteínas como las caspasas. De tal manera que al obtener el ARN total a partir de células en apoptosis y retrotranscribirlo podemos asegurar la presencia de ADN complementario para las caspasas de nuestro interés. Los resultados obtenidos, al utilizar los primers que diseñamos para caspasa 9 y 3, mostraron la presencia de un producto de amplificación de 172 y 151 pb que son los productos esperados para caspasa 9 y 3 respectivamente (Figura 10).



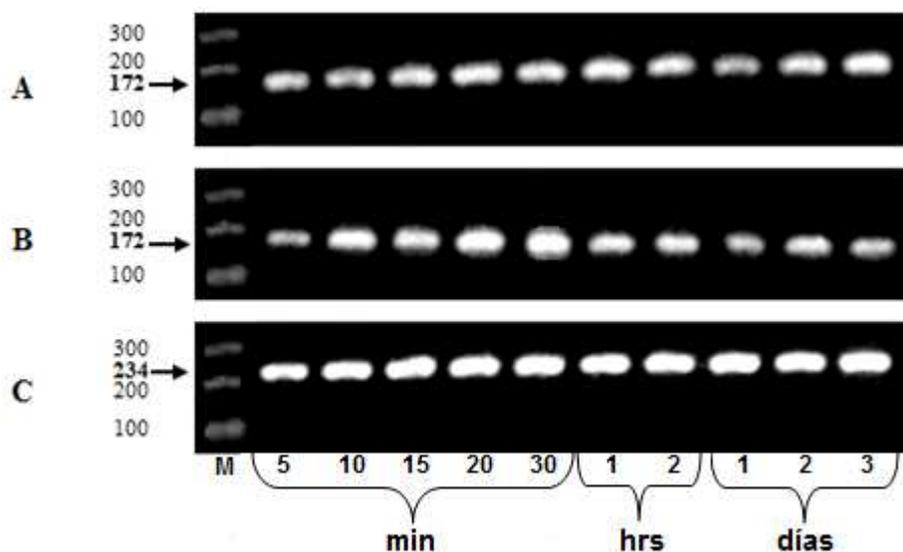
**Figura 10. Expresión de caspasas 9 y 3, en células HELA (H), INBL (I) y CALO (C), cultivadas en presencia de 60% de DMSO. Control positivo a muerte celular donde se obtuvo un producto de amplificación de 172 pb para C9 y de 151 pb para C3 que comprueba la muerte celular. (M) marcador de pares de bases, (C9) caspasa 9 y (C3) caspasa 3.**

Además, para corroborar que las condiciones establecidas para la PCR fueron las correctas se incluyó como control interno de la técnica la amplificación para  $\beta$ -actina para las muestras de cada uno de los grupos experimentales; grupo control (cultivos en ausencia de IL-2) y el grupo problema (células cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2). Se utiliza a  $\beta$ -actina como control interno de la prueba de PCR ya que es una proteína constitutiva de las células y se encuentra en síntesis continua y por lo tanto, debe ser detectada en todas las muestras, si las condiciones de amplificación son las correctas. En este caso para  $\beta$ -actina se espera un producto de amplificación de 234 pb el cual observamos en todas las muestras de las diferentes líneas celulares (Figura 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

Después de establecer, en células inducidas a muerte por DMSO, que los primers para caspasas 9 y 3 generan los productos de amplificación esperados. Y que las condiciones de amplificación de la PCR son las adecuadas, Se procedió a amplificar los genes para caspasas 9 y 3 en los ADNc obtenidos de las líneas celulares HELA, INBL y CALO, cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 a diferentes tiempos.

### Expresión de caspasa 9 en la línea celular HELA

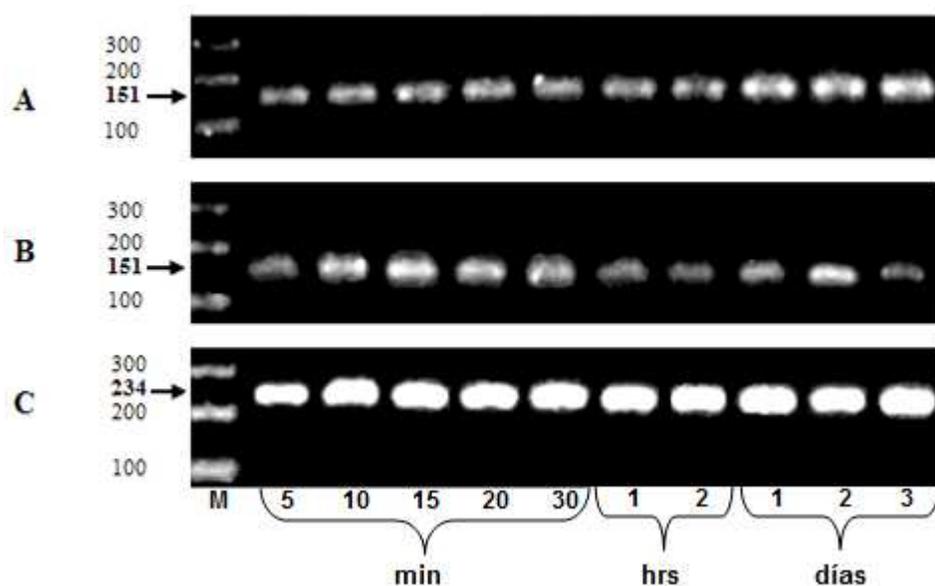
Para la determinación de la expresión de caspasa 9 en la línea celular HELA se obtuvo un producto de amplificación de 172 pb, en los diferentes tiempos donde: (A) es el grupo control, en ausencia de IL-2 observándose bandas homogéneas; (B) representa las muestras cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, en las cuales se observa una mayor expresión de mensajero en los tiempos de 10, 15, 20 y 30 min, sin embargo, no se observan grandes diferencias en la expresión del ARNm con respecto al control en los demás tiempos. En (C) se muestra la expresión del mensajero para  $\beta$ -actina con un producto de amplificación de 234 pb homogéneo a los diez tiempos (Figura 11).



**Figura 11. Producto de amplificación de 172 pb, para caspasa 9 en la línea celular HELA: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.**

### Expresión de caspasa 3 en la línea celular HELA

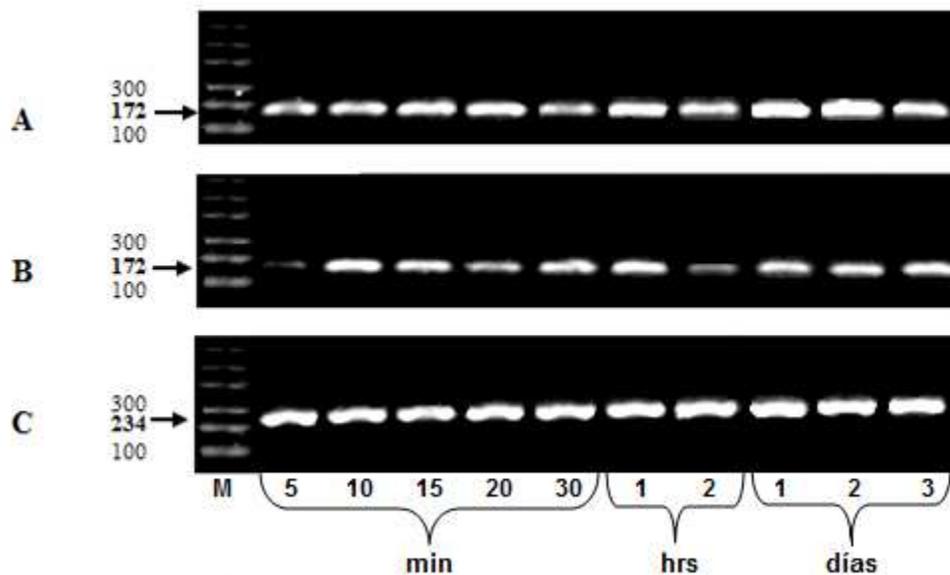
Al analizar el producto de amplificación para caspasa 3, en la línea celular HELA, observamos una banda de 151 pb, en los diferentes tiempos donde: el grupo control, en ausencia de IL-2, nos da bandas homogéneas en todos los tiempos (A). Mientras que en las muestras cultivadas en presencia de IL-2 se observa una clara disminución del producto de amplificación inversamente proporcional al tiempo de cultivo, siendo los tiempos de 10, 15, 20 y 30 min los más expresados (B). El producto de  $\beta$ -actina de 234 pb (C) es muy homogéneo en los diez tiempos (Figura 12).



**Figura 12.** Producto de amplificación de 151 pb, para caspasa 3 en la línea celular HELA: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.

### Expresión de caspasa 9 en la línea celular INBL

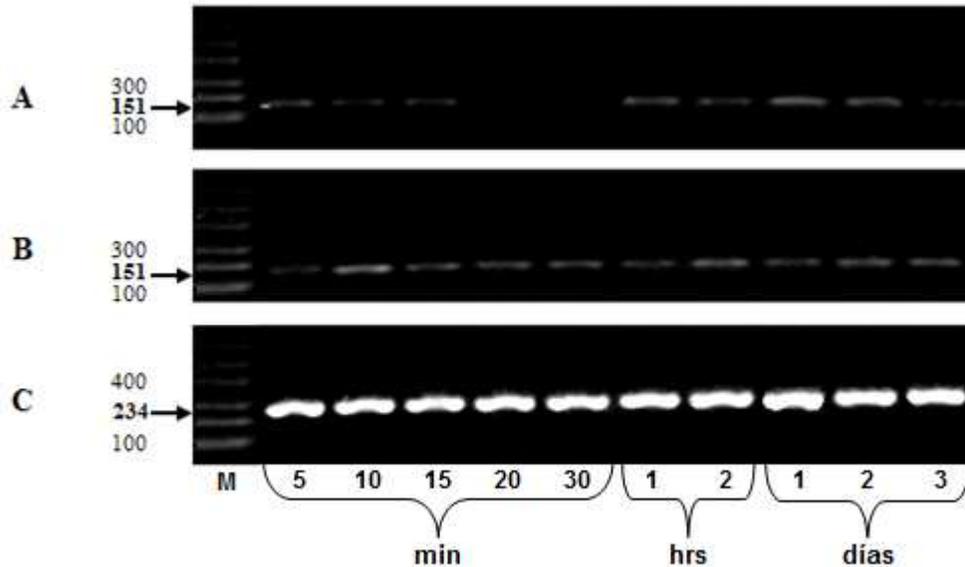
En el caso de la expresión de caspasa 9 en la línea celular INBL se obtuvo un producto de amplificación de 172 pb. En este ensayo, en general, se observa una menor expresión del mensajero. En el caso de las muestras de células cultivadas en ausencia de IL-2 no se observa cambio en la cantidad de producto obtenido con respecto al tiempo (A), mientras que en las muestras obtenidas de cultivos en presencia de IL-2, se observa una menor expresión de mensajero a 5 min y 2 hrs, sin observarse diferencias con respecto al control en los demás tiempos (B). La expresión de  $\beta$ -actina (C) con un producto de amplificación de 234 pb es de la misma intensidad y homogénea en los diez tiempos (Figura 13).



**Figura 13.** Producto de amplificación de 172 pb, para caspasa 9 en la línea celular INBL: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.

### Expresión de caspasa 3 en la línea celular INBL

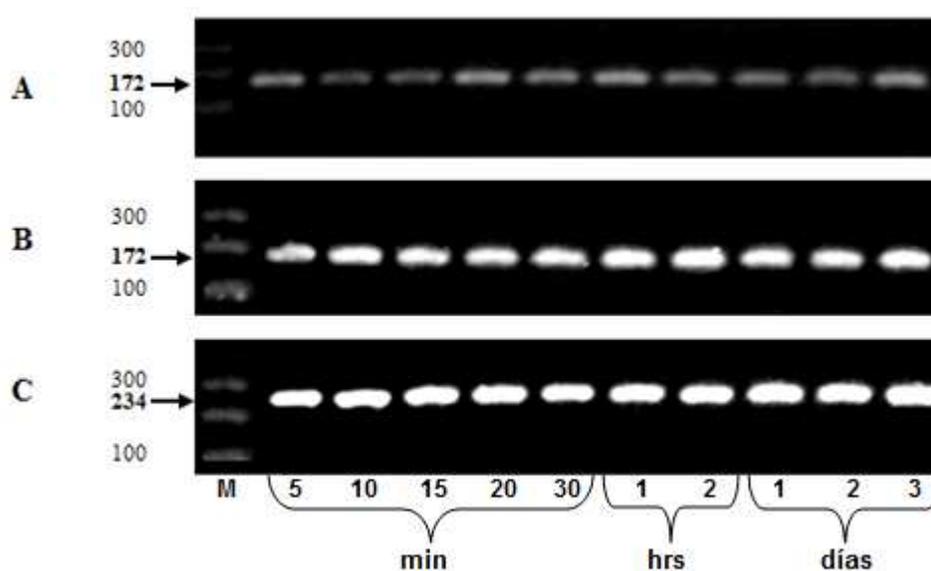
Para la expresión de caspasa 3, en la línea celular INBL, observamos un producto de amplificación de 151 pb. En las muestras de los cultivos en ausencia de IL-2, se observa una disminución considerable del producto de amplificación a 20, 30 min y 3 días (A). Para muestras de los cultivos en presencia de 100 UI/mL de IL-2, se observa una expresión homogénea del producto de amplificación en los diferentes tiempos a excepción del tiempo de 10 min y 3 días que presenta mayor expresión con respecto al control. Cabe resaltar que a diferencia de los resultados obtenidos a 20 y 30 min del control, IL-2 induce la presencia de productos de amplificación en los mismos tiempos (B). La expresión de  $\beta$ -actina, con un producto de amplificación de 234 pb, es homogénea en los diez tiempos (C), (Figura 14).



**Figura 14. Producto de amplificación de 151 pb, para caspasa 3 en la línea celular INBL: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.**

## Expresión de caspasa 9 en la línea celular CALO

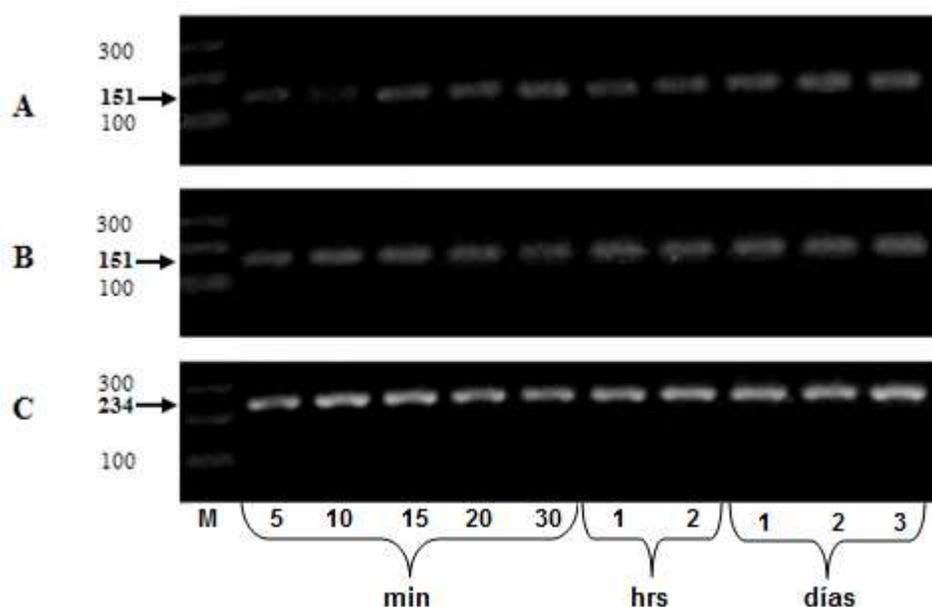
Al analizar el producto de amplificación para caspasa 9 en la línea celular CALO se obtuvo un producto de amplificación de 172 pb. En el caso de las muestras cultivadas en ausencia de IL-2, en lo general, observamos un producto de amplificación muy homogéneo en los diferentes tiempos (A). En el caso de las muestras cultivadas con IL-2 observamos un aumento en el tamaño de la banda del producto de amplificación en los diez tiempos a comparación del grupo control (B). La expresión de  $\beta$ -actina (C) con un producto de amplificación de 234 pb es menor que el de las muestras en presencia de IL-2 y homogénea en los diez tiempos (Figura 15).



**Figura 15. Producto de amplificación de 172pb, para caspasa 9 en la línea celular CALO: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.**

### Expresión de caspasa 3 en la línea celular CALO

En cuanto al producto de amplificación para caspasa 3 en la línea celular CALO se obtuvo un producto de amplificación de 151 pb. El grupo control, en ausencia de IL-2, muestra homogeneidad en las bandas a excepción del tiempo de 10 min que presenta menor expresión (A). Para las muestras de cultivos en presencia de IL-2 no se observan diferencias en los productos de amplificación obtenidos con respecto al control, solo en la muestra de 10 min que presenta mayor expresión (B). La expresión de  $\beta$ -actina con un producto de amplificación de 234 pb (C), se observa homogéneo en los diez tiempos (Figura 16).



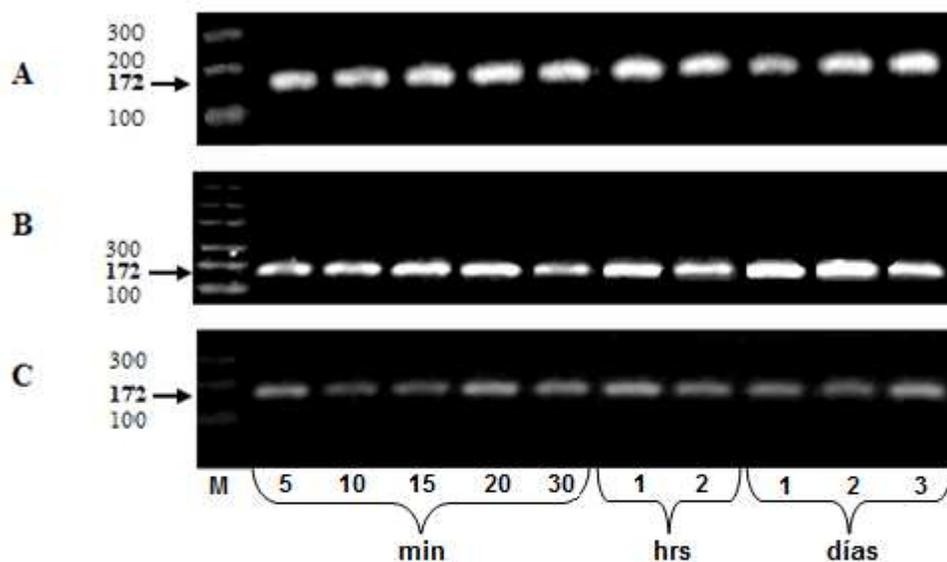
**Figura 16.** Producto de amplificación de 151 pb, para caspasa 3 en la línea celular CALO: (A) células cultivadas en ausencia de IL-2; (B) células cultivadas en presencia de IL-2; (C) producto para  $\beta$ -actina (control interno de la técnica), (M) marcador de pares de bases.

Con el propósito, de comparar si existe diferencia entre los productos de amplificación para las muestras de cada una de las líneas celulares, en función del tiempo de cultivo. Se corrió un gel con los productos de amplificación de las muestras control en ausencia de IL-2 de HELA, INBL y CALO en los diferentes tiempos, de la misma forma se hizo con las muestras en presencia de 100 UI/mL de IL-2 en caspasa 9 y 3.

## IL-2 regula la expresión de caspasa 9 en células de CaCU

### Expresión de caspasa 9 en cultivos celulares de las líneas HELA, INBL y CALO en ausencia de IL-2

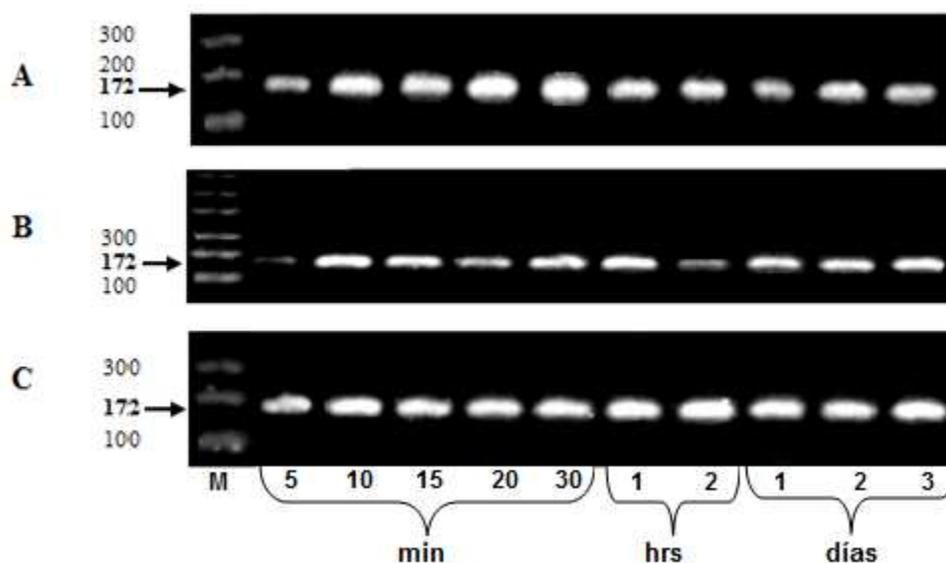
En el caso del producto de amplificación para caspasa 9 en células cultivadas en ausencia de IL-2, observamos bandas homogéneas con respecto al tiempo en cada una de las líneas celulares. Sin embargo, al comparar los productos de amplificación entre las diferentes líneas celulares, detectamos que HELA presenta la mayor expresión de producto (A); en comparación con CALO que presenta la menor expresión de las tres líneas (C) y INBL presenta una expresión intermedia (B) (Figura 17).



**Figura 17.** Productos de amplificación de 172 pb, para caspasa 9 en muestras en ausencia de IL-2 en líneas celulares de CaCU, obteniéndose homogeneidad en los productos de amplificación en las tres líneas, teniendo HELA la mayor expresión, (M) marcador de pares de bases; (A) HELA; (B) INBL; (C) CALO.

### Expresión de caspasa 9 de cultivos en presencia de 100 UI/mL de IL-2

Para la expresión del producto de amplificación para caspasa 9 en las muestras cultivadas en presencia, de 100 UI/mL, de IL-2 se aprecia claramente una menor expresión del mensajero en la línea celular INBL (B), a comparación de las líneas CALO (C) y HELA (A) que muestran la mayor expresión de producto, destacándose que al día 1 HELA tiene un menor producto que CALO (Figura 18).

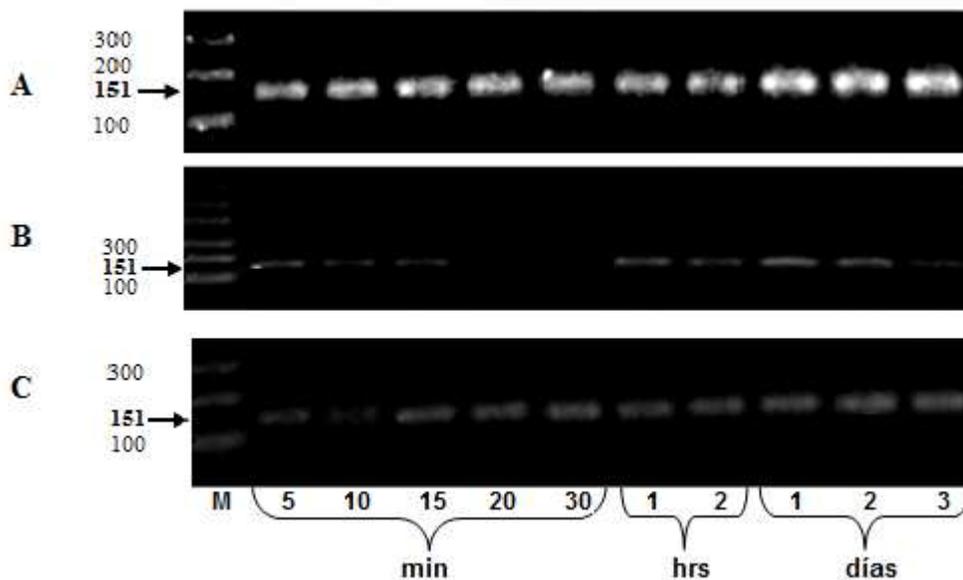


**Figura 18.** Productos de amplificación de 172 pb, para caspasa 9 en muestras en presencia de 100 UI/mL de IL-2 en líneas celulares de CaCU, obteniéndose los menores productos de amplificación en INBL, (M) marcador de pares de bases; (A) HELA; (B) INBL; (C) CALO.

## IL-2 regula la expresión de caspasa 3 en células de CaCU

### Expresión de caspasa 3 en cultivos celulares de las líneas HELA, INBL y CALO en ausencia de IL-2

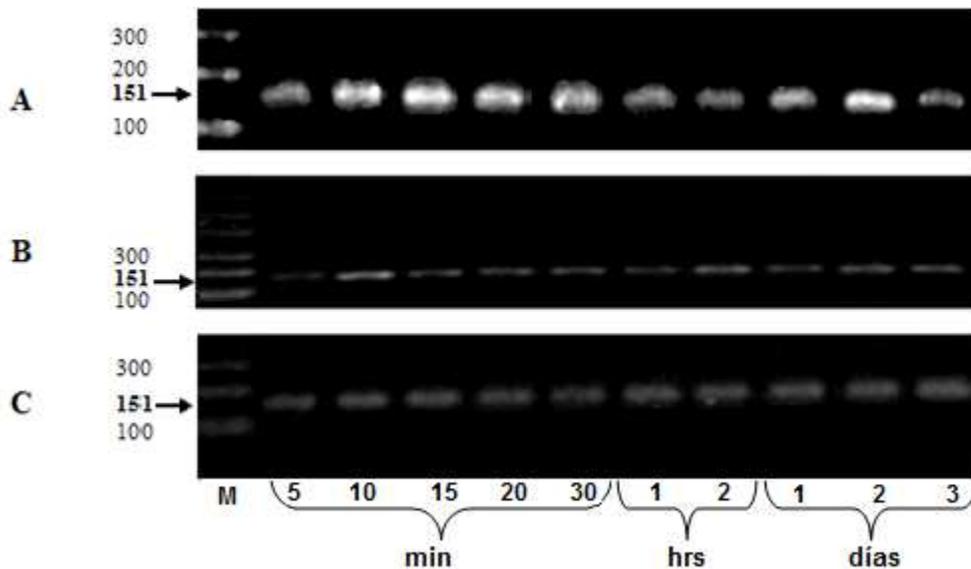
En el caso del producto de amplificación para caspasa 3 en muestras de cultivos de las líneas HELA, CALO e INBL en ausencia de IL-2, se observa una menor expresión del mensajero para la línea celular INBL (B) con una considerable disminución a 20 y 30 min y 3 días, a diferencia de los productos detectados en HELA (A) y CALO (C) en las cuales podemos observar los mayores productos de amplificación. Sin embargo, HELA tiene los mayores productos de amplificación. En CALO a 10 min destaca el menor producto incluso en comparación de las otras líneas celulares (Figura 19).



**Figura 19. Productos de amplificación de 151 pb, para caspasa 3 en muestras en ausencia de IL-2 en líneas celulares de CaCU, obteniéndose considerablemente menores productos de amplificación en INBL, (M) marcador de pares de bases; (A) HELA; (B) INBL; (C) CALO.**

### Expresión de caspasa 3 en cultivos celulares de las líneas HELA, INBL y CALO en presencia de 100 UI/mL de IL-2

Al analizar el producto de amplificación para caspasa 3 en las tres líneas celulares cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 a los diferentes tiempos, se puede apreciar en general menor regulación del producto de caspasa 3 por parte de IL-2 de la misma forma se observa menor expresión de producto en la línea celular INBL (B) a comparación de CALO (C) que presenta más expresión y HELA (A) que obtiene el mayor amplificado para caspasa 3, que tiene una disminución del producto de amplificación inversamente proporcional al tiempo de cultivo, regulando más en tiempos cortos, para INBL la expresión se mantiene homogénea y CALO que se mantiene constante en los diez tiempos (Figura 20).

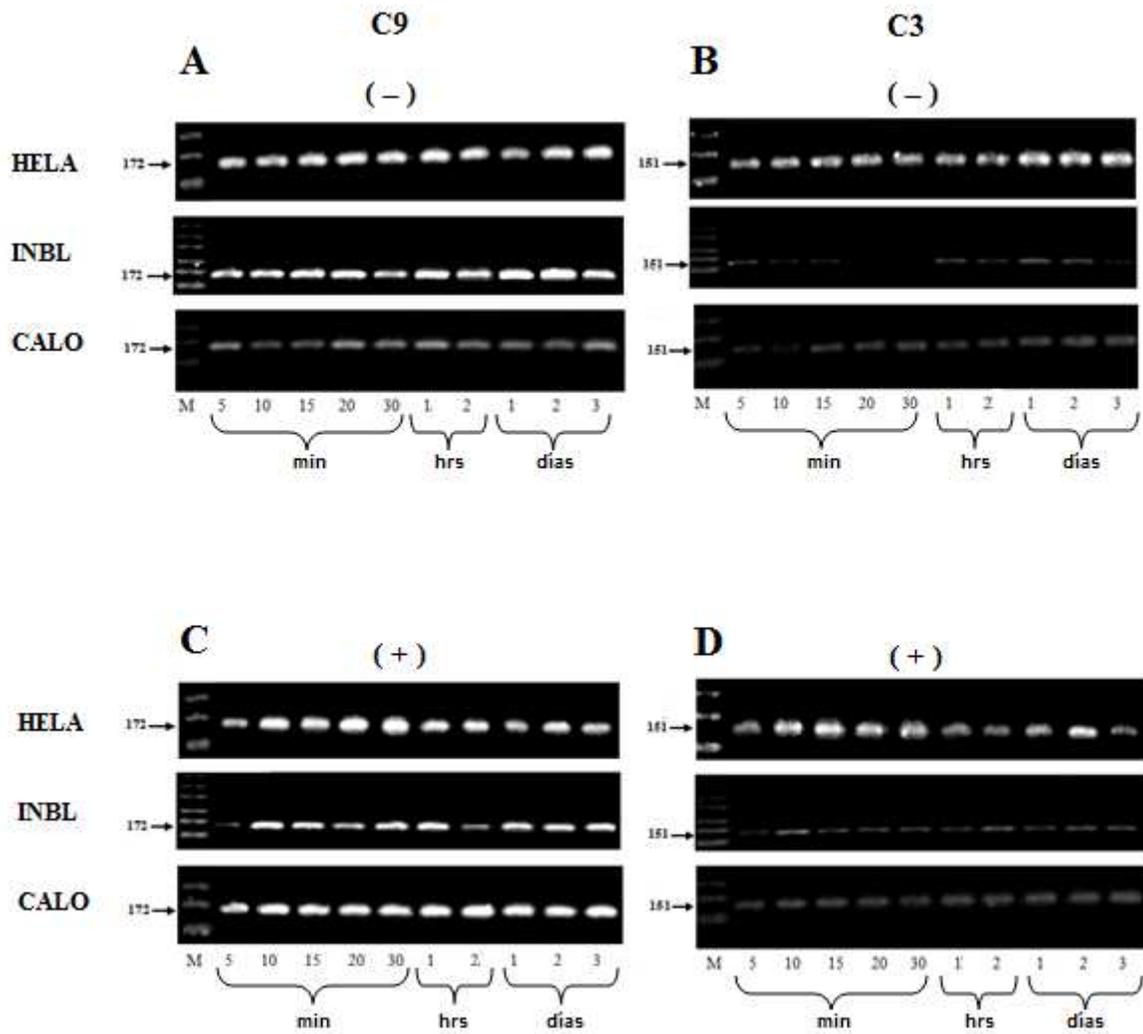


**Figura 20.** Productos de amplificación de 151 pb, para caspasa 3 en muestras en presencia de IL-2 en líneas celulares de CaCU, obteniéndose considerablemente menores productos de amplificación en INBL, mientras que en HELA y CALO presentan mayor expresión, (M) marcador de pares de bases; (A) HELA; (B) INBL; (C) CALO.

Con el propósito de comparar los productos de amplificación para caspasa 3 (C3) y 9 (C9) entre las 3 líneas celulares de carcinoma de carcinoma de cérvix, se agruparon las gráficas obtenidas para cada una de ellas y las diferentes caspasas de las células cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de IL-2. En primer lugar podemos observar que en células en ausencia de IL-2 existe la expresión tanto de caspasa 9 como 3, observándose una mayor expresión de caspasa 9 (Figura 21 A y C).

En particular para caspasa 9, la línea CALO muestra el menor producto de amplificación (Figura 21 A), mientras que para caspasa 3 la menor expresión se encontró en la línea INBL (Figura 21 B). Sin embargo, al cultivar las células en presencia de IL-2 observamos que la citocina regula diferencialmente los productos de amplificación de ambas caspasas, en lo general, se puede apreciar una regulación positiva en los productos para C3 y C9 con pequeñas diferencias por línea y caspasa.

Tal es el caso de C9 que en las tres líneas celulares, en lo general muestra un aumento (con excepciones en tres tiempos en la línea INBL) (Figura 21 A y C). Mientras que para C3 observamos un aumento de los productos de amplificación en las tres líneas celulares (Figura 21 D).



**Figura 21. Comparación de los productos de amplificación para las caspasas 9 (C9) y 3 (C3) en células de CaCU cultivadas en presencia (+) y ausencia (-) de IL-2. Donde caspasa 3 presenta menores productos de amplificación que caspasa 9.**

## DISCUSIÓN

Se sabe 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. Por lo cual esta citocina ha cobrado gran interés ya que se usa como una alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cánceres (Hernández *et al.*, 2005). IL-2 se administra vía sistémica para activar la respuesta inmunológica y producir regresión de masas tumorales (Rangel 1999).

En un proyecto previo, del laboratorio de Oncología Celular, se evaluó el papel de IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCU INBL y CALO, demostrando que estas células responden de manera diferencial a distintas concentraciones de IL-2 exógena, de tal forma que a bajas concentraciones (10 UI/mL) induce su proliferación, mientras que a altas concentraciones (100 UI/mL) presentan una inhibición en la proliferación. También, han indicado que la respuesta a esta citocina parece estar en función del tiempo y la concentración (Alvarado, 1997, Rangel 2010). Por lo cual, es importante determinar el efecto directo que IL-2 puede tener a altas concentraciones (100 UI/mL) sobre las células neoplásicas y conocer si estas células presentan un proceso de muerte celular por apoptosis.

Los tiempos experimentales de este trabajo se eligieron considerando los resultados de ensayos previos donde se demuestra la presencia del receptor de IL-2 (RIL-2) en líneas de CaCU CALO e INBL. Además de corroborar que este receptor es funcional ya que al estimular a las células con IL-2 exógeno se observan proteínas fosforiladas, de la vía de señalización de este receptor, a partir de los 15 minutos (Valle, 2000).

Por otro lado, se reporta que estas mismas líneas celulares producen IL-2 alcanzado la mayor producción a los 15 min y 2 hrs (Rojas, 2009).

También, se reporta que las células de las líneas de CaCU INBL y CALO cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 mueren después de tres días de cultivo (Del Río, 2011).

Con base en esta información sobre los tiempos de detección del RIL-2 y producción de IL-2 en estas líneas de CaCU, el objetivo de este trabajo fue evaluar la regulación de la expresión de ARNm para caspasas 9 y 3 a diferentes tiempos de exposición a IL-2, ya que se ha reportado que estas proteínas son expresadas en el proceso apoptótico.

Para su determinación se eligió la técnica de RT-PCR por la especificidad que brinda ya que nos permitió obtener un gran número de copias de ADN de un fragmento en específico de los genes de estas caspasas y facilitar su identificación. Partiendo del ARNm que fue extraído de las líneas celulares y con 1 mg de ADNc fue amplificado con primers específicos para el gen que codifica para caspasa 9 y 3. Con los resultados obtenidos se espero saber si los genes para estas caspasas son regulados por IL-2 a altas concentraciones y si esta regulación depende del tiempo en presencia del estímulo, lográndose este objetivo.

El determinar los productos de amplificación para caspasas 9 y 3 es importante ya que caspasa 9 pertenece al grupo de caspasas iniciadoras, indispensable para la formación del apoptosoma que conlleva a la activación de caspasas ejecutoras responsable de inducir la fragmentación del ADN que es considerada como una de las características que define la muerte por apoptosis.

El hecho de que las células cultivadas en ausencia de IL-2, muestren productos de amplificación para las caspasa 9 y 3 indica que estas proteínas son sintetizadas continuamente por las células. Sin embargo, esto no significa que sean proteínas activas ya que las células no muestran características de muerte. Si consideramos que las caspasas son zimógenos o precursores enzimáticos inactivos, es decir, no cataliza ninguna reacción como hacen las enzimas (Elinos *et al.*, 2003). Podemos pensar que las células usadas como control sintetizan zimógenos de las caspasas y que estas

pueden ser activadas por alguna señal de muerte que reciba la célula, como la presencia de IL-2.

Por otro lado, para que las caspasas se activen se requiere de un cambio bioquímico en su estructura que le lleve a conformar un centro activo donde poder realizar proteólisis. Hasta ese momento, el zimógeno pasa a ser una enzima activa (Chen y Wang, 2002). La síntesis de enzimas en forma de zimógenos es uno de los “mecanismos de seguridad” con el que cuenta la célula para su supervivencia ya que las formas activas de los zimógenos tienen efectos fisiológicos muy poderosos y su síntesis como forma inactiva permite almacenarlos de forma segura hasta que son requeridos y evitar así que una proteína ejerza una actividad peligrosa en tiempo y lugar equivocado (Shi, 2004). Por lo cual, el mensajero para caspasas 9 y 3 en células no estimuladas con IL-2 puede corresponder al mensajero para los zimógenos de estas enzimas.

Además, cuando se trabajo con el ADNc de células estimuladas con IL-2 los resultados obtenidos muestran que, IL-2 interviene en la regulación de los mensajeros para caspasas 9 y 3, ya que las células cultivadas con esta citocina presentan mayor producto de amplificación para caspasa 9. Lo cual indica que IL-2 activa la síntesis de caspasa 9, que como se sabe es una caspasa iniciadora, por lo que era de esperarse que sus productos de amplificación fueran mayores a los de caspasa 3. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que una vez que caspasa 9 ha sido activada, ésta induce la síntesis de caspasa 3, tal como se observa en los productos de amplificación para esta enzima los cuales son muy discretos en comparación a los de caspasa 9.

Con los datos obtenidos en general se puede determinar que los tiempos con mayor expresión de ARNm para caspasa 9 y 3 en células en presencia de 100 UI/mL de IL-2 con respecto al control fueron 10, 15, 20 y 30 min (tiempos cortos), lo que sugiere que las células cultivadas con IL-2 es capaz de activar una mayor cantidad de caspasas para que la célula llegue a un punto de no retorno y pueda dar inicio al proceso apoptótico, para después mantenerse constante y terminar con la muerte celular.

Estos datos son importantes ya que podemos proponer un modelo de activación de muerte por apoptosis en células de CaCU regulado por IL-2. Esta hipótesis se apoya en otros datos recientes, que muestran fragmentos de ADN de 200 pb en lisados de células de CaCU cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 (Del Río, 2011). Esta fragmentación del ADN es una prueba universalmente aceptada de inducción de muerte por apoptosis.

Si asumimos que IL-2 esta regulando a las caspasas en el proceso apoptótico en células de CaCU, podríamos sugerir que caspasas 9 y 3 se encuentran activas en células cultivadas en presencia de la citocina, aunque la presencia del mensajero no garantiza la fosforilación de las proteínas de caspasas bajo los estímulos de IL-2, por lo cual se propone la utilización de otras técnicas para determinar si las caspasas detectadas en células de CaCU están activas.

Por otro lado, algunas de las respuestas metabólicas de las células neoplásicas suelen asociarse con su estado de diferenciación o grado de transformación. Por lo cual, en este estudio se utilizaron líneas celulares en diferentes estadios, de la progresión tumoral, para evaluar si el efecto de IL-2 en la regulación de la expresión de las caspasa 9 y 3 es dependiente del estadio.

Las líneas celulares HELA e INBL pertenecen a un estadio IVB metastático, que implicaría una mayor agresividad y quizá mayor resistencia a IL-2, con una menor expresión del mensajero para las caspasas. Lo cual hemos confirmado para la línea INBL.

El hecho de que la línea celular HELA mostrará los mayores productos de amplificación para ambas caspasas, a pesar de ser estadio IVB, se puede atribuir a que esta línea celular tiene más de 50 años en cultivo, lo que puede representar mayor vulnerabilidad por los cambios moleculares que ha sufrido a través del tiempo, de manera tal que la puede hacer más vulnerable a muerte por apoptosis por regulación de IL-2.

Mientras que la línea celular CALO corresponde a un estadio IIIB, (Cáceres, 2001), que la podría hacer más susceptible al efecto de IL-2, es decir inducir una mayor expresión de mensajero para ambas caspasas. Y en efecto comprobamos que esta línea celular tiene mayor posibilidad de ser eliminada por apoptosis en presencia e IL-2, y que se induce la expresión de la caspasa 9, iniciadora, cuya presencia induciría la síntesis de caspasa 3 ejecutoras la cual induce la muerte por apoptosis de estas células.

Al comparar los resultados de los productos de amplificación para las caspasas entre las tres líneas celulares podemos confirmar que IL-2 induce muerte por apoptosis y que esta muerte se relaciona con el estadio del tumor y el tiempo de cultivo en presencia de IL-2.

## CONCLUSIONES

- IL-2 regula la expresión del mensajero para caspasa 9 y 3 en función del tiempo.
- La regulación de caspasa 3 por parte de IL-2 fue menor a comparación de caspasa 9.
- IL-2 a 100 UI/mL induce la muerte por apoptosis en células de CaCU de las líneas HELA, INBL y CALO.
- Las células de la línea CALO que corresponde a estadios tempranos son más sensibles a una terapia con IL-2.

## PERSPECTIVAS

1. Llevar a cabo experimentos para determinar la fosforilación de las caspasas 9 y 3 para saber si estas están activas a los tiempos en que se aumenta su expresión.
2. Determinar la expresión de caspasa 9 y 3 a tiempos más largos serviría para saber si su activación es un proceso cíclico, ya que se ha reportado que las células de CaCU en presencia de 100 UI/mL de IL-2 mueren después de tres días de cultivo.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A y Lichtman A. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. McGraw-Hill. España; 112-115.
- Alonso R, Lazcano P y Hernández A. (2000). *Cáncer Cérvico Uterino Diagnostico, Prevención y Control*. Medica Panamericana. México; 121, 254.
- Alvarado MJ. (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. FES Zaragoza, UNAM. México.
- Anderson P y Sorenson M. (1994). *Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2*. *Clin Pharmacokinet*, 27(1): 19-31.
- Archibal S. (1997). *Molecular Biology of Cancer. Oncogenes*. En: Vincent DeVita JR, Samuel H, Steven AR. *Cancer and Practice of Oncology*. 5ed . Philadelphia: Lippincott- Raven; 79-88.
- Arkin M, Randal M, De Lano W, Hyde J, Luong T, Oslob J, Raphael D, Taylor L, Wang J, Wells J, McDowell R, Wells J y Braisted A. (2003). *Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface* *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*; 1603-1608.
- ATCC: The Global Bioresource Center; <http://www.atcc.org>. 2010.
- Batista D. (2003). *Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos*. *Medisan* 7(2): 75-88.
- Becker W y Kleinsmith L. (2007). *El mundo de la célula*. 6º ed. Pearson Addison Wesley. México; 789-795.
- Ben E. (1999). *One hundred years of cancer Immunotherapy. A critical appraisal*. *Tumor Biology*, 20: 1-24.
- Bermúdez M, Peralta Z y Madrid M. (2005). *Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino*. *Salud Publica Mex*. 47: 458-468.

- 
- Cáceres C, Alvarado M, Waga K, Rangel C, Monrroy G, Rocha Z, Urdiales R, Weiss S y Haman A. (2001). Implication of tyrosine kinasa receptor and steel factor in cell density dependent growth in cervicalcancer and leukemias cancer research, 51: 6281-6289.
  - Calvino F y Parra T. (2010). Pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. Rev. Esp. Enferm. Dig 102: 41-50.
  - Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías M, Solorza G y Lizano M. (2004). Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Salud Publica México 46: 7-15.
  - Casadelvalle P. (2006). Apoptosis: una muerte silenciosa. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 37(1): 13-17.
  - Cascales A. (2003). Bases Moleculares de la apoptosis. Anal. Real Acad. Nal. Farm., 69 (1): 36-64.
  - Chen M y Wang J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. Apoptosis. Aug; 7(4): 313-9.
  - Chen Y y Hunter D. (2005). Molecular Epidemiology of Cancer. CA Cancer Journal Clinicians 55: 45-54.
  - De Robertis D. (2000). Biología Celular y Molecular. 13° ed. El Ateneo. Argentina; 426-441.
  - Del Río Ortíz Itzel (2011) La Interleucina 2 (IL-2) induce a muerte celular a líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Congreso de Posgrado, FES Zaragoza, UNAM. México.
  - Dutcher J. (2002). Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. Oncology. 16 (11): 4-10.
  - Earnshaw W, Martins L y Kaufmann S. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. Ann. Rev. Biochem. 68: 383-424.
  - Elinos B, Maldonado V y Meléndez J. (2003). Caspasas moléculas inductoras de apoptosis. Gaceta Médica Mexicana. 139: 493-499.

- 
- Enid S y Diosdado V. (2003). Apoptosis: El fenómeno y su determinación. *Téc Pecu Méx*, 41(1): 49-62.
  - Fadeel B y Orrenius S. (2005). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 258: 479-517.
  - 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.*
  - González B y Grañena A. (1996). Interleucina 2: un paso adelante en el tratamiento del cáncer. *Medicina Clínica*, 107 (15): 578-580.
  - Gómez A. (2003). *Biología Celular*. 2º ed. McGraw Hill- Interamericana. México; 360-365.
  - Guohua P, O'Rourke K, y Vishva M. (2000). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 Form a Ternary Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 273(10): 5841-5845.
  - Graham A, Thomas A, Edward T. (2006). Epidemiology — identifying the causes and preventability of cancer?. *Nature*, 6: 75-83.
  - 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.
  - 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. Oaxaca México.*
  - Howard Y y Xiaolu Y. (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 64: 821-846.
  - INEGI. En base de datos: Defunciones generales de mujeres por principales causas de mortalidad 2008; <http://inegi.org.mx/población/defunciones>.
  - Jastreboff T. (2002). Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 78: 225-8.

- 
- Jiménez G y Merchant L. (2003). *Biología Celular y molecular*. Person Educación. México; 617-654.
  - Jordán J. (2003). Apoptosis: Muerte celular programada. *Bioquímica*, 22(6): 100-6.
  - Kendall A, Helen L y Anthony W. (2002). Interleukin 2 (IL-2), of *enciclopedia of hormones*. Division of Immunology, Departamento of Medicine Weil Medical College of Cornell University, Nueva York, 1: 7.
  - Keisuke K. (2000) Caspasa 9, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 32(2): 121-124.
  - Koolman R. (2004). *Bioquímica. Texto y Atlas*. 3° ed. Medicina Panamericana. México; 245-247.
  - López S y Lizano S. (2006). *Cáncer Cérvicouterino y el Virus del Papiloma Humano: La Historia que no termina*. *Cancerología* 1: 31-55.
  - Martínez M. (2004). Epidemiología del cáncer del cuello uterino. *Med. Uni.*, 6 (22): 39-46.
  - Mavroukakis S, Muehlbauer P, White R y Schwartzentruber D. (2001). Clinical pathways for managing patients receiving Interleukin-2. *Cli. J Onco. Nur.*, 5(5): 207-217.
  - Meager A. (1991). *Cytokines*, Prentice Hall Advanced Referente Series. Nueva Jersey. EUA; 14-109.
  - Ministerio de Salud. (2004). *Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino*. Chile; 3.
  - Mohar A y Frías M. (2000). Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest* 18: 584-590.
  - Monroy G. (1991). Citotoxicidad de linfocitos de sangre periférica sobre células provenientes de tumores de cáncer cérvico uterino en presencia de interleucina-2 recombinante humana. Tesis de Maestría. ENEP, Zaragoza – UNAM. México.
  - Olivier M y Jüing T. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell*, 114: 181-190.

- 
- Olson M y Kornbluth S. (2001). Mitochondrial in Apoptosis and Human Disease. *Curr Mol Med* 1: 91-122.
  - Ortega C, Díaz F, Avalos R, Vergara O y Rosales T. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gaceta Médica de México*, 137(6): 563-77.
  - Ortiz A, Justo P, Sanz A, Lorz C y Egado J. (2003). Targeting apoptosis in acute tubular necrosis. *Biochem Pharmacol* 66: 1589- 94.
  - Panduro A, Armendáriz B, Ramírez B y Castro C. (2000). *Biología Molecular en la clínica*. Editorial McGRAW-HILL. Interamericana. México; 23-29.
  - Peto J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411: 390-395.
  - Porter G y Jänicke U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 6: 99-104.
  - Rangel C. (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares. Plaza y Valdés Editores. México; 143-160.
  - Rangel C, Corona O, Soto C, López L, Pablo A, Torres G, Weiss S. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine* 50: 273–277.
  - Regueiro G, López L, González R, Martínez N y López V. (2002). *Inmunología biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. Editorial medica panamericana. Madrid España; 217.
  - Riedl S y Salvesen G. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 405-413.
  - Rojas E. (2001). *Inmunología de memoria*. 2a ed. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina; 134-189.
  - Rojas L. (2009). Determinación de la expresión de la Interleucina 2 (IL-2) por RT-PCR en líneas celulares de Cáncer Cervico Uterino en diferentes estadios. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. México.
  - Sánchez H, Huerta P, Rivera T y Rosales P. (2005). Infección por VPH y cáncer cervicouterino. *Rev. Mex. de Pato. Clí.* 52: 222-223.
  - Schafer Z y Kornbluth S. (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell*. 10: 549-561.
-

- 
- Schwartzentruber D. (2000). Interleukin-2: Clinical Applications. Principles of administration and management of side effects. 3<sup>a</sup> ed. S.A. Rosenberg, ed. Principles and practice of the Biologic therapy of cancer. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 32-50.
  - Shi Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*. 25; 117(7): 855-8.
  - Stites P y Terr I. (1994). Inmunología humana y básica. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México; 121-122.
  - Strasser A, O'Connor L y Dixit V. (2000). Apoptosis signalling. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 217-245.
  - Tirado G, Mohar B, López C, García C, Franco M y Borges G. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres Mexicanas. *Salud Pública de México*, 47(5): 342-350.
  - Thompson E. (2005). Apoptosis. *Ann. Rev.* 60: 533-573.
  - Tovar G, Ortiz C, Jiménez G y Valencia V. (2008). Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México (1980-2004). *Rev. Fac. Med. UNAM* 51(2): 47-53.
  - Vázquez O, Piña S, Hidalgo A, Lazos M, Moreno J, Alvarado I, Cruz F, Hernández D, Pérez P y Salcedo M. (2005). Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. *Rev. Inve. Clí.* 57(3): 434-441.
  - Valle M. (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. FES Zaragoza, UNAM. México.
  - Yin Q, Park H, Chung J, Lin S, Graca L, Jiang X y Hao W. (2006). Caspase-9 Holoenzyme Is a Specific and Optimal Procaspase-3 Processing Machine. *Molecular Cell* 22: 259–268.
  - Zheng L, Jihoon J, Jie J, Shih C, Daniel J, Whitcomb, Song J, Kwangwook C y Morgan S. (2010). Caspase-3 Activation via Mitochondria Is Required for Long-Term Depression and AMPA Receptor Internalization. *Cell*, 141: 859–871.
  - Zur H. (2000). Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 92: 690-698.
-

## REFERENCIAS DE INTERNET

### Texto

- <http://inegi.org.mx/población/defunciones>
- <http://www.atcc.org>. 2010

### Imágenes

- <http://cancercuellouterino.com/2011/06/estadios-del-cancer-de-cuello-uterino.html>.
- <http://epidemiologiamolecular.com/14/02/2009/citocinas/>
- <http://www.oocites.org/hmontoliu/caspase/caspase-1.html>

## ANEXO 1

### Reactivos y Soluciones

#### Soluciones para cultivo

- RPMI-1640/10% SFB
- Solución fisiológica de verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)

#### Reactivos Extracción ARN Total

- Trizol (Invitroyen)
- Cloroformo (Sigma, Chem, EUA)
- Isopropanol (Sigma, Chem, EUA)
- Etanol 70% (Sigma, Chem, EUA)
- H<sub>2</sub>O inyectable
- H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (Promega)

#### Reactivos Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Invitrogen)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Invitrogen)
- dNTP's 5mM (Fermentas)
- Oligo dT (Promega)

#### Reactivos (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)

- dNTP's 10 mM (Fermentas)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers:  $\beta$ -actina (1:10), Caspasa 9 (1:5), Caspasa 3 (1:5) (Invitrogen)

#### Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular de 100-1000 pares de bases (Fermentas)
- Buffer de carga Blue/Orange 6X (Promega)
- Bromuro de etidio (Sigma, Chem, EUA)

## ANEXO 2

### Preparación de Reactivos y Soluciones

#### Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

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

#### Solución fisiológica de Verseno

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

-Tris base (Sigma, Chem, EUA)	3.04 gramos
-Cloruro de sodio (Sigma, Chen, EUA)	800 gramos
-Cloruro de potasio (Sigma, Chen, EUA)	0.40 gramos
-Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) (Sigma, Chen, EUA)	0.20 gramos

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

#### Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

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

-Cloruro de sodio (Sigma, Chem, EUA)	8.0 gramos
-Fosfato de sodio monobásico (Sigma, Chem, EUA)	2.88 gramos
-Fosfato de potasio (Sigma, Chem, EUA)	0.4 gramos
-Cloruro de potasio (Sigma, Chem, EUA)	0.20 gramos

El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 litro y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

#### dNTP's 10 mM (mezcla)

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

- 100 µl de A
- 100 µl de G
- 100 µl de T
- 100 µl de C

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de RNAsas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

#### TBE 10X

- 108 gramos de Tris base (Sigma, Chem, EUA)
- 55 gramos de Ácido bórico (Sigma, Chem, EUA)
- 40 mililitros de EDTA 0.5 M

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

#### EDTA 0.5 M

- 186.1 gramos de EDTA (Sigma, Chem, EUA)
- 1000 mililitros de agua destilada

Nota: disolver el EDTA en los 1000 mL de agua destilada y llevar a PH 8.

#### TBE 1X

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

TBE 0.5X

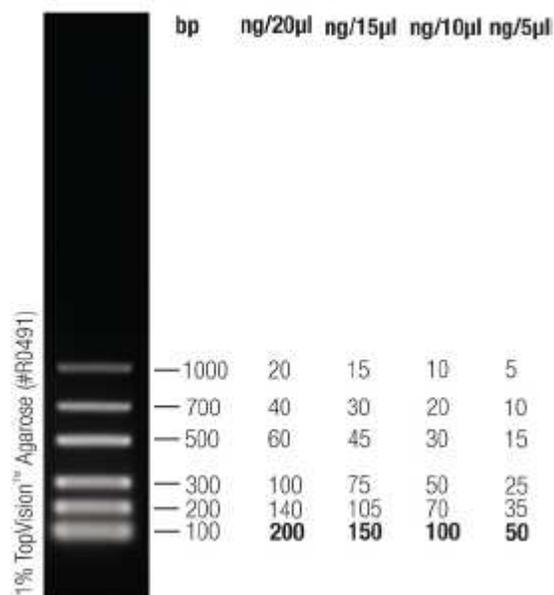
Tomar 250 mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250 mililitros de agua destilada.

Gel de agarosa 1.5%

-1.5 gramos de agarosa en 100 mililitros de TBE 1X

Marcador de Peso Molecular:

El marcadores de pesos moleculares ó escalera utilizado en la electroforesis fue de 100 a 1000 pb (Fermentas), utilizando 4 µl en el primer pozo por corrida.

**MassRuler™ Express LR Reverse DNA Ladder, ready-to-use**

10 µl/lane, 8 cm length gel,  
1X TAE, 7 V/cm, 30 min