

TESIS DE LICENCIATURA

**PARTICIPACIÓN DE CASPASA 8 Y 12 EN LA REGULACIÓN DE
APOPTOSIS
EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO,
CULTIVADAS EN PRESENCIA DE IL-2.**

Presenta:

SIERRA MONDRAGÓN EDITH

Obtener el grado de:

BIOLOGO

Director de Tesis.

C. a Dr. ROSALVA RANGEL CORONA

**LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR DE LA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER.**

L-4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **SIERRA MONDRAGÓN EDITH**, con número de cuenta **407080928**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **15** del mes de **noviembre** de 2011 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE DR. BENNY WEISS STEIDER
- VOCAL M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
- SECRETARIO M. C. RAÚL ZAVALA CHAVERO
- SUPLENTE BIÓL. CARLOS MARTÍNEZ MONTOYA
- SUPLENTE M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Participación de Caspasa 8 y 12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de cáncer cérvico uterino, cultivadas en presencia de IL-2.**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 11 de octubre de 2011

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES



ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

**PARTICIPACIÓN DE CASPASA 8 Y 12 EN LA REGULACIÓN DE APOPTOSIS
EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO,
CULTIVADAS EN PRESENCIA DE IL-2.**

Sierra Mondragón Edith

2011

“Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es
que no todos ignoramos las mismas cosas”.
Einstein.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer L-4 PB, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM".

Bajo la Dirección de la M. en C. **Rosalva Rangel Corona** y asesorada por el **Dr. Benny Weiss Steider**.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, clave de proyecto: IN220108 y del programa PAPIME de la DGAPA, clave de proyecto: PE208810

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico a toda mi familia por el amor y cariño que me han dado siempre.

A mis PADRES: Ma. Del Socorro y Miguel Andrés, ustedes que han estado conmigo en todo momento, aún en los momentos difíciles me han apoyado y brindado su amor incondicional. Mamá y Papá, gracias por su interminable apoyo, por sus enseñanzas, consejos y su eterna paciencia, por creer en mí, por darme una carrera para mi futuro y facilitarme el desarrollo de mis estudios que han culminado en la realización de esta TESIS.

Este trabajo es una pequeña forma de agradecer lo que ustedes me han dado, gracias porque, ustedes son lo más importante para mí, por ustedes soy lo que soy GRACIAS.

A mis HERMANOS: Andrés, Sergio, Maricela, Fredy, que forman parte de mi vida, por compartir tantos momentos juntos de risas, alegrías, peleas e incluso llanto, porque, a pesar de todo estamos juntos luchando cada uno por nuestros sueños.

A mis ABUELITOS y TIOS, que siempre han tenido una palabra de aliento para mí, y en especial a mi abuelita **Amalia**, por haber compartido 21 años de mi vida y que se estas orgullosa de mí, siempre tendrás un lugar en mi corazón, donde mantengo vivo tu recuerdo.

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

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de TESIS: M. en C. Rosalva Rangel Corona, por la excelente dirección del presente trabajo, por toda su paciencia y entrega al compartir los conocimientos que enriquecieron enormemente mi formación, por el apoyo y la confianza que me brindo durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros de mi Jurado:

Dr. Benny Weiss Steiler.

M. en C. Raúl Zabala Chavero.

Biól. Carlos Martínez Montoya

M. en C. Edgar Ledesma Martínez.

Por todas las sugerencias y observaciones recibidas, las cuales contribuyeron al enriquecimiento del presente trabajo

Al Sr. José: por su apoyo técnico, al mantener todo el material en orden.

A mis amigos que me han acompañado, y que han estado conmigo a lo largo de la carrera: **Ale, Claus, Gisela, Sony, Chava**, con los cuales he contado desde que los conocí, aunque a veces es un poco difícil vernos pero no imposible verdad, gracias por ayudarme y estar conmigo a lo largo de la carrera, y aun después...

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Leo, Luz, Tanis, Chen, Itzel, Jose Luis (Niño), Carlos, Edgar, Rubí, Miguel, Juan Carlos (el Profe), Eduardo Daniel, Adrián, etc., en especial a **Daniel R**, por tu incondicional apoyo, cariño, respeto y paciencia. A TODOS muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo en el L-4, donde he vivido momentos difíciles, felices y tristes, gracias por ser mis amigos.

Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean.....**GRACIAS FES-Zaragoza.**

ABREVIATURAS

- **AIF:** (apoptosis inducing factor), factor inductor de la apoptosis.
- **Apaf-1:** Factor activador de apoptosis-1, Homólogo de la proteína CED-4 del *C. elegans*.
- **APOPTOSOMA:** complejo oligomérico formado por Apaf 1-citocromo c y procaspasa 9
- **Bad:** Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, asociado a Bcl-X_L /Bcl-2
- **Bak y Bax:** Miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2
- **Bcl-2:** (*B-Cell lymphoma 2*) Miembro de la familia Bcl-2, identificada como producto del proto-oncogen bcl-2.
- **Bcl-XL.** Miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1
- **BH:** (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica.
- **BH3:** Dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.
- **BH4:** Dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2
- **Bid:** Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés *BH-3 Interacting domain Death*
- **BiK:** Del inglés *Bcl-2 interacting killer*.
- **Bim:** miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 comparte la secuencia de homología sólo en el dominio BH3
- **BIR:** (baculoviral IAP repeat) dominio muy conservado de 70 aminoácidos que es esencial para la actividad antiapoptótica de IAP
- **BrEt:** Bromuro de etidio.
- **Ca⁺²:** Calcio.
- **CaCU:** Cáncer Cérvico Uterino.
- **CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasas.
- **CASPASAS:** Cisteína proteasas específicas de aspartato. Enzimas proteolíticos que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a aspartato. Se conocen 14.
- **c-DNA:** DNA complementario
- **dATP:** Participa en el reclutamiento y activación de la procaspasa 9
- **DD:** Dominio de muerte.
- **DED:** Dominio efector de muerte.
- **DNA:** Acido desoxirribonucleico.
- **dNTPs:** Desoxinucleótido trifosfato.
- **ERK:** Cinasa reguladora de señal extracelular.
- **FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas.
- **FAS:** CD95/APO-1. Miembro de la super-familia de receptores de muerte TNF.
- **FASL:** Ligando del receptor de muerte Fas.
- **FBS:** Suero Fetal bobino
- **FLIP/FLICE:** Proteína inhibidora de FLICE/proteína ICE similar a FAS caspasa -8.
- **Grandzima:** Serina proteasa segregada por los linfocitos T
- **IAP,** inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.



- **ICAD/CAD:** Heterodímero inhibidor/desoxiribonucleasa, que para actuar como desoxiribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD.
- **ICE:** Proteína convertora de la Interleucina.
- **IL-2:** Interleucina 2
- **IL-2R:** Receptor de IL-2.
- **INF:** Interferón.
- **MAPK:** Cinasas de proteínas activadas por mitógenos.
- **NF- κ B:** Factor nuclear del locus Kappa de las inmunoglobulinas en células B.
- **Noxa:** Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.
- **Omi/HtrA2:** Del inglés *high temperatura required protein* .
- **PARP,** poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas.
- **PBS:** Tampón salino fosfato.
- **PCD:** Muerte celular programada.
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- **PERP:** Efectores de apoptosis de p53 relacionado a PMP
- **PI3K:** Fosfatidil Inositol 3 quinasa.
- **PIDD:** (Proteína Inducida por p53 con dominio de la muerte).
- **PMP:** Proteína polimorfa de membrana.
- **PS:** Fosfatidilserina.
- **PUMA:** proteína BH3.
- **RAIDD:** Proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte.
- **RE:** Retículo Endoplasmático.
- **RNA:** Ácido ribonucleico.
- **RNA_m:** RNA mensajero.
- **RNA_r:** RNA ribosomal.
- **Smac/DIABLO:** Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, /proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP.
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1.
- **TNF-R:** Receptor del Factor de Necrosis Tumoral.
- **TNFR-1:** Receptor de muerte del TNF.
- **TRADD:** Proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R1.
- **TRAF:** Factor asociado al receptor TNF.
- **TRAIL:** Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF.
- **TRIAL:** Ligando inductor de apoptosis con TNF.
- **VDAC:** (voltaje dependent anion channel), canal aniónico dependiente de voltaje.
- **XIAP:** proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis.
- $\Delta\Psi_m$: Potencial mitocondrial.



ÍNDICE

RESUMEN.....	- 5 -
INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
MARCO TEÓRICO.....	- 8 -
i. Morfología Apoptótica.....	- 8 -
ii. Mecanismos moleculares en el proceso apoptótico.....	- 10 -
iii. Maquinaria de la muerte celular:.....	- 10 -
iv. Familia de las Caspasas:.....	- 11 -
v. Mecanismos de activación de las caspasas:.....	- 14 -
vi. Acciones de las Caspasas en la apoptosis.....	- 17 -
vii. Vías de activación de la apoptosis.....	- 18 -
viii. Vía Intrínseca mediada por la mitocondria.....	- 18 -
ix. Proteínas reguladoras de la apoptosis en la vía intrínseca.....	- 19 -
x. Vía Intrínseca mediada por Estrés en el Retículo Endoplasmático.....	- 22 -
• CASPASA -12.....	- 23 -
xi. Vía Extrínseca y Receptores de muerte.....	- 24 -
• CASPASA -8.....	- 26 -
xii. Proteínas reguladoras de la apoptosis en la vía extrínseca.....	- 29 -
xiii. Cáncer y Apoptosis.....	- 30 -
xiv. Cáncer Cérvico Uterino.....	- 31 -
xv. Inmunoterapia Vs el Cáncer Cérvico Uterino.....	- 32 -
JUSTIFICACIÓN.....	- 34 -
HIPÓTESIS.....	- 35 -
OBJETIVOS.....	- 36 -
MÉTODO.....	- 37 -
RESULTADOS.....	- 42 -
I. Integridad del RNA en líneas celulares de CaCU.....	- 42 -
II. Expresión de β-actina en líneas celulares de CaCU.....	- 43 -
IV. Expresión de Caspasa -8 en línea celular INBL.....	- 45 -
V. Expresión de caspasa -12 en la línea celular CALO.....	- 46 -
VI. Expresión de caspasa -12 en la línea celular INBL.....	- 47 -



VII. Expresión de caspasa -12 en la inducción de Apoptosis por Estrés celular en diferentes líneas celulares. - 48 -

CONCLUSIONES..... - 57 -

PERSPECTIVAS..... - 58 -

APENDICE I. - 59 -

APENDICE II..... - 61 -

APENDICE III..... - 62 -

BIBLIOGRAFIA. - 64 -

RESUMEN

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) es una enfermedad neoplásica maligna que se origina en el cérvix uterino y cuya progresión natural lleva a la muerte. En los países en vías de desarrollo el CaCU está todavía asociado a una alta mortalidad, en México ocupa uno de los primeros lugares entre los tumores malignos en la población femenina, con 16.6%.

Por otro lado, la Inmunoterapia representa actualmente una alternativa terapéutica para el cáncer, con algunas ventajas sobre la terapia convencional, como la especificidad. Para ello se han utilizados citocinas como la interleucina-2(IL-2) recombinante que estimula células NK, y linfocitos T para inducir una respuesta citotóxica de rechazo tumoral.

Al respecto, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que de acuerdo a su concentración IL-2 exógena tiene un efecto dual en células de CaCU; en dosis bajas 5-10UI/mL hay un aumento en la proliferación celular y en altas dosis 100- 500UI/mL presenta un efecto anti-proliferativo. Las células expuestas a 100UI/mL de IL-2 muestran características de muerte por apoptosis, sin embargo, desconocemos el mecanismo molecular por medio del cual IL-2 induce la muerte de las células estas líneas de CaCU.

Tomando en cuenta, que los principales reguladores de la apoptosis son proteínas de Cistein-proteasas denominadas CASPASAS, las cuales son las encargadas del suicidio celular durante el proceso apoptótico. Por lo antes mencionado en este trabajo se estudió el efecto de 100UI/mL de IL-2, sobre la expresión del RNAm para caspasa -8 y -12 en cultivos a diferentes tiempos de las líneas de CaCU, CALO e INBL, ya que son algunas proteínas involucradas en el proceso apoptótico.

Nuestros resultados muestran que la expresión del mensajero para caspasa -8 es regulada por 100UI/mL de IL-2 en ambas líneas celulares de CaCU. En la línea celular CALO (estadio clínico IIB) existe una mayor expresión del mensajero para esta caspasa a 30' y 2h en comparación con el control (células no cultivadas en ausencia de 100UI/mL de IL-2). En la línea celular INBL (estadio clínico IVB), se observa un aumento en la expresión del RNAm a 48h y 96h a diferencia de control. Este hecho indica que la expresión del mensajero para caspasa -8 es dependiente del estadio clínico de las células, en donde aquellas provenientes de tumores en estadio temprano serían más sensibles a ser inducidas a apoptosis por IL-2.

Para el caso de la expresión del mensajero para caspasa -12, caracterizada por su participación en la muerte celular apoptótica mediada por estrés en el Retículo Endoplasmático, no encontramos expresión de su mensajero en ninguno de las dos líneas celulares, lo que indicaría que IL-2 no regula la muerte celular por la vía de estrés en el Retículo Endoplasmático.



De esta manera podemos concluir que 100UI/mL de IL-2, induce apoptosis en líneas celulares de CaCU, mediada por la participación de caspasa-8, y que la regulación de la expresión es inversamente proporcional al estadio del tumor, es decir, a menor estadio mayor expresión del RNAm para caspasa -8.

Por lo cual, el tratamiento con IL-2 para pacientes con Cáncer Cérvico Uterino se muestra como una alternativa terapéutica prometedora, para inducir la muerte por apoptosis de tumores en estadios tempranos. Y al mismo tiempo activar la respuesta inmunológica del paciente por la presencia de IL-2, ya que se sabe ha sido utilizada con mucho éxito para la generación de células citotóxicas con actividad antitumoral.

INTRODUCCIÓN.

A pesar del uso generalizado de la prueba del Papanicolaou y el uso de la vacuna para el HPV, el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) sigue siendo el cáncer más común en mujeres menores de 45 años de edad en los países en vías de desarrollo. Además casi la mitad de todas las mujeres con CaCU invasivo se diagnostican en etapas tardías (Won et al, 2010).

Actualmente se emplean terapias biológicas en pacientes con cáncer, en particular en nuestro grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología celular L-4 UMIEZ FES-Zaragoza UNAM, bajo la línea de investigación en Inmunoterapia contra el CaCU, ha empleado la citocina IL-2 como un agente antineoplásico, y se ha reportado que el uso de esta citocina a concentraciones altas (100UI/mL) inhibe la proliferación celular de células de CaCU y que las induce a muerte celular por apoptosis.

La apoptosis juega un papel esencial en la supervivencia de los organismos y es considerado como un componente imprescindible de varios procesos, incluyendo el recambio celular normal, el desarrollo, funcionamiento y mantenimiento de tejidos y del sistema inmunológico, el desarrollo embrionario normal, la eliminación de las células dañadas, infectadas, viejas, o que simplemente necesitan ser reemplazadas (Reed y Tomaselli, 2000; Elmore, 2007, Asfar, 2009; Lindsey, 2009). En dicho proceso se activan dos vías de señalización (vía extrínseca o vía intrínseca), cuya activación puede ser iniciado por una gran variedad de estímulos extracelulares o intracelulares (Kruidering, 2000).

La apoptosis ha sido reconocida como un modo típico e importante de Muerte Celular Programada (PCD), lo que implica que la eliminación de las células es genéticamente regulado y determinado (Guicciardi y Gore, 2009).

Las anomalías en la regulación de muerte celular puede ser un componente importante de enfermedades como el cáncer, el síndrome linfoproliferativo autoinmune, el SIDA, Isquemia y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington (Norbury y Zhivotovsky, 2004; Batista et al, 2009).

El proceso apoptótico es altamente complejo en el cual interviene decenas de proteínas encargadas del suicidio celular y para esclarecer el efecto de IL-2 en la inducción de apoptosis en células de CaCU, el presente estudio, como principal objetivo en determinar la participación de caspasa -8 y -12 en la regulación de la apoptosis mediada por IL-2. Dichas caspasas activan vías apoptóticas diferentes (Caspasa -8 vía extrínseca, Caspasa -12 vía intrínseca- RE) por lo cual la evaluación de su expresión por IL-2 nos proporcionó datos importantes para comprender el mecanismo molecular apoptótico desencadenado por ésta citocina en células de CaCU.

MARCO TEÓRICO

El cuerpo humano adulto genera aproximadamente 60 billones de células por día y por lo tanto un número igual de células debe morir para mantener la homeostasis celular, la cual consiste en el balance entre las células generadas por mitosis y la muerte celular inducida por apoptosis (Cotter, 2009). En ciertos procesos el número de células que mueren por apoptosis puede aumentar significativamente; el desarrollo normal y el envejecimiento ó durante la enfermedad (Renehan et al, 2001).La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios en la arquitectura celular que no solo contribuye a la muerte celular sino también prepara la eliminación por fagocitos y evita una respuesta inmune no deseada (Taylor, 2008).

El estudio de la apoptosis se inicia en los años 1800, inicialmente el concepto de muerte celular fue descrito por Carl Vogt en 1842, después de estudiar el desarrollo en ranas. La primera descripción morfológica sobre la apoptosis fue dada en 1885 por Walter Fleming, cuyos elegantes dibujos mostraron el encogimiento celular, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpo apoptóticos, los cuales ahora son aceptados como huellas de la apoptosis. Y no fue hasta 1972 que Kerr, Wyllie y Alister Currie colaboraron y juntos caracterizaron y definieron esta forma de muerte celular denominándola "apoptosis"(Cotter, 2009). Los primeros avances en la caracterización molecular del proceso de muerte apoptótica surgieron de los estudios genéticos en el nematodo *C. elegans*. La activación y regulación de la apoptosis en organismos superiores depende de los correspondientes homólogos a los encontrados en *C. elegans*, pero con un grado de complejidad mayor (Liu y Hengartner, 1999).*C. elegans* es un organismo de 1090 células somáticas que se generan en la formación de los gusanos adultos, de los cuales 131 de estas células sufren apoptosis o muerte celular programada. "Estas 131 células mueren en puntos concretos durante el proceso de desarrollo, lo cual demuestra la notable precisión y control en este sistema (Formigli et al 2000 ; Sperandio et al 2000; Debnath et al 2005).

i. Morfología Apoptótica.

• Cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares durante la apoptosis.

Durante la apoptosis, se dan una serie de cambios en la estructura celular que afecta dramáticamente la morfología de la célula, estos cambios son característicos dentro este tipo de muerte celular (Fig. 1). Las células se encogen y pierden contacto con células vecinas. Se han descrito reducciones en el volumen celular de incluso el 30%. Esto es provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula, debido a la inhibición del sistema cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- (Kurosaka et al., 2003).

Las cisternas del retículo endoplasmático liso se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática, pero el resto del RE y de los demás organelos celulares permanecen intactos. Existen cambios en la superficie de la membrana plasmática y comienza la formación de protuberancias (blebbing), para dar origen a vesículas pequeñas llamadas "cuerpos apoptóticos", que son finalmente removidos por fagocitosis. Los cuerpos apoptóticos presentan una membrana intacta, manteniendo dentro de ellos a los organelos celulares como mitocondrias y cuerpos densos granulares que corresponden a fragmentos nucleares, los cuales también se producen por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear (Taylor et al, 2008).

Dentro de los cambios bioquímicos y moleculares que sufre la célula tenemos: La fragmentación nuclear por las endonucleasas endógenas que rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales, estos fragmentos son escindidos en regiones ricas en adenina/timina (A/T) localizados en sitios de andamiaje nuclear dando fragmentos entre 180-200pb. Esto produce el característico patrón de DNA en escalera cuando se analiza una electroforesis y se utiliza como marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis (Danial y Korsmeyer 2004; Guimaraes y Linden, 2004). La cromatina se comienza a condensar y se acumula en la periferia del núcleo. Además el nucléolo se desintegra en partículas osmiófilas (Savill y Fadok, 2000).

La fosfatidilserina (PS), presente en la cara interna de la membrana plasmática, pasa al exterior de la superficie celular, recientemente se ha propuesto que además de PS se libera otro fosfolípido, posiblemente Lisofosfatidilcolina (LPC), que actúa como quimio-atrayente ayudando al reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas (Kruidering, 2001; Leyton y Quest, 2004). Esencialmente no hay reacción inflamatoria asociada con el proceso de la apoptosis, ni con la eliminación de células apoptóticas debido a que: (1) las células apoptóticas no liberan sus componentes celulares en el tejido intersticial que rodea, (2) son rápidamente fagocitadas, y (3) la fagocitosis de las células apoptóticas no producen citocinas inflamatorias (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka et al, 2003).

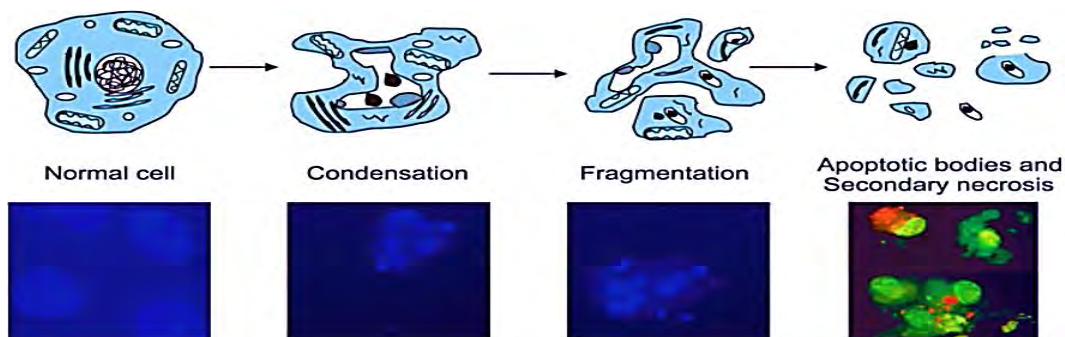


Fig. 1.- Características de una célula en apoptosis.

Disminución del volumen celular, la cromatina se empieza a condensar, aparecen repliegues en la membrana plasmática a consecuencia de sus deformaciones, la cromatina se dispone en la periferia del núcleo, fragmentación de la cromatina, fragmentación del núcleo y formación de los cuerpos apoptóticos compuestos por membrana plasmática que engloba material nuclear y citoplasmático. "Tomado de Padanilam, 2003".

ii. Mecanismos moleculares en el proceso apoptótico.

Los mecanismos de la apoptosis son altamente complejos y sofisticados, dependiente de la energía en cascada de eventos moleculares. Hasta la fecha, la investigación indica que hay dos principales vías de apoptosis: la muerte mediada por receptores o vía extrínseca y la vía intrínseca: mitocondrial o del Retículo Endoplasmático (Igney y Kramer, 2002). Sin embargo, ahora hay pruebas de que las dos vías están vinculadas y que las moléculas en una vía pueden influir en la otra. Ambas rutas de señalización convergen, finalmente, en una maquinaria común constituida por una familia de cisteín proteasas llamadas **caspasas** que se consideran los efectores centrales del proceso apoptótico (Vogelstein y Kinzler, 2004). Los estudios realizados en los últimos 10 años han revelado una compleja red de moléculas (la máquina de muerte) que funcionan para dismantelar las células desde el interior en las circunstancias adecuadas. La maquinaria de la muerte puede ser activada por diversos estímulos (Mraegt y Martin, 2001).

A nivel molecular, el programa de muerte celular puede ser dividido en tres fases: Iniciación, Ejecución y Eliminación de la apoptosis:

- **Fase Iniciación:** En esta fase la célula integra los estímulos de señales proapoptóticas tanto internas como externas. La apoptosis puede ser iniciada por una gran variedad de estímulos, incluyendo la retirada de factores de crecimiento, rayos UV o de irradiación γ , medicamentos quimioterapéuticos, receptores de muerte entre otros, no presenta ningún evento morfológico, por lo que es difícil de observar (Kueger et al, 2001).
- **Fase de Ejecución:** Esta fase representa el momento en el cual la célula sufre todos los cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares (descritos anteriormente) se hacen evidentes. Los mediadores de esta fase son las caspasas.
- **Fase de Eliminación:** Los "cuerpos apoptóticos" son removidos por los fagocitos.

iii. Maquinaria de la muerte celular:

- **CASPASAS: Expertas en la demolición celular.**

El nombre de caspasa proviene del inglés, caspase o *Cystein-dependent aspartate-specific protease* (Alnemri et al, 1996). Son unas proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución (Stennicke y Salvesen, 1998). Las caspasas están normalmente presentes en las células sanas como precursores inactivos de enzimas (zimógenos) con poco o nula de su actividad proteasa y deben someterse a procesamiento proteolítico y activación durante la apoptosis (Creagh et al, 2003).

Las caspasas se vieron implicados por primera vez como componentes de la maquinaria de muerte celular por estudios realizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Aunque la función principal de las caspasas es causar muerte celular también son necesarios para algunos procesos no letales como: la diferenciación celular, proliferación y activación NF- κ B (Lamkanfi et al, 2007; Cohen, 1999).

Estas proteínas contienen tres dominios funcionales; un prodominio N-terminal, una subunidad mayor de 20kDa que contiene el centro activo formado por una cisteína dentro de un motivo altamente conservado "QACXG", y una subunidad pequeña en el extremo C-terminal de 10kDa separadas en la mayoría de las pro-caspasas por una región que será eliminada al activarse (Fig. 2), bien por auto-proteólisis o a través de otros miembros de la familia (Kang et al, 2002; Rai et al, 2005). Hasta el momento se han identificado 14 caspasas diferentes en mamíferos (Fig. 3), que se pueden clasificar en tres grupos funcionales, tales como: 1) Caspasas **iniciadoras** (por ejemplo, **CASP -2, -8, -9, -10, -12**), que son generalmente consideradas como las responsables de iniciar las cascadas de activación durante la apoptosis. Estas caspasas tienden a tener pro-dominios largos N-terminal, los cuales presentan motivos de interacción proteína-proteína que son los Dominios Efectores de Muerte (DED) Caspasa -8 y -10 los cuales están unidos mediante interacciones hidrofóbicas y los Dominios de Reclutamiento de Caspasas (CARD) Caspasa -1, -2, -9, -12, unidos mediante interacciones electroestáticas.

2) Caspasas **efectoras** (por ejemplo; caspasa -3, -6 y -7), que se cree que son responsables de la demolición efectiva de la célula durante la apoptosis y, 3) Caspasas **inflamatorias** éstas participan en la activación de citocinas inflamatorias (**CASP-1,-4,-5, -11, -12 y -13**) (Rai et al, 2005; Elmore, 2007; Martinon y Tschopp, 2007; Pop y Salvesen, 2009).

Otras caspasas que han sido identificados incluyen a la caspasa-11, de la cual se ha reportado que puede regular la apoptosis y la maduración de citocinas en el shock séptico, la caspasa-12, que media la apoptosis específica del retículo endoplásmico y la citotoxicidad de amiloide- β , y la caspasa-13, que se sugiere un gen de la especie bovina, y la caspasa-14, que es altamente expresado en los tejidos embrionarios, pero no en los tejidos adultos (Hu et al, 1998; Nakagawa et al, 2000; Koenig et al 2001; Kang et al 2002).

iv. Familia de las Caspasas:

La importancia de las caspasas como responsables de los procesos de apoptosis fue establecida por Robert Horvitz y sus colaboradores, al comprobar que el producto del gen *ced-3*, una cisteín-proteasa homóloga a ICE que se encuentra en *C. elegans*, estaba implicada en los procesos de muerte celular que se dan durante el desarrollo de dicho nematodo. Además, esta

proteína sobre-expresada en mamíferos era capaz de inducir por sí sola el proceso apoptótico (Yuan et al, 1993).

- **CASPASA -1.** Fue la primera en descubrirse fue la enzima convertidora de Interleucina- 1- β (ICE), conocida desde entonces como caspasa-1, responsable de la maduración de la prointerleucina-1- β convirtiéndola a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa (Miura et al 1993).
- **CASPASA -2.** Es la segunda caspasa en ser identificada, contiene un prodominio CARD y es activada por el complejo llamado PIDDsoma, el cual recluta a RAIDD por medio de los prodominios (Ahmad, 1997; Ghavami, 2009). Las proteínas adaptador RAIDD y PIDD (Proteína Inducida por p53 con dominio de la muerte) en este complejo son componentes esenciales para la activación de la caspasa-2 (O'Reilly, 2002). La función de caspasa -2 es aún poco conocido. Es capaz de responder a una variedad de estímulos de apoptosis y es por la interacción mediada de RAIDD con FAS (Degterev, 2003). Una de las características más singulares de la caspasa-2 es la localización del núcleo y el aparato de Golgi, además de citosol, Sin embargo, la caspasa-2 parece actuar antes del proceso de permeabilización mitocondrial por ruptura y la activación de BID, y desempeña un papel importante de lesiones del DNA inducidas por la apoptosis (Baliga, 2003; Mancini, 2000). Sin embargo, la caspasa-2 en modelos animales Knock-Out, no es realmente esencial para la muerte celular (Zhang, 2007).
- **CASPASA -3, -6, -7:** Estas tres caspasas efectoras son altamente homólogos entre sí. Dentro de sus funciones también son similares en la ejecución de la apoptosis. Mientras que la caspasa-3 ha sido ampliamente estudiada, conocemos mucho menos de la caspasa-6 y -7. Ninguno de ellos puede controlar totalmente la ejecución de todos los aspectos de la apoptosis (Lakhani, 2006). La caspasa-3 es el ejecutor principal, que se activa después de la escisión por la caspasa -8/-9 (Fuentes, 2004), pero no puede ser escindida por la caspasa -2 (Kummar S, 2007), la caspasa-6 y -7 pueden tener efectos distintos en las vías específicas, tales como la función especial de la caspasa-7 en la apoptosis inducida por estrés del RE (Rao, 2001). La función de la caspasa-6 sigue siendo un misterio ya que no parece ser esencial para la apoptosis inducida por diversos agentes. En estudios anteriores, ha demostrado que caspasa-6 es necesaria para la división de apoptosis de lámina A. Sin embargo, la caspasa-6 en ratones Knock-outs se desarrollan normalmente y en células deficientes de caspasa-6 en linfoma de pollo son sensibles a la muerte por drogas citotóxicas (Slee, 2001; Loegering, 2006).
- **CASPASA -9:** Ha sido ampliamente estudiado en los últimos 12 años. Es un componente clave de la vía de la muerte mitocondrial (la vía intrínseca) que está regulado principalmente por la familia Bcl-2 y la BH-3- only (Fuentes, 2004; Degterev, 2003). En esta vía el citocromo c

es liberado de la mitocondria, y es reclutado para el receptor citoplasmático, APAF1 (Acehan, 2002). En presencia de dATP o ATP, citocromo C y APAF1 se ensamblan en un complejo llamado "apoptosoma". Procaspasa-9 se une a APAF1 a través de su dominio CARD y se activa por la interacción recíproca con otra procaspasa -9. Luego la caspasa-9 en el complejo apoptosoma rompe y activa la caspasa-3 (Marsden et al, 2004; Ekert et al, 2004; Baliga y Kummar, 2003).

- **CASPASA-10:** Al igual que la caspasa-8, caspasa-10 posee prodominios DEDs, y puede ser reclutados por DISC, como la caspasa-8 y activada por los receptores de la muerte. También puede activar a BID y activar la vía mitocondrial, lo que sugiere que puede tener una función de superposición con la caspasa -8 (Kischkel et al, 2001; Milhas et al, 2005). También se ha demostrado que Caspasa -10 puede sensibilizar a las células para inducir las a apoptosis por TRAIL. Recientemente, la caspasa-10, junto con la caspasa-8, ha demostrado ser esencial para mediar la señalización de NF- κ β , dependiente de la respuesta inflamatoria en la señalización de antivirales (Engels et al, 2005; Takahashi et al, 2006).
- **CASPASA -4, -5, -11:** Caspasa -1, -4, -5, -11 y forman parte del llamado grupo de "caspasas inflamatorias". Caspasa-11 es una enzima murina que comparte muchas similitudes con caspasa-4 y -5. Se ha demostrado que la caspasa-11 puede procesar directamente la caspasa-3 durante la isquemia y el shock séptico, además de la regulación de la activación de la caspasa -1(Kang, 2002).

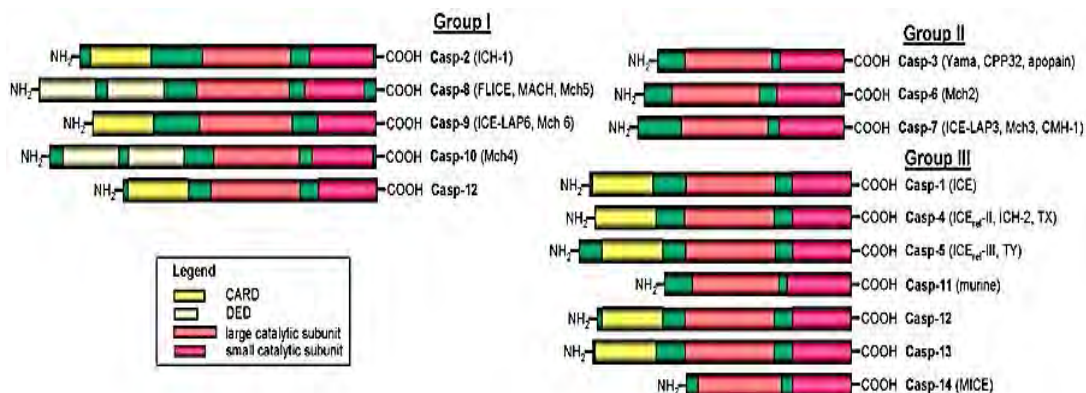


Fig. 2.- Familia de las Caspasas.

Hay tres grupos principales de las caspasas: **Grupo I:** caspasas Iniciadoras de la apoptosis. **Grupo II:** Caspasas Efectoras de la apoptosis. **Grupo III:** caspasas Inflamatorias. "Tomado de Lavrik et al, 2005 y modificado de Sierra M, 2011".

v. Mecanismos de activación de las caspasas:

Una vez llegada la señal apoptótica se activan diversas caspasas mediante una cascada de activación secuencial, lo cual sirve para amplificar la señal de muerte y puede ser regulada a varios niveles. Los mecanismos de activación pueden ser trans-activaciones, por cortes proteolíticos por parte de otras caspasas o por autoactivación (Caballero y Moran 2002). Para la maduración de los zimógenos se requieren de un mínimo de dos cortes, uno que separe el prodominio de la subunidad grande y otro que separe la subunidad pequeña. La enzima ya madura, es un heterotetrámero compuesto por dos heterodímeros constituidos por dos sitios catalíticos que funcionan de manera independiente. Entre cada dominio catalítico las subunidades grande y pequeña están íntimamente asociadas y ambas contribuyen con los residuos necesarios para la unión al sustrato y catálisis (Fig. 3) (Thornberry y Lazebnik 1998; Hengartner 2000). La presencia de residuos de aspártico en los sitios de separación de las subunidades se relaciona con la capacidad de las caspasas para auto-activarse o ser activadas por otras caspasas dentro de la cascada apoptótica (Pistritto et al, 2002).

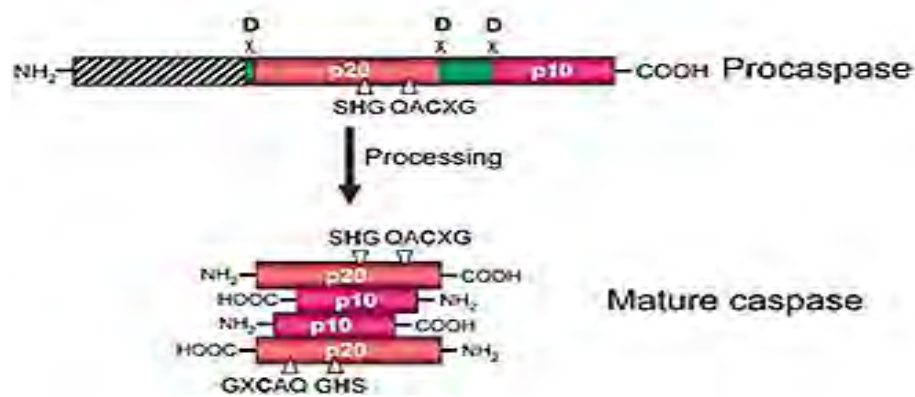


Fig. 3.-Esquema de la estructura y activación de una caspasa.

Una procaspasa está conformada por una subunidad grande (20KD) y una Pequeña (10KD). La escisión de la procaspasa en sitios específicos de Asp-X conduce a la formación de la caspasa madura que abarca la heterotetrámero. "Tomado de Lavrik et.al., 2005"

La clave para entender la apoptosis se encuentra con la comprensión de los mecanismos de activación de las caspasas, sus sustratos, y los controles celulares que regulan la actividad de las caspasas. (Donepudi et al. 2003; Shi Yigong, 2004). Como en cualquier vía proteolítica de múltiples pasos, las caspasas se activan por proteólisis. La conformación del zimógeno en las caspasas son bastante similares, al igual que la conformación de la forma activa, pero los mecanismos activación entre las caspasas Iniciadoras y Efectoras son sustancialmente diferentes, se ha propuesto el mecanismo de activación por dimerización para las iniciadoras y Activación por escisión para las efectoras (Pop y Guy, 2009; Riedl, y Salvesen, 2007).

- **Activación por dimerización:**

Ocurre principalmente en **caspasas iniciadoras** las cuales se encuentran en monómeros inertes que requieren homo-dimerización para su activación (Oberst, et al, 2008). Este es un modelo de activación por proximidad, conocido como dimerización inducida por proximidad, y se propuso este mecanismo unificado para la activación de las caspasas iniciadoras (Boatright y Salvesen, 2003; Shi, 2004).

La dimerización de estas caspasas se ve facilitada por la participación ciertas proteínas en la formación de complejos, los cuales activaran a las caspasas oligoméricas que se reúnen después de una señal de apoptosis (Renatus et al, 2001; Boatright et al, 2003; Shi, 2004). La adaptación y asociación de proteínas para la formación de estos complejos, ocurre cuando sus prodominios se unen específicamente, los cuales pueden ser los DEDs (Dominios Efectores de Muerte) de la caspasa-8 y -10 y CARDs (Dominios de Reclutamiento de Caspasas) de la caspasa-1, -2, -9, -12. Estos dominios les sirven para unirse a otras proteínas o "plataformas de activación", que al reclutar moléculas de caspasas, las acercan permitiendo su activación. El reclutamiento exige un aumento local de la concentración de la caspasa y genera la actividad por la dimerización inducida por proximidad (Stefan y Yigong, 2004; Pop y Salvesen 2009).

Cada caspasa iniciadora tiene la formación de su propio complejo o plataforma de activación, por ejemplo los prodominios DEDs (Dominios Efectores de Muerte) de las caspasas - 8 y -10 con DD (Dominios de Muerte) de proteínas adaptadoras como FADD son necesarias para el montaje del complejo inductor de muerte: **DISC** que es indispensable para reclutar y activar de caspasa-8 y caspasa-10 (Peter y Krammer et al, 2003; Wang, 2001), algo similar ocurre con caspasa-9 la cual requiere la formación del **Apoptosoma** para su activación. Otro complejo importante es el **PIDDosoma**, el cual está involucrado en la activación de la caspasa-2 (Tinel y Tschopp, 2004; Shi, 2004). Las caspasas inflamatorias son probablemente activadas por un mecanismo de dimerización inducida similar. Estudios recientes han conducido a la identificación de un complejo multiproteico llamado **Inflamasoma** (Tschopp et al, 2003; Shi, 2004), con afinidad en prodominios CARDs de la caspasa-1, -4 y -5 lo que facilita la activación de las caspasas pro-inflamatorias involucradas en el procesamiento de las citocinas (Fig. 4) (Martinon y Tschopp 2007).

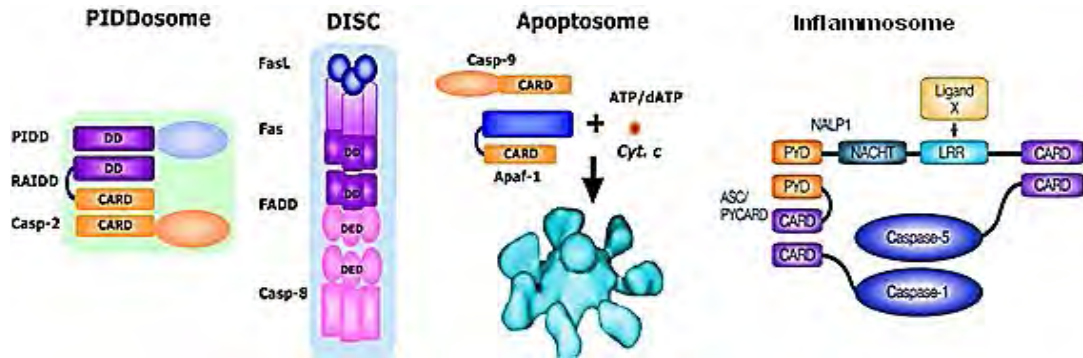


Fig. 4.- Complejos Adaptadores de proteínas.

Son los responsables de la activación de las caspasas iniciadoras el PIDDsoma es responsable de activar a caspasa-2 y tiene al menos tres componentes; PIDD, RAIDD y la caspasa -2, EL DISC (Complejo inductor de muerte) activa a caspasa -8 o 10, formado por un Receptor de muerte y una proteína adaptadora FADD, Caspasa -9 se activa con ayuda del APOPTOSOMA el cual está compuesto por siete moléculas de Apaf-1 ligado al citocromo C en presencia de ATP/dATP. Y EL INFLAMOSOMA el cual está unido a los prodominios CARDS de las caspasas 1 y 5 a los CARDS de los NALPs. "Tomado de Shi, 2005 y modificado por Sierra M, 2011"

- **Activación por escisión**

Las caspasas efectoras son a menudo activadas por otras proteasas, comúnmente por caspasas iniciadoras, pero también pueden ser activadas por otras proteasas por ejemplo Granzima B, o Calpaínas. La activación de una caspasas efectora es a través de la escisión proteolítica en un determinado residuo de ácido aspártico, para separar las subunidades pequeñas y grandes, para la maduración de la caspasa (Shi, 2005). Con base en la caracterización bioquímica y estructural, una caspasas efectoras se sabe que existe constitutivamente como un homodímero, tanto antes como después de la escisión dentro de la cadena de activación (Shi, 2002).

La evidencia más esclarecedora para la activación de las caspasas efectoras proviene de las estructuras cristalinas de la forma de cimógeno de la caspasa-7, que revelan los detalles moleculares de la formación del surco catalítico sobre la activación y el procesamiento proteolítico, el cual se manifiesta desde el cambio en la conformación del sitio activo después de la escisión de activación revelando un mecanismo molecular general para la activación de las caspasas efectoras (Chai et al, 2001). *In vivo*, los activadores rio arriba en la señalización de las caspasas efectoras son las caspasas iniciadoras de la apoptosis (caspasa-8, -9 y -10) y la proteasa Granzima B, liberada por los linfocitos T citotóxicos. Lo que genera los cortes para separar las subunidades grandes y pequeñas, lo que conduce a la unión del sustrato y la catálisis (Riedl et al, 2001). Las caspasas reconocen en sus sustratos una secuencia de al menos cuatro aminoácidos P4-P3-P2-P1 y cortan después del aminoácido carboxi-terminal, P1, que es el residuo de aspártico. El residuo P3 suele ser una glutamina, y los residuos P2 y P4 son variables, por lo que la secuencia de especificidad de corte de una caspasa será X-Glu-X-Asp. Los aminoácidos de la enzima que se unen al sustrato y que, por tanto, reconocen la secuencia P4-P3-P2-P1 se denominan S4-S3-S2-S1. S1 y S3 son residuos muy conservados en las diferentes caspasas, al contrario que S2 y S4, que varían significativamente entre las caspasas y originan las diferentes

especificidades por el sustrato en función de los residuos situados en las posiciones P2 y P4 (Degterev et al, 2003; Yan y Shi , 2005).

vi. Acciones de las Caspasas en la apoptosis

La importancia de las caspasas en el proceso de apoptosis radica en que, como se mencionó antes, proteolizan de forma selectiva sustratos, muchos de ellos vitales para la supervivencia de la célula, sobre los que tienen dos efectos activación o inactivación. Dado que el papel de las caspasas se desarrolla en la apoptosis desencadenando los principales cambios morfológicos, no es difícil pensar que muchas de las proteínas que regulan la apoptosis son sustratos de las caspasas. Entre sus acciones hay que destacar: (Taylor, et al, 2007).

- Inactivación de proteínas del citoesqueleto: laminina, actina, gelsolina, vicentina etc.), y en la estructura de la envuelta nuclear (Rao et al, 1996; Buendia et al, 1999).
- Otro de los sustratos es el inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasas (ICAD) (Liu et al. 1997; Sakahira et al. 1998; Enari et al. 1998). La proteólisis de este inhibidor permite la activación de la subunidad catalítica (CAD) que provoca la típica fragmentación internucleosomal que se observa en los procesos apoptóticos. Las caspasas también cortan proteínas implicadas en el correcto metabolismo y reparación del DNA, como por ejemplo la Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) y DFF etc. (D'Amours et al, 2001; Benchoua et al, 2001).
- Activación por proteólisis de Bid, que activado por caspasa-8, se transloca a la mitocondria para cooperar con Bax y Bak provocando la liberación de moléculas apoptóticas mitocondriales.
- Caspasa-3 es capaz de cortar a Bcl-2, quitando su dominio intermembrana y dejando siempre expuesto su dominio BH3, lo que la convierte en una molécula proapoptótica al igual que Bax.
- Inactivación de NF- κ B, lo que bloquea la transcripción de genes de supervivencia, mediante el corte en la zona de regulación de su inhibidor I κ B y también por corte directo de p65.
- Estabilización de p53 por corte del inactivador de MDM2 (inhibidor de P53) lo que facilita la acción de p53.
- Inactivación de Rb con lo que E2F está activo.

- El corte de MEKK-1 (cinasa activada por mitogenos/ERKcinasa) provoca un cambio en su acción (principalmente es de supervivencia) ante respuestas de estrés, al ser cortada promueve la apoptosis.

Además, de estos sustratos, existen muchos otros. De hecho, en un reciente estudio se realizó un screening de sustratos en el que se identificaron alrededor de 400 dianas de caspasas, muchos de los cuales aún no se conoce su papel en la apoptosis (Luthi y Martin 2007). Recientemente, en un trabajo en el que se describe una novedosa técnica proteómica, el PROTOMAP (del inglés, Protein Topography and Migration Analysis Platform), se identificaron más de 150 sustratos de caspasas que no habían sido anteriormente descritos (Dix et al, 2008). Además, en este trabajo se observó que muchos de los fragmentos generados correspondían a dominios funcionales y presentaban una vida media similar a la proteína de la que provenían. Basándose en estas observaciones, los autores proponen que la principal función de las cascadas proteolíticas de la apoptosis puede ser la generación de estas proteínas efectoras activas, y no sólo la inactivación por proteólisis de algunas de ellas (Timmer y Salvesen, 2007; Mahrus et al, 2008; Dix et al 2008; Vandekerckhove et al, 2009).

vii. Vías de activación de la apoptosis.

- **Clasificación.**

Existen tres vías de activación de muerte celular: 1) Vía Intrínseca mitocondrial, 2) Vía Intrínseca mediada por Estrés en el Retículo Endoplasmático, 3) Vía Extrínseca mediada por receptores de muerte.

viii. Vía Intrínseca mediada por la mitocondria.

Los procesos metabólicos fundamentales ocurren en la mitocondria, organelo esencial para la sobrevivencia de todas las células eucarióticas. Sin embargo, la apoptosis es controlada también en estos organelos (Mayer y Oberbauer, 2003). Ejemplo de funciones de sobrevivencia son la fosforilación oxidativa, el transporte de electrones en la cadena respiratoria, la β -oxidación de los ácidos grasos, así como el ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarbónicos).

La regulación de la apoptosis incluye la activación de ciertos canales membranales y la liberación de proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria hacia el citosol, dichas proteínas activan a ciertas caspasas dando como resultado cambios morfológicos característicos durante la apoptosis (Hengartner, 2000; Szewczyk y Wojtczak, 2002), adicionalmente a esto, varias proteínas han sido identificadas en la prevención de la apoptosis a nivel de la mitocondria (Bortner y Cidlowski, 2002).

La permeabilización de su membrana externa (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) es un evento crucial en estas vías (Desagher y Martinou, 2000; Tsujimoto, 2003) y está principalmente mediado y controlado por miembros de la familia Bcl-2 (Tsujimoto, 2003; Adams y Cory, 2001). Una vez se induce la MOMP, se precipita el proceso de muerte celular a través de la liberación de moléculas proapoptóticas del espacio intermembranal (Green y Kroemer, 2004; Green y Reed, 1998; Kumar 2007).

Cuando el estímulo supera un umbral determinado, las proteínas Bax y Bak se activan y polimerizan en la membrana mitocondrial externa. Este proceso está inhibido por las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl- 2, Bcl-xL o Mcl-1). La polimerización de Bax y Bak induce la formación de un poro por el que saldrán proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria. Entre los factores apoptogénicos que se liberan al citosol, se incluyen el **citocromo c** (Kluck et al, 1997; Yang et al, 1997), un componente de la cadena de transporte electrónico (Green y Reed, 1998), **HtrA2/Omi**, una serín proteasa mitocondrial, **Smac/Diablo** (Second mitochondria derived activator of caspase) (Verhagen et al, 2000), **AIF** (Apoptosis Inducing Factor),(Joza et al, 2001; Susin et al, 1999) y la **endonucleasa G** (Parrish et al, 2001).

AIF se transloca al núcleo, donde desencadena cambios nucleares independientes de caspasas (Daugas et al, 2000), causando condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de DNA (Susin et al, 1999). La endonucleasa G induce fragmentación del DNA internucleosomal, también de un modo independiente de la activación de las caspasas (Enari et al, 1998; Li et al, 2001). Smac/Diablo activa apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis, las proteínas IAPs. HtrA2/Omi también actúa uniéndose a las proteínas IAP e inhibiendo su acción.

La salida de citocromo c de la mitocondria, se considera como el punto de no retorno del proceso apoptótico. Una vez liberado, el citocromo c citosólico se une a la proteína Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) aumentando la afinidad de ésta por el ATP (Jiang y Wang, 2000). La unión del nucleótido al complejo formado por Apaf-1 y citocromo c, induce la oligomerización de Apaf-1 (Zou et al, 1999) cuyo dominio CARD queda expuesto provocando el reclutamiento de la procaspasa-9 y la formación del complejo proteico llamado "apoptosoma". Dentro del apoptosoma, se activa la caspasa-9, permitiendo el procesamiento de la caspasa ejecutora caspasa -3 (Shi, 2002) que procesa a su vez importantes sustratos intracelulares. Desde este momento el proceso es irreversible.

ix. Proteínas reguladoras de la apoptosis en la vía intrínseca.

- Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 han sido consideradas como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico. Inicialmente, Bcl-2 fue identificada como producto del oncogén bcl-2 siendo uno de los miembros de una familia de moléculas pro y antiapoptóticas

(Vander, 1999). En humanos se conocen más de 20 miembros de esta familia. Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembranal (Danial y Korsmeyer, 2004). Parecen tener localizaciones subcelulares diferentes ya que mientras que los miembros antiapoptóticos suelen estar como proteínas integrales en las membranas del núcleo, del retículo endoplasmático y fundamentalmente de la mitocondria, los proapoptóticos se encuentran en el citosol o asociados con el citoesqueleto (Bortner et al, 2002). Los miembros de Bcl-2 se caracterizan por que poseen al menos uno de los dominios de homología de Bcl-2 conocidos como dominios BH llamados BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales corresponden a segmentos de α -hélice. Según estos criterios la familia se divide en tres subfamilias (Fig.5), los cuales se pueden clasificar en tres grupos: (Bras et al, 2005).

1) **Miembros “anti-apoptóticos”**: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1 y Bclw, como su nombre indica, interfieren en la ejecución de la ruta apoptótica mediante su unión a los miembros proapoptóticos. Bcl-2 es la proteína que da nombre a esta familia. El gen Bcl-2 fue descrito como un proto-oncogén que se activa como resultado de una translocación cromosómica que aparece en linfomas foliculares humanos de células B, de aquí el origen del nombre de Bcl-2 (linfoma de células B). Bcl-2 se encuentra anclado en la membrana nuclear, en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana externa mitocondrial (Nijhawan et al, 2003). Mcl-1 se presenta en el citosol. Las proteínas Bcl-xL y Bcl-w son citosólicas y tras la señal citotóxica que induce un cambio conformacional sobre ellas, se unen fuertemente a membrana (Annan et al, 2003).

2) **Miembros “pro-apoptóticos”** tipo Bax: este conjunto de proteínas son claves en la ejecución de la apoptosis mitocondrial. Bax, Bak y Bok son los miembros conocidos de este grupo de proteínas. Se ha propuesto que ejercen su función apoptótica mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial produciendo la liberación de las proteínas pro-apoptóticas alojadas en dicho compartimento (Korsmeyer et al, 2000). La proteína Bax se encuentra localizada en el citosol en forma de monómero, tras su activación oligomeriza y se desplaza a la membrana mitocondrial donde induce permeabilización mitocondrial. Bak por el contrario es una proteína integrada en la membrana externa mitocondrial que se encuentra presente en forma de oligómeros (Wei et al, 2001).

3) **Miembros “BH3 only”**: Este grupo está formado por Bid, BimL, Bad, Noxa, Puma, Bmf y Hrk. Se caracterizan por poseer sólo el dominio de homología BH3, el cual es necesario y suficiente para inducir apoptosis. Las proteínas Bid y Bim ejercen su función (tras ser activadas por diversos mecanismos), mediante interacción con los miembros pro-apoptóticos Bax y Bak, produciendo en estos cambios conformacionales que inducen a su oligomerización y desencadenando en su activación. Las proteínas Bad, Bik y Noxa interaccionan con Bcl-2 y Bcl-xL impidiendo de esta manera su acción como inhibidores de la apoptosis (Willis y Adams, 2005).

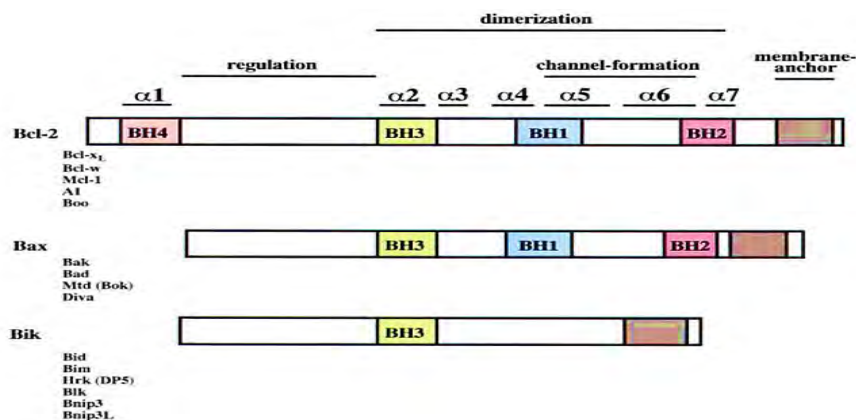


Fig. 5.- Familia Bcl-2.

Formada por proteínas pro y anti apoptóticas clasificadas en tres grupos de acuerdo a sus dominios BH. "Tomado de Tsujimoto, 2000".

- **IAPs:**

Son inhibidores de la apoptosis liberados por la mitocondria que ejercen su acción inhibiendo a las caspasas. Se han identificado ocho IAPs en mamíferos, entre las que se encuentran en humanos NAIP, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y Survivina (Eckelman y Salvesen, 2006).

Las IAPs son inhibidores directos de las caspasas. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 inhiben las caspasas -3, -7 y -9. Estas proteínas inhiben a las caspasas mediante la unión a ellas por dominios BIR. Las IAPs pueden presentar:

- a) Uno o más dominios BIR
- b) Dominios RING, que actúan como una ubiquitín-ligasa induciendo su autodegradación y la degradación de la caspasa que va unida a él, a través del proteosoma.
- c) Dominios CARD que pueden permitir la regulación de la degradación de caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

Dentro de esta familia de proteínas, la mejor estudiada es la XIAP. Su estructura está formada por tres dominios BIR y un dominio RING. El dominio BIR2 inhibe las caspasas-3 y -7, mientras que el dominio BIR3 inhibe a la caspasa-9. Los antagonistas de XIAP pueden bloquear su efecto inhibitor e inducir la activación proteolítica directa de la caspasa-3, activando posteriormente a las caspasas-8 y -9 como consecuencia del bucle de amplificación de la señal apoptótica. Esta primera activación de caspasa-3 es debida a que estos antagonistas de XIAP se unen a BIR2 impidiendo el bloqueo de la caspasa. Además, el efecto apoptótico del antagonista de XIAP no se observa en células normales y posiblemente debido a que los niveles de expresión son menores que en las células tumorales. Así, el tratamiento con antagonistas de XIAP podría tener valor terapéutico en los casos con elevados niveles de expresión de la proteína (Geserick et al. 2009).

Estas proteínas inhiben la ruta extrínseca a través de su capacidad de unirse a TRAF2 y de ubiquitinar proteínas, induciendo su degradación. Y sólo XIAP tendría capacidad de inhibir caspasa -3 y -7 a través de interacción directa (Wang et al. 2008).

x. Vía Intrínseca mediada por Estrés en el Retículo Endoplasmático.

El Retículo Endoplasmático (RE) es el orgánulo que coordina la síntesis, el plegamiento, la exportación y la degradación de las proteínas. Además cumple un papel clave en el almacenaje y señalización del calcio. En definitiva, la función fisiológica del RE es la síntesis y el plegamiento de las proteínas, así como el mantenimiento de la homeostasis celular del calcio. También sirve como un sitio de la biosíntesis de esteroides, colesterol y otros lípidos.

El RE es muy sensible a las alteraciones en la homeostasis del calcio y a las perturbaciones del entorno. Así, los compuestos que depletan el calcio del lumen del retículo (thapsigargina), los inhibidores de la glicosilación (brefeldina A), el estrés oxidativo y la acumulación de proteínas mal plegadas pueden interrumpir su función, provocando estrés en el RE. La respuesta a este estrés tiene como objetivo disminuir la cantidad de proteínas mal plegadas y recuperar el buen funcionamiento del RE y para ello se disminuye la síntesis proteica, se eliminan las proteínas mal plegadas y se incrementa la transcripción de genes de respuesta como las chaperonas. Estas respuestas vienen mediadas por vías de señalización específicas, UPR (Unfolded Protein Response), EOR (EROverload Response) y ERAD (ER-associated degradation). La respuesta a proteínas no plegadas o UPR, fue la primera que se describió como respuesta al estrés del RE y que, posteriormente, se ha sugerido que podría estar mediando en la apoptosis (Kaufman, 1999; Paschen y Mengesdorf, 2005).

PERK es una proteína transmembrana de tipo I que se encuentra en la membrana del RE, y en la porción citoplasmática contiene un dominio cinasa. En condiciones de estrés del RE la chaperona GRP78 se disocia de PERK permitiendo su oligomerización y trans-fosforilación. Una vez activa, PERK fosforila la subunidad alfa del eIF2 (eucariotic Initiation Factor 2), reduciendo así su capacidad de unir RNAt al ribosoma. Esto se traduce en una disminución global de la síntesis proteica, que tiene como objetivo evitar una mayor acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (Harding et al, 1999; Morris y Geballe, 2000).

ATF6 es una proteína transmembranal de tipo II, la porción citoplasmática tiene un dominio de unión a DNA que contiene un motivo de cremallera de leucinas (bZIP) y un dominio de activación transcripcional. En ausencia de estrés en el RE la chaperona GRP78 está unida a su dominio luminal y esconde la señal de localización a Golgi, previniendo su translocación. En respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 se disocia de ATF6 y este viaja al aparato de Golgi por vía vesicular. Una vez en el aparato de Golgi ATF6 sufre un corte

secuencial por parte de las proteasas S1P y S2P (Site 1 or 2 Protease) y el dominio citosólico resultante transloca a núcleo (Haze et al, 1999; Ye et al, 2000).

El tercer sensor en la membrana del RE es IRE1. Además del dominio luminal unido a GRP78 presenta un dominio RNasa en la porción citoplasmática. Existen dos genes para IRE, IRE α y IRE β , aunque la primera es la más estudiada. En condiciones de estrés de RE la chaperona se disocia y permite la dimerización y trans-fosforilación de IRE1. La forma activa de IRE1 α lleva a cabo un splicing (o procesamiento) no convencional sobre el RNAm de xbp1 (del inglés, X-Box Binding Protein) (Calton et al, 2002; Lee et al, 2002; Yoshida et al, 2001). El RNAm procesado, una vez cortado y ligado, da lugar a la proteína XBP1 de 54kDa que es un factor de transcripción más estable que se une a los ERSE y tiene la misma especificidad de unión que el ATF6 (Lee et al, 2003). Por otro lado, se ha observado que el dominio citoplasmático de IRE1 puede estar unido a TRAF2 que en situaciones de estrés de RE podría estar mediando la activación de JNK (Urano et al, 2000) o regulando la auto-proteólisis de la caspasa -12 (Yoneda et al, 2001).

Varias moléculas presentes en la superficie RE han sido implicadas como efectoras que causan la muerte celular en respuesta al estrés RE prolongada. Caspasa-12, esta específicamente involucrada en la apoptosis que resulta de la tensión del ER. La activación de la caspasa-12 puede ocurrir a través de estrés inducido por calpaína o la caspasa -7 y activar a la procaspasa -12. El estrés del RE activa IRE1 también podrá acumular procaspasa -12 en la superficie de membrana del ER a través del adaptador TRAF2 proteínas citosólicas, dando lugar a la escisión y la activación de caspasa -12, presumiblemente a través de un mecanismo de proximidad inducido.

Caspasa-12, junto con la caspasa-9, sirve como mediador de una vía intrínseca de apoptosis que es independiente de Apaf-1, el citocromo c y las mitocondrias (esto no quiere decir que las mitocondrias no pueden participar en la ampliación de esta vía, simplemente que no son necesarios para su activación) (Paschen y Mengesdorf, 2005).

- **CASPASA -12**

Es una caspasa iniciadora descrita recientemente, dentro de su estructura cuenta con un prodominio CARD. Fue clasificada inicialmente como parte del grupo de caspasas inflamatorias por su implicación en la maduración de citocinas y actualmente se le atribuye un papel importante en los procesos apoptóticos (Rao et al, 2001). Estudios en ratones deficientes de caspasa -12 sugiere que la proteína juega un papel importante en el estrés del Retículo Endoplasmático (RE) el cual es capaz de inducir apoptosis y está asociada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer (Nakagawa et al, 2000). Desde entonces, se ha relacionado el procesamiento de la caspasa-12 en la apoptosis inducida por estrés en el RE (Rao et al, 2001 ; Díaz et al, 2002 ; Morishima et al, 2002). Además, la caspasa-12 parece estar implicado en la apoptosis inducida por la infección viral (Bitko y

Barik, 2001) o por privación de suero (Kilic et al, 2002). La función precisa de caspasa-12 en esta vía en particular todavía no está clara. En humanos la caspasa -12 se encuentra de forma polimórfica se puede encontrar una variante de caspasa -12 corta (Caspasa-12s), la cual contiene únicamente el prodominio N-terminal CARD o en otra variante larga (caspasa-12L). Los genes que codifican a caspasa -12 humana residen en el cromosoma 11q22, Aunque el análisis filogenético sugiere que la caspasa-12 comparte homología con otras caspasas inflamatorias (Lin et al, 2000; Hur et al, 2001; Schauvliege et al, 2002). A diferencia de otras caspasas, la caspasa -12 se localiza específicamente en la cara citosólica del RE, y es un sensor específico de responder a muerte celular inducida por el estrés en el RE. El estrés del RE es causado principalmente por la acumulación de proteínas, mal plegamiento de proteínas o por una pérdida en la homeostasis del Ca^{+2} (Nakagawa et al, 2000; Kalai et al, 2003).

- **Activación de Caspasa -12.**

La función precisa de caspasa-12 en esta vía en particular todavía no está clara y sigue siendo polémico, Caspasa-12, al igual que la mayoría de los otros miembros de la familia de caspasas, se requiere la escisión del prodominio para activar su forma pro-apoptótica. El dominio CARD que presenta esta caspasa puede mediar su oligomerización y autoactivación en el RE, también puede ser activada por m-calpaína (Nakagawa y Yuan, 2000; Fujita et al, 2002). Los inductores de estrés pueden conducir a la translocación de la caspasa-7 desde el citosol al RE. Caspasa-7 puede activar la procaspasa -12 por interacción entre sus prodominios. Una vez activada caspasa -12 puede activar a otros miembros de caspasas como caspasa -9 (de forma independiente del apoptosoma) y a su vez activar caspasas efectoras (caspasa -3 o -6) lo que resulta en un aumento de la muerte celular (Thing et al, 2005).

xi. Vía Extrínseca y Receptores de muerte.

En esta ruta participan los receptores de muerte y la caspasa iniciadora es la -8 y/o -10. Los receptores de muerte pertenecen a una superfamilia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis denominada "Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral" (TNF, del inglés, Tumor Necrosis Factor). Estos receptores son proteínas integrales de membrana, la mayoría de tipo I, es decir, con un solo dominio transmembranal, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular (Bhardwaj y Aggarwal, 2003). Los receptores muerte tienen acción pleiotrópica, es decir, dependiendo del tipo celular y otras señales que la célula recibe, pueden iniciar proliferación, diferenciación o muerte celular (Strasser et al, 2000).

Los miembros de la familia del TNFR son diversos en su estructura primaria pero todos poseen un dominio extracelular conservado rico en cisteínas (que es el que permite el reconocimiento selectivo del ligando (Naismith y Sprang, 1998)), una región transmembranal y una región

intracelular conservada de unos 80 aminoácidos llamado dominio de muerte (DD, del inglés, Death Domain). A través del DD se podrán reclutar las proteínas adaptadoras para el inicio de la señalización apoptótica (Curtin y Cotter, 2003).

Actualmente se han caracterizado hasta 8 receptores de muerte pertenecientes a la gran familia del TNF con DD en su porción intracelular: TNF receptor 1 (TNFR1; también conocido como DR1, CD120a, p55/60 y TNFRSF1a), CD95 (también llamado DE2, APO1 y Fas), DR3 (conocido como APO3, LARD, TRAMP y WSLT), receptor de inducción a apoptosis por ligando relacionado con TNF (TRAILR1; llamado también DR4 o APO2), TRAILR2 (conocido también como DR5, KILLER y TRICK2), DR, receptor de la ectodisplasia A (EDAR) y el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (p75NTR) (Lavrik et al, 2005).

Se conocen al menos 18 ligandos que activan estos receptores, todos a excepción del factor de crecimiento nervioso (NGF), son moléculas relacionadas estructuralmente que pertenecen a la superfamilia génica del TNF (Gaur y Aggarwal 2003). Estos ligandos a través de la interacción con sus receptores activan la denominada vía extrínseca mediante la transmisión de señales apoptóticas. La unión del ligando a su correspondiente receptor de muerte va a tener como consecuencia la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras con dominios DD homólogos a los del receptor, Estas proteínas, a través de dominios DED, van a permitir a su vez el reclutamiento de las caspasas iniciadoras -8 /-10, formándose así el complejo DISC donde se activarán dichas caspasas (Kischkel et al, 2000).

- **Receptor Fas (CD95)**

Cuando se produce la unión Fas/Fas-L, da lugar a la trimerización del receptor. Este último tiene en su dominio citoplasmático una región, homóloga a otros receptores capaces de provocar apoptosis, de unos ochenta aminoácidos y muy rica en aminoácidos cargados con los que puede interaccionar con señales pro-apoptóticas. A este dominio encargado de transducir la señal, se le denomina dominio de muerte (DD) (Schmitz et al, 2000). Como ya se ha dicho, la activación de este receptor provoca el reclutamiento y unión de otras moléculas adaptadoras como son FADD y RIP (Vincenz, 2001).

FADD (Proteína con dominio de muerte asociado a Fas) contiene dos dominios importantes, que son el dominio DD, con el cual interacciona Fas, y el dominio DED (dominio efector de muerte), que es el encargado de transmitir la señal apoptótica a los efectores, es decir a las caspasas, por ejemplo con caspasa -8, ya que también tiene un dominio DED. RIP (Proteína de interacción con receptor), es una proteína Ser/Thr cinasa. Tiene dos formas de actuación dependiendo de que su unión sea a Fas o a TNF. En el caso de unirse a Fas, lo hace también por su dominio DD al DD de Fas. En este momento está en condiciones de interaccionar con RAIDD (proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte), el cual también tiene dominio DD y otro dominio homólogo a caspasa-2.

Dentro de esta activación existen dos mecanismos muy importantes, que dependen del tipo celular. Así algunos autores diferencian dos tipos de células (Jost et al, 2009): Tipo I, células en las que la expresión de caspasa-8 sería bastante abundante y podrían activar directamente a caspasa-3, aunque también a caspasa-6 y -7 a través de las cascadas de las caspasas. Esto llevaría a la ejecución de la apoptosis al producirse condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, etc. Este tipo de inducción no requiere de la mitocondria y por tanto no está inhibida por factores como Bcl-2 o Bcl- XL, ya que no requiere amplificación de la señal por factores pro-apoptóticos derivados de la mitocondria (Feig et al, 2007). Tipo II, en este tipo de células no hay una abundante expresión de caspasa -8 y está por tanto no puede activar eficientemente a caspasa -3, ni a otras caspasas que se encuentran río abajo en la cascada de caspasas. En estas células la activación de caspasa -8 provoca la activación proteolítica de un miembro de la familia Bcl-2, como es Bid. Esta activación provoca la traslocación de Bid a la mitocondria, donde va a interactuar con moléculas antiapoptóticas que se encuentran como componentes de la membrana mitocondrial (Thorburn, 2004; Li et al, 2009).

- **CASPASA-8**

Si bien su principal función es la de inducir la apoptosis como caspasa iniciadora en vía de señalización mediada por receptores de muerte, también está envuelta en otras funciones no apoptóticas (Maelfait y Beyaert 2008). Lo primero que llama la atención es que la deficiencia en caspasa-8 es letal en ratones a nivel embrionario. Los embriones mueren por problemas en el desarrollo: hiperemia, eritrocitosis y defectos en el desarrollo del músculo cardíaco son algunos de los rasgos (Varfolomeev et al, 1998). Experimentos hechos en ratones deficientes de caspasa-8 específicamente en el músculo cardíaco indica que esta proteasa tiene funciones no apoptóticas en el desarrollo embrionario. Además de caspasa-8, parece que en estas funciones son necesarias las moléculas adaptadoras como FADD o c-FLIPL. Estas anomalías en el desarrollo no se producen en humanos con mutaciones en caspasa-8, probablemente debido al papel redundante de caspasa-10, proteasa no presente en ratones (Maelfait y Beyaert 2008).

Caspasa -8 también es necesaria para la diferenciación de los monocitos en macrófagos. La diferenciación a macrófagos necesita de reajustes citoplasmáticos en los que parece ser necesaria la actividad de caspasa-8 sin la inducción de apoptosis. Esto debe estar regulado a más niveles, por ejemplo caspasa-3 tiene que estar fuertemente regulada. Pero también debe estar inhibida la señal proliferativa que impediría la diferenciación, mediante la degradación de RIPK1 por caspasa-8 (Bell et al, 2008; Ben et al, 2007). Linfocitos T en proliferación se ha visto que tienen una aumentada la actividad de la caspasa-8, pero no sufren apoptosis. En relación a esto, caspasa-8 está implicada en la activación de NF- κ B en Linfocitos T-CD8 que sobre-expresan c-FLIPL, está implicada en el mantenimiento de la homeostasis de las células T periféricas a través de la regulación de la producción de IL-2 con el fin de controlar la proliferación de células T. Así mismo se encuentra implicado en el control de la diferenciación y

la proliferación de las células B, células NK y de progenitores hematopoyéticos (Salmena et al, 2003; Yi y Yuan, 2009).

Caspasa -8 también fue encontrado y asociado con I κ B cinasa (IKK) complejo de inductor la activación transcripcional de NF- κ B. Por lo tanto, caspasa-8 tiene un papel en la regulación de la inmunidad innata similar a la de DREDD. Además de promover la activación de NF- κ B, la caspasa-8 podría regular directamente citocinas pro-inflamatorias. Una de las funciones de la caspasa -8 en la regulación de las citocinas pro-inflamatorias podrían ser considerados como la estimulación del ligando Fas, se encontró para inducir el procesamiento y la secreción de IL1- β en las células de exudado peritoneal de manera independiente la caspasa-1 (Miwa et al, 1998). Sin embargo, el mecanismo por el cual la caspasa-8 interviene en la secreción de citocinas no ha sido explorado (Festjens et al, 2006; Kang et al, 2004).

Caspasa-8 también se ha asociado con los eventos de fusión de células especializadas que son necesarias para la diferenciación de trofoblasto vellosos placentario humano, una capa epitelial importante para el transporte de los nutrientes directamente de la madre al feto (Black et al., 2004).

- **Activación de Caspasa -8**

Caspasa -8, junto a caspasa -10 en humanos, es la caspasa iniciadora de la ruta extrínseca de la apoptosis (Medema y Scaffidi, 1997). Forma parte del complejo proteico DISC y su activación ocurre en dos pasos. Primero, el reclutamiento de FADD a la región intracelular de FAS promueve la dimerización y cambio de conformación de la caspasa -8 dentro del DISC lo que permite la activación total de la caspasa-8. A continuación la caspasa -8 sufre un procesamiento auto-proteolítico que permite a la enzima liberarse del DISC. El dímero no proteolizado es activo pero muy inestable, una vez escindida, la caspasa-8 como monómero es inactiva, pero con mucha afinidad por otro monómero o a proteínas pro-apoptóticas como Bid (Pop et al, 2007).

Existen otros mecanismos de activación de caspasa -8. Parece ser que caspasa -3 escindida puede a su vez escindir y activar caspasa -8 en un mecanismo de retroalimentación, aunque no se sabe si este proceso tiene un papel determinante en la apoptosis, ya que ni el corte, ni la dimerización son por sí solos suficientes para activar caspasa -8, pero puede que el reclutamiento de caspasa -8 por el DISC no sea suficiente para inducir una actividad que desencadene apoptosis (Oberst et al, 2010).

Existen otros elementos y modificaciones de la misma caspasa que influyen en su actividad: Jin et al., describieron que tras la formación del DISC se induce poly-ubiquitinización de la caspasa-8 a través de una interacción previamente desconocida entre el DISC y una E3 ligasa llamada Culina-3. Esta ubiquitinización requería una proteína llamada RBX1, y era un equilibrio entre ubiquitinización y de-ubiquitinización por la A20 deubiquitinasa.

Y así entra en juego otra proteína, p62/sequestosoma-1, una proteína de unión a ubiquitina. P62 agregaría a la caspasa -8 modificada por culina-3 en determinados focos. Estos datos mostrarían que la activación de caspasa -8 está fuertemente regulada por muchos factores, incluidos los metabólicos (Li, et al. 2009).

La unión del ligando induce la ubiquitinización de la caspasa-8, señal que suele indicar la degradación de la proteína, que en este caso es activadora. Además de la señal química, parece que existen compartimentos donde se dan los procesos de activación. En este caso la caspasa -8 se encuentra en "lipids rafts" de la membrana citoplasmática.

Se sabe que caspasa -8 puede ser activada por repeticiones de poli-glutamina (Sánchez et al, 1999). La acumulación de péptidos que acumulan series de glutamina parece ser tóxica para neuronas. Esta toxicidad viene por la inducción de apoptosis por caspasa-8, su activación es inhibida por la proteína viral anti-apoptótica CrmA, por un dominante negativo de FADD y por Bcl-xL y Bcl-2. Esta activación parece ser independiente de FasL y los autores observaron que FADD está en la fracción no soluble cuando se induce la expresión de esos péptidos de poli-glutamina. Además de que en las fracciones insolubles de cerebros afectados por la enfermedad de Huntington, existe una acumulación de caspasa -8. Estos resultados podrían indicar que una agregación de FADD y caspasa -8 independiente de los receptores de muerte es posible. Existen más ejemplos de activación de caspasa -8 independiente de los receptores de muerte. Gröbner 2007 describieron que la proteína P de Yersinia inducía la producción de un DISC atípico en células dendríticas que activa caspasa -8 y recluta RIPK1, induciendo una mezcla de apoptosis y necrosis. Ellos conjeturan que esta proteína acetila a MAP cinasa inhibiéndola (Gröbner et al., 2007).

Esta MAP cinasa sería la responsable de la expresión de FLIP. Se han descrito incluso otras formas de activación de caspasa -8 independientemente de FADD. La proteína viral HPV18 E2 induce la agregación de caspasa -8 en unas estructuras filamentosas. A pesar de que esta proteína E2 no tiene ningún dominio de muerte. Además, el análogo viral de FLIP es capaz de inhibir la interacción entre caspasa -8 y E2, protegiendo a la célula de la proteína viral (Thierry y Demeret, 2008).

Por último indicar el estudio de Suzuki 2003. Ellos describen una forma de muerte por privación de glucosa a la que llaman necrótica, pero dependiente de caspasa -8. Además de observar corte de caspasa -8 y degradación de Bid por la privación de glucosa, ven que no es dependiente de FADD y es parcialmente inhibida por FLIP. Ellos concluyen que es necrosis porque no ven algunos rasgos como fragmentación nuclear o presentación de Fosfatidilserina.

xii. Proteínas reguladoras de la apoptosis en la vía extrínseca.

- **RIPK1**

“Receptor-interacting protein kinase 1” (RIPK1) es una proteína cinasa con una función dual. RIPK1 tiene 3 funciones principales. Induce la expresión de NF- κ B, por tanto supervivencia y proliferación; colabora en el reclutamiento de caspasa-8 y en su activación, llevando a apoptosis; y por último, debido a su actividad cinasa, y en ausencia de actividad caspasa, puede inducir necroptosis.

Promueve, a través de su unión al receptor, supervivencia o muerte (Stanger, Leder et al, 1995). Ratones deficientes en RIPK1 nacen normales, pero mueren después de tres días por una masiva apoptosis. Curiosamente, fibroblastos de ratones deficientes en RIPK1 fueron más sensibles a apoptosis inducida por TNF que los ratones silvestres. Además las células deficientes en RIPK1 tenían reducida la actividad NF- κ B. Aunque para RIPK1 No es totalmente indispensable para activar a NF- κ B a través de TNFR1 (Al igual que la caspasa-8, el que RIPK1 sea pro-apoptóticas o no, depende, entre otras cosas, de su ubiquitinización (Wong et al, 2009).

- **FLIP:**

c-FLIP es un homólogo de caspasa-8 porque posee dos dominios de muerte, pero le falta el sitio activo de la enzima por una mutación que cambia una cisteína por una tirosina en el dominio enzimático (Irmiler et al, 1997). Tiene alrededor de 11 isoformas, aunque en la mayoría de las células sólo se detectan la isoforma larga (cFLIPL) y la corta (cFLIPS) que está relacionada con una proteína viral FLIP. De esta manera FLIP actúa como un inhibidor competitivo de caspasa-8 al competir por FADD. Pero c-FLIP también puede unirse a otras moléculas adaptadoras como RIPK1 o TRAF2, actuando no sólo como un inhibidor de la apoptosis, sino como elemento necesario para la activación de NF- κ B, por ejemplo en linfocitos T CD8+ (Dohrman et al, 2005).

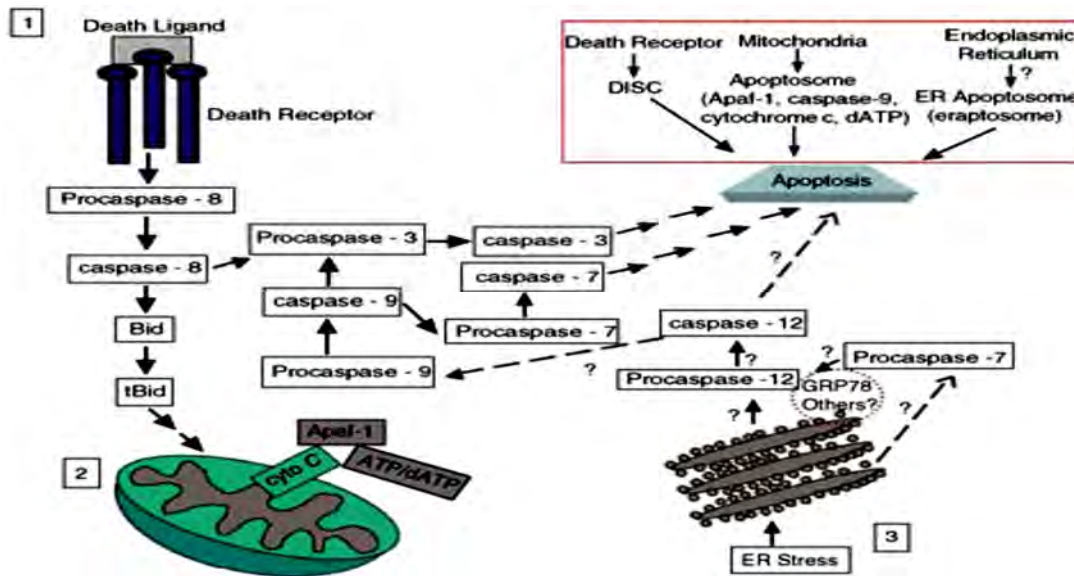


Fig. 6.- Vías de activación de la apoptosis.

Se clasifican en tres: 1) Vía extrínseca mediada por los receptores de muerte y caspasa -8/-10, 2) Vía Intrínseca mitocondrial (caspasa 9 y proteínas de la familia bcl-2) y 3) Vía intrínseca mediada por retículo Endoplasmático (caspasa -12). "Tomado de Rao, 2004".

xiii. Cáncer y Apoptosis.

La apoptosis desempeña un papel significativo en la supervivencia por el mantenimiento de la homeostasis de los organismos pluricelulares, así como, el mal funcionamiento de la vía apoptótica puede causar varias enfermedades humanas como el cáncer (Kwon, 2007).

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

El cáncer es un ejemplo que en los mecanismos normales de regulación del ciclo celular son disfuncionales, ya sea con una proliferación excesiva de células y / o disminución en procesos apoptóticos de las células (Rey y Cidrowski, 1998). De hecho, la supresión de la apoptosis durante la carcinogénesis se cree que juega un papel central en el desarrollo y la progresión de algunos cánceres (Kerr et al, 1994). Hay una variedad de mecanismos moleculares que las células tumorales utilizan para suprimir la apoptosis (Smyth et al, 2001; Koyama et al, 2001).

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o por la baja regulación o mutación de proteínas pro-

apoptóticas como Bax. La expresión de ambos Bcl-2 y Bax está regulada por la *p53*, gen supresor de tumor que se encuentra mutado en la mayoría de los tumores (Miyashita, 1994; Smyth et al, 2001)

xiv. **Cáncer Cérvico Uterino.**

El Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) se presenta principalmente entre mujeres con una vida sexual activa, por lo que se considera una enfermedad multifactorial de transmisión sexual aunque no exclusiva, cuyo principal agente etiológico es el virus del papiloma humano (VPH) (Zur Hausen, 1994; Lizano y García, 1997). Es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el primero reconocido por la Organización Mundial de la Salud que es atribuible a una infección (Monsonego, 2004; Pulivarthi, 2004).

El CaCU es una enfermedad neoplásica maligna que se origina en el cérvix uterino y cuya progresión natural lleva a la muerte, aun cuando el conocimiento de la enfermedad es incompleto, los estudios realizados han mostrado que la mayoría de estos tumores tienen inicio gradual y sus lesiones precursoras pueden mantenerse en fase reversible o *in situ* por varios años en la mayoría de las pacientes (D-zul, 2004). La historia natural del CaCU implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras llamadas lesiones precursoras o premalignas, las cuales son estrictamente intraepiteliales es decir, se encuentran por encima de la membrana basal que separa el epitelio escamoso del estroma (D-zul, 2004). Se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCU, cómo el número de parejas sexuales, el inicio temprano de vida sexual activa, la multiparidad, etc. Sin embargo, el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCU es la infección con el virus de papiloma humano (VPH) que está asociado en un 97.7 % de los casos (Vázquez et al, 2005).

Entre los VPHs más incidentes se tienen principalmente a los tipos de 16 y 18 con un 50.8 % y 15.5% respectivamente (Berumen, 2003). El VPH, es un virus de doble cadenas circular de DNA y de tamaño pequeño (aproximadamente de 8000 pares de bases); los VPHs han convivido con la especie humana durante decenas de miles de años y sufren relativamente pocos cambios en su composición genética. Se ha identificado más de 100 tipos diferentes de VPH (Castellsagué, 2008).

xv. **Inmunoterapia contra el Cáncer Cérvico Uterino.**

En los últimos años ha resurgido el interés por afrontar el tratamiento y prevención del cáncer desde el punto de vista inmunológico, es decir, el estudio de los mecanismos de defensa del organismo que participan de manera importante en el control de las neoplasias, así como la investigación de diferentes sustancias con capacidad inmunoterapéutica. El desarrollo de terapias biológicas para los pacientes con cáncer se ha visto obstaculizada en parte por la extraordinaria complejidad y la promoción de mecanismos intrínsecos de retroalimentación en la homeostasis de la lesión tisular, la reparación, la inflamación y la inmunidad. Actualmente, el uso de las citocinas en la inmunoterapia abre nuevas esperanzas en lucha contra el cáncer.

Las citocinas son moléculas solubles involucradas en la regulación de la respuesta inmune; se conocen alrededor de 20 tipos y cada una presenta una función definida. Cada citocina es producida por más de un tipo celular y cada célula es capaz de producir diversos tipos de citocinas, en una forma regulada. Las citocinas presentan diversos mecanismos de acción a través de los cuales es probable que puedan provocar el rechazo de tumores, ya sea actuando directamente contra la célula tumoral o aumentando la expresión de antígenos (Guzmán et al, 2004).

La interleucina-2(IL-2) recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. La terapia con IL -2 recombinante se inició en 1984, basada en su papel como factor de crecimiento de linfocitos T, es una proteína muy importante en la respuesta inmunológica mediada por células al promover la activación y proliferación de los Linfocitos T. Su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que este receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón, células endoteliales de cordón umbilical, queratinocitos, células intestinales, células de origen nervioso y en células de carcinomas humanos, melanoma, mama, colorectal, pulmón, hígado, estómago, renal, y neoplasias de líneas linfoides (Romo et al, 2009).

En el grupo de trabajo del laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, se demostró la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma de IL-2R en las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL. Además hemos reportado que el IL-2R es activado por la IL-2 exógena. También, contamos con datos que indican que el receptor tiene expresión diferencial en tumores de CaCU de acuerdo al estadio del tumor (Rangel, et al., 1998). Al igual se ha demostrado que la aplicación de IL-2 estimula la actividad citotóxica de linfocitos T contra este cáncer (Rangel et al, 1995).

Se ha reportado que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de las líneas celulares podemos inhibir la proliferación de las células de CaCU en presencia de altas dosis de IL-2 (100UI/ml), sin embargo, en presencia de 10UI/ml de IL-2 podemos inducir la

proliferación de esa mismas células tumorales. Estos datos sugieren la dependencia de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL por IL-2. Así mismo se ha evaluado el comportamiento de las líneas celulares de CaCU en presencia de 100UI/mL de IL-2 encapsulada en liposomas neutros y se observa la inhibición de la proliferación celular a partir de 48h y un gran daño celular desde 24h y obteniendo a 96h un alto porcentaje de inhibición de la proliferación en las líneas celulares CALO e INBL (Alvarado, 1997; Rangel et al, 2010).

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

- **Biología de IL-2**

IL-2 es un mediador fundamental en la activación de la respuesta inmunitaria, capaz de modularla, por lo que se le considera como una “Inmunohormona del sistema Inmune”. Fue llamada originalmente Factor de crecimiento de células T (TCGF), siendo la principal citocina responsable de la progresión de linfocitos T de la fase G1 a la S del ciclo celular y es factor auxiliador de células asesinas o factor coestimulador (KHF).

Fue descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cáncer Institute, y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en Suiza, 1979, se le renombra como IL-2. Su gen fue clonado en 1984 lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se ha desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 y en la actualidad se le conoce como IL-2 (Kendall, et al., 2002, Aggarwal, et al., 1992).

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa, con 133 aa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2. Es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo; compuesta principalmente por una unión de cuatro hélices alfa. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28, contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125, dos de los cuales (58 y 105) forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula (Kendall et al, 2002; Aggarwal et al, 1992). Es producida por células T CD4+ y en menor cantidad por células T CD8+ en humanos (Kendall et al, 2002).

JUSTIFICACIÓN.

En el mundo, el Cáncer Cérvico Uterino (CaCU) ocupa el segundo lugar de incidencia entre las neoplasias malignas en la mujer. En México, presenta una tasa de mortalidad del 13.9%, se diagnostican 4270 casos por día, de los cuales al menos el 50% de la población fallece por esta causa (INEGI, 2010), a pesar de los programas de detección oportuna implementados por las instituciones de salud públicas el CaCU continúa siendo una causa importante de muerte por cáncer en mujeres en nuestro País.

Por esta razón, en la actualidad existen numerosos grupos de investigación que trabajan en el establecimiento de nuevas alternativas terapéuticas para este tipo de tumor. Entre ellas destaca la inmunoterapia que ha empleado la administración sistémica de IL-2 para activar la respuesta inmunológica antitumoral, cuyos resultados han sido favorables. En particular, en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, se han obtenido resultados interesantes con las líneas de CaCU CALO e INBL que han sido cultivadas en presencia de 100UI/mL de esta citocina, obteniéndose una inhibición de la proliferación (Alvarado, 1997). Estos mismos resultados de inhibición de la proliferación se han reproducido *in vivo*, en un modelo animal, en el cual se inoculan células de la línea INBL en ratones de la cepa CBA, que al ser tratados con 100UI/mL de IL-2 se obtiene una regresión tumoral del 80% (Rangel et al, 1995). Datos recientes generados por Del Río Ortiz 2011, muestran que las células de CaCU cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 mueren por apoptosis, sin embargo, se desconoce tanto el mecanismo como la vía molecular por los cuales IL-2 induce la apoptosis en las células de este tipo de cáncer.

En base a lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo esclarecer la vía apoptótica inducida por IL-2 en las líneas de CaCU CALO e INBL. Para ello, se evaluó la expresión del mensajero para caspasa -8, relacionada con la vía extrínseca, así como la identificación del mensajero para caspasa -12 vinculada con la vía intrínseca. Los resultados obtenidos nos permitirán contribuir al esclarecimiento del mecanismo de inducción de apoptosis por esta citocina, con la finalidad de proponer el uso de IL-2 como una alternativa terapéutica para este tipo de cáncer.



HIPÓTESIS

Se ha demostrado que 100UI/mL de IL-2 exógena, inhibe la proliferación *in vitro* de células de las líneas de CaCU, CALO e INBL, así como inducir las a muerte por apoptosis. Por lo tanto, si cultivamos células de las líneas CALO e INBL en presencia de 100UI/mL de IL-2 y utilizando la técnica RT-PCR identificaremos la presencia del RNA mensajero para caspasa -8 y caspasa -12.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la Participación de caspasa -8 y -12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino, CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.

Objetivos Particulares.

- Obtener cultivos de líneas celulares derivadas de CaCU: CALO e INBL.
- Cultivar a las líneas celulares en presencia de 100UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos (30', 2h, 48h, 96h, y 144h).
- Extraer, purificar y retrotranscribir el RNAm de células de las líneas CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.
- Analizar la expresión del producto de amplificación para Caspasa -8 y -12 en las líneas celulares CALO e INBL cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2, mediante las técnicas de RT-PCR y Electroforesis.

MÉTODO

- **Material Biológico.**

El material biológico consistió en líneas celulares derivadas de Cáncer Cérvico Uterino: CALO e INBL (Tabla 1), las cuales fueron obtenidas del material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en el Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea Celular	Estadio clínico	HPV	Características
CALO (Cándida López)	IIB	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL (Inés Blanco)	IVB	18	Carcinoma de origen Epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

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

- **Condiciones del Cultivo**

Las líneas Celulares CALO e INBL se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (MICROLAB), suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino)(GIBCO), previamente desactivado, en botellas de cultivo de 75cm³. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (FORM SCIENTIFIC, USA) a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂.

Las células tumorales CALO e INBL en fase de confluencia fueron separadas del sustrato con verseno. Posteriormente se realizó una sincronización celular para que los cultivos partieran del mismo punto del ciclo celular (G1), esto se realizó cultivando a las células 24h en ausencia de Suero Fetal Bovino.

La densidad y viabilidad de las células tumorales en cultivo fue evaluada en cámara de Neubauer (AMERICAN OPTICAL, USA) la viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano (SIGMA). Teniendo como un mínimo de viabilidad un 98% por cada cultivo.

- **Cultivo celular de líneas de CaCU, CALO e INBL en presencia de IL-2.**

Se partió de 1×10^6 de células de las líneas celulares CALO e INBL, las cuales fueron cultivadas en presencia de IL-2 (IL-2) recombinante humana (R&D systems) a 100UI/mL. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora (FORM SCIENTIFIC, USA) a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂. Durante diferentes tiempos: 30', 2h, 48h, 96h, y 144h, para posteriormente realizar la extracción de RNA total.

Se realizaron cultivos celulares en ausencia de 100UI/mL de IL-2, empleando las mismas condiciones antes mencionadas, los cuales fueron utilizados como controles en el presente estudio.

- **Extracción de RNA Total.**

Transcurridos los tiempos de cultivo con IL-2 (R&D systems), las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante para después realizar la extracción del RNA mediante la utilización de la solución **TRIzol**TM (INVITROGEN) de isotiocianato de guanina.

El botón celular se homogenizó en 1mL de la solución de TRIzolTM (INVITROGEN), se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µL de cloroformo (SIGMA) logrando así una emulsión. Rápidamente, se agitaron los tubos de 1.5mL (Eppendorf) durante 3 minutos y se incubaron otros 3 minutos en hielo. Una vez finalizada la incubación, se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa. Esta fase se mezcló con 500 µL de isopropanol (SIGMA), con el fin de precipitar el RNA, incubándose durante 24h a -72°C, posteriormente se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante y el botón obtenido se lavó y purificó con 1mL de etanol (J.T BAKER) frío al 70%, asegurándose de que se mezclará bien, se centrifugó a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C dejando evaporar el etanol durante 1h y media. El precipitado obtenido fue resuspendido con agua libre de RNAsas (FERMENTAS) conservando el stock a -72°C.

- **Cuantificación de RNA.**

La concentración de RNA se determinó en un biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf), para normalizar las muestras e igualar concentraciones.

Se realizó una dilución 1:50 tomando 4 μL del stock de la muestra y resuspendido en 196 μL de agua inyectable (PISA), estos se colocaron en una celda, posteriormente se realizó la lectura en el biofotómetro (BIOPhotometer, Eppendorf) para determinar las concentraciones de RNA ($\mu\text{g}/\text{mL}$), se tomaron las absorbancias de 260nm y se relaciona con la absorbancia 280nm para obtener un valor que nos indica su estado de pureza. Para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de RNA se toma el valor de 260/280nm superior a 1.5 e inferior a 2.0. La contaminación de proteínas o de fenol disminuye la relación. Se aplicó la relación existente para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso RNA, de 1 unidad de densidad óptica (1 UDO) equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- **Obtención de cDNA por RT- PCR**

- I. Retrotranscripción.**

La concentración de RNA utilizado para la técnica fue de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para cada una de las muestras, para lo cual, se utilizó un kit de RT-PCR en el que se establecieron las siguientes condiciones para cada reacción (1Rx), el cual fue multiplicado por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2).

Se utilizaron los siguientes reactivos para (1Rx): Amortiguador 5x el cual contiene DTT (PROMEGA) (4 μL), dNTP's (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (INVITROGEN) 10 Mm (1.5 μL), Enzima MMLV-RT (PROMEGA) (1 μL), Oligo dt (PROMEGA) (2 μL), Muestra (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), Agua libre RNAsas (FERMENTAS), llegando a un volumen total de 25 μL . (ver Apéndice I). Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendiendo para la incorporación cada uno de los reactivos.

Las reacciones se colocaron en un termociclador (EPPENDORF ESTANDAR) el cual fue programado a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. El cDNA obtenido se conservó a -70 $^{\circ}\text{C}$.

II. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con los cDNA obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR semicuantitativa utilizando 2µg/µL, las condiciones establecidas para 1Rx utilizando un kit de PCR Go taq Polimerasa, las cuales se multiplicaran por el número de muestras (células cultivadas en presencia y ausencia de IL-2). En la cual se utilizan los siguientes reactivos: 5x Green el cual contiene MgCl₂(PROMEGA) (6 µL), dNTP's (INVITROGEN) 10 Mm (0.8µL), Primer 1(UNIPARS, S.A.) (Sentido) (1 µL), Primer 2(UNIPARS, S.A.) (Antisentido) Tabla 2. (1 µL), Go Taq Polimerasa (PROMEGA) (0.15 µL), Muestra cDNA (4 µL), Agua libre RNAsas (FERMENTAS) (7.05 µL), llegando a un volumen total de 20 µL. Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendiendo para la incorporación cada uno de los reactivos.

El protocolo utilizado consistió en:

- Paso 1: 94°C 6 minutos - Fase de desnaturalización del DNA
- Paso 2: 55°C (Caspasa -8) y 57° (Caspasa 12) 2 minutos - Fase de alineamiento del DNA. (temperaturas optimas recomendadas para cada Primer (hoja técnica))
- Paso 3: 72°C 2 minutos - Fase de extensión de DNA.
- Paso 4: 94°C 45 segundos - Fase de disociación.
- Paso 5: 30 veces el paso 2 al 4
- Paso 6: 55°C (Caspasa -8) y 57° (Caspasa 12) 2 minutos - Fase de alineamiento del DNA.
- Paso 7: 72°C 7 minutos - Fase de extensión de DNA.
- Paso 8: 20°C 30 minutos. -Fase de Estabilización.

Estas condiciones fueron establecidas en un termociclador(EPPENDORF ESTANDAR)

	Secuencia del primer (5´- 3´)		Pares de Bases (pb)
β-Actina	Sentido	gggtcagaaggattcctatg	234
	Antisentido	ggt ctcaaacatgatctggg	
Caspasa 8	Sentido	aagcaaacctcggggatact	164
	Antisentido	ggggcttgatctcaaatga	
Caspasa 12	Sentido	tgagcaatgctgaaaacctg	228
	Antisentido	gtagatctcgcatcccaaa	

Tabla 2.-Secuencias de los primers: Se muestran las pares de bases de cada uno de los primers utilizados para la detección de los distintos genes de interés para evaluar apoptosis (Caspasa -8, Caspasa -12) así como β-Actina como un control interno de la técnica. Los primers fueron diseñados con ayuda del programa computacional Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> y probados en ePRC: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>

- **ELECTROFORESIS.**

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

Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1.5g de agarosa la cual se diluyó con 100 mL de TBE 1X (Ver Apéndice) en un matraz de 100 mL. Para tener un mejor homogeneizado la dilución se calentó a 50°C durante 4 minutos aproximadamente. Después de montar la cámara de electroforesis (Owl, USA) se procedió a verter la dilución de agarosa más 15 μ L de bromuro de etidio en la cámara de electroforesis, inmediatamente se colocó un peine con el número de pozos deseados.

Terminado el tiempo de polimerización de la agarosa (20' aproximadamente) se procede a retirar el peine y montar la cámara para la corrida electroforética, en el cual se colocó 1L de buffer de corrida (TBE 0.5X). Posteriormente se colocaron 4 μ L de muestra en los pozos al igual que 4 μ L de escalera de pares de bases. El tiempo de corrida es aproximadamente de 1 hora a 80 volts.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el ánodo. De tal manera la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA en función de su tamaño y movilidad.

Para la visualización de los ácidos nucleídos se utilizó un colorante fluorescente, bromuro de etidio (MERCURY). Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300nm) de un transluminador (UVP, USA).

De este modo se permite la visualización del DNA y la identificación de los productos de interés (Caspasa -8, Caspasa -12 y β -actina) por sus tamaños en pares de bases en relación al recorrido de cada banda con el marcador o escalera de peso molecular (MassRuler™ Express DNA ladder, LR Recerse (FERMENTAS)), así como la identificación del RNAr en sus subunidades 28S y 18S.

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

RESULTADOS

Es importante, aclarar que para este trabajo se definieron tiempos de cultivo de 30', 2h, 48h, 96h y 144h, para las células de las Líneas CALO e INBL ya que, trabajos previos han demostrado que en estas líneas celulares, al ser estimuladas con IL-2 exógena, expresan el receptor para IL-2 el cual es funcional, y que a partir de los 15 minutos son capaces de desencadenar vías de señalización intracelular como por ejemplo; patrones de fosforilación en tirosina de diferentes proteínas, como la cinasa JAK3, STAT3 y STAT5 (Rocha et al ,2004; Valle, 2000).

I. Integridad del RNA en líneas celulares de CaCU.

Con la finalidad de confirmar la integridad del RNA extraído por la técnica de TRIZOL, las células de las líneas CALO e INBL fueron cultivadas a diferentes tiempos: 30', 2h, 48h, 96h, 144h en ausencia o presencia de 100UI/mL de IL-2. Una vez extraído el RNA fue teñido con bromuro de etidio y las muestras se corrieron en el gel de Agarosa al 1.5%, por 60 minutos a 80 V. Al excitar el gel con luz UV observamos nitidamente las subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal (RNAr), lo que confirma la integridad del RNA extraído de todas las muestras. Integridad del RNAm extraído de la línea celular CALO en presencia de IL-2 (Fig.7a) y células de la línea CALO en ausencia de IL-2 (Fig. 7c). Línea celular INBL en presencia de IL-2 (Fig. 7b) y en ausencia de IL-2 (Fig. 7d).

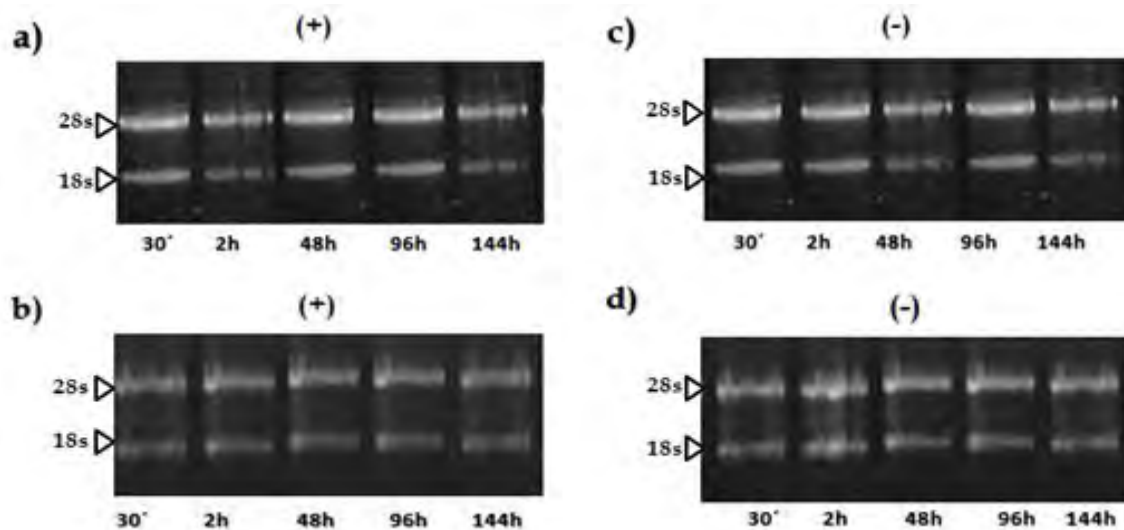


Fig. 7.- Integridad del RNA en líneas celulares de CaCU CALO e INBL. Se realizó la extracción del RNAm por la técnica de TRIZOL™. RNAm línea celular CALO **a)** y **c)**. RNAm línea celular INBL **b)** y **d)**. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. Las bandas muestran la integridad de las subunidades 28S y 18S del RNAr.

II. Expresión de β -actina en líneas celulares de CaCU.

Una vez confirmada la integridad del RNAm se procedió a llevar a cabo la retrotranscripción para obtener el cDNA de cada una de las muestras cultivadas a 30', 2h, 48h, 96h y 144h en presencia ó ausencia de 100UI/mL de IL-2. El cDNA fue utilizado para confirmar que las condiciones de la PCR son las adecuadas y que es confiable para amplificar cualquier par de primers. Para ello, se realizó la amplificación de β -actina, cuyo producto es empleado en el presente estudio como control interno de la técnica de PCR. β -actina es una proteína constitutiva de las células, la cual se encuentra en síntesis continua en células metabólicamente activas, por lo cual su mensajero está siempre presente, y su amplificación resulta ser un buen control interno de la técnica.

Los resultados obtenidos muestran, para las líneas celulares CALO e INBL, una banda de amplificación de 232pb, que corresponde al producto esperado para β -actina. En las líneas celulares cultivadas en presencia de IL-2 (+), los productos de amplificación son homogéneos con respecto al tiempo de cultivo y de mayor tamaño (Fig. 8a y 8c), en comparación con las células cultivadas en ausencia de IL-2 (-) (Fig. 8b y 8d).

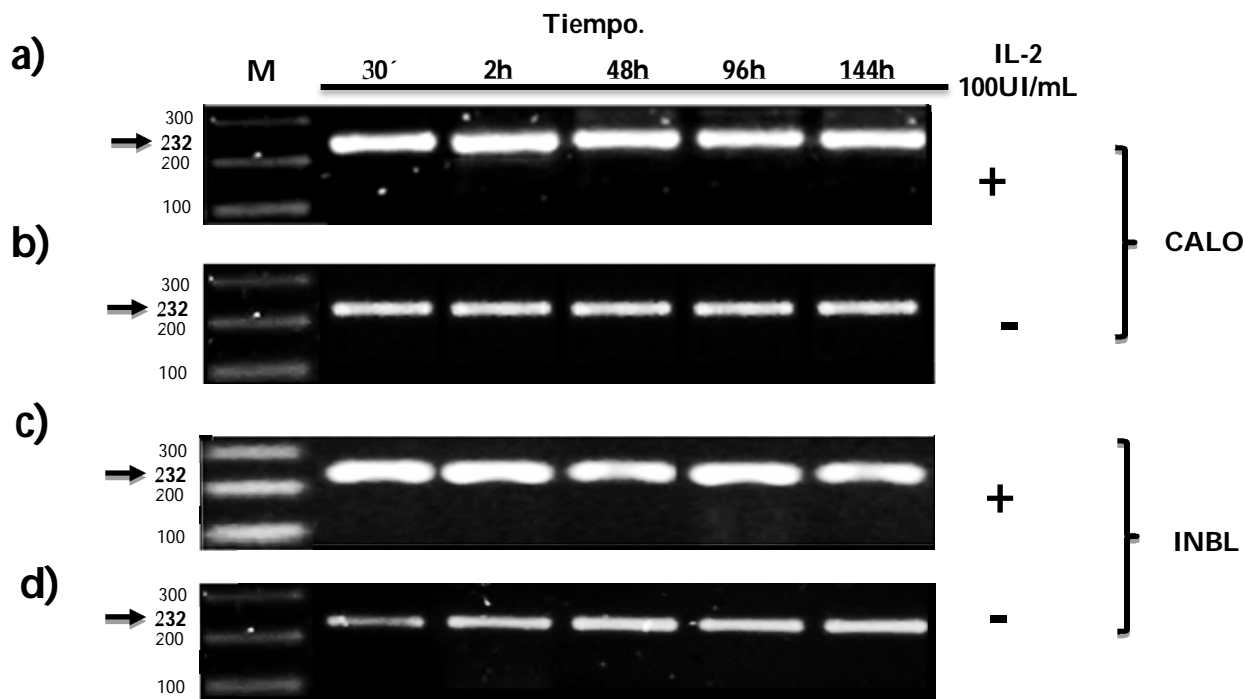


Fig. 8.- Expresión de β -actina en líneas celulares de CaCU CALO e INBL. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. La determinación del producto de amplificación de 232 pb para β -actina se realizó por RT-PCR. Productos de amplificación para la línea CALO **a)** y **b)**. Productos de amplificación para la línea INBL **c)** y **d)**. **M:** marcador molecular en pb. Las células cultivadas en presencia de la citocina muestran un aumento en la expresión del producto de amplificación en ambas líneas celulares **a)** y **c)** en comparación a su control respectivo **b)** y **d)**.

Después de confirmar que las condiciones de amplificación por PCR, por medio de la expresión de β -actina, fueron las adecuadas, se procedió amplificar los productos de interés: caspasas -8 y caspasa -12 con ayuda de primers específicos, utilizando los cDNAs de las líneas celulares (CALO e INBL), cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2.

III. Expresión de Caspasa -8 en la línea celular CALO

Se sabe que caspasa -8 es una caspasa iniciadora en la vía de señalización de muerte celular apoptótica, mediada por receptores de muerte conocida como vía extrínseca. Y dado que esta línea celular cultiva en presencia de IL-2 es positiva a ANEXINA V, pensamos que caspasa -8 se puede estar regulando por esta citocina. Para confirmar esta regulación se cultivaron células en presencia (+) y ausencia (-) de 100UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos entre 30' y 144 h.

Los resultados obtenidos para la línea celular CALO, estadio IIB, muestran un producto de amplificación de 164pb que corresponde al esperado para caspasa -8. Se observa un aumento en la expresión del mensajero a 30', 2h y 144h, encontrando la mayor expresión en células cultivadas 30' con IL-2, con una disminución a 2h y 144h (Fig. 9a). La menor expresión, semejante al producto de amplificación de las células en ausencia de IL-2, se obtuvo a 48 y 96 h. Las células cultivadas en ausencia de IL-2 no muestran variación en el producto de amplificación para caspasa -8 con respecto al tiempo (Fig. 9b).

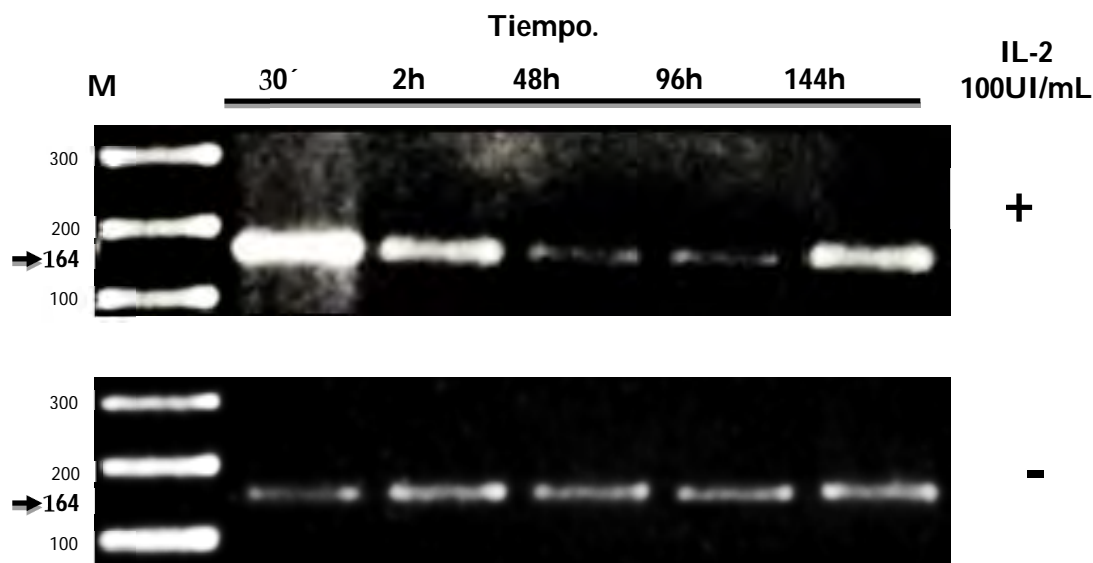


Fig. 9.- Expresión de Caspasa -8 en la línea celular CALO. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. El producto de amplificación de 164pb para caspasa -8, obtenidos por RT-PCR en la línea celular CALO, donde se observa un aumento en la expresión del mensajero a 30', 2h y 144h en células cultivadas en presencia de IL-2, mientras que las células en ausencia de IL-2 muestran un producto de amplificación homogéneo con respecto al tiempo de cultivo. **M:** marcador molecular en pb.

IV. Expresión de Caspasa -8 en línea celular INBL.

Para el caso de la expresión de caspasa -8 en la línea celular INBL, estadio clínico IV, también muestra un producto de amplificación de 164 pb en todos los tiempos de estudio (Fig. 10). Obteniendo la mayor expresión del mensajero en cultivos en presencia de IL-2 de 48h y 96h (Fig. 10a). Las células cultivadas en ausencia de IL-2 no muestran variación en el producto de amplificación, con respecto al tiempo (Fig. 10b).

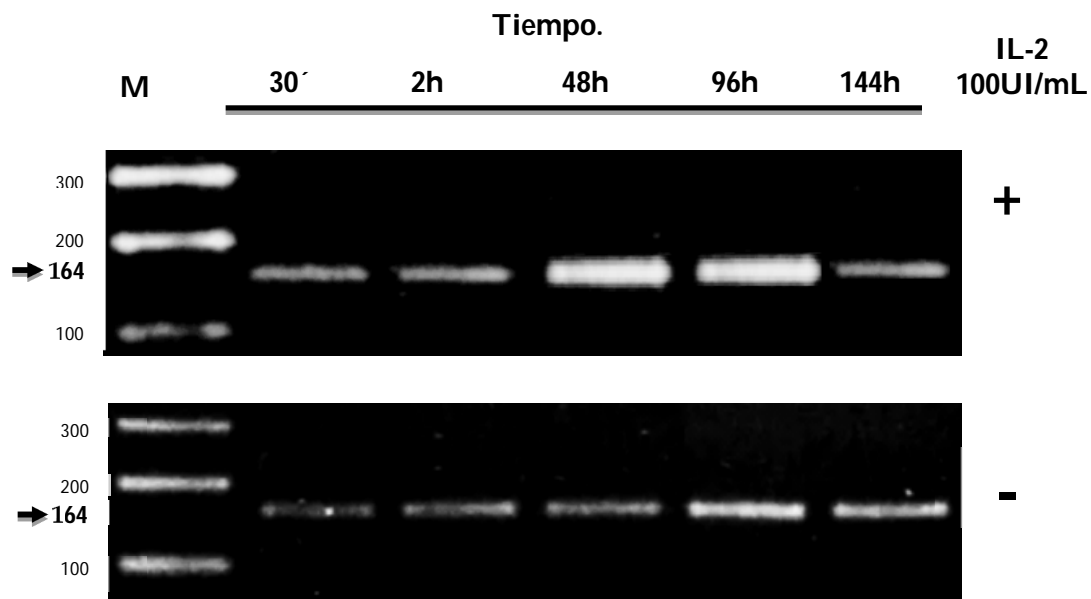


Fig. 10.- Expresión de Caspasa- 8 en la línea celular INBL. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. El producto de amplificación de 164pb para caspasa -8, obtenidos por RT-PCR en la línea celular INBL, donde se observa un aumento en la expresión del mensajero a 48h y 96h en células cultivadas en presencia de IL-2, mientras que las células en ausencia de IL-2 muestran un producto de amplificación homogéneo con respecto al tiempo de cultivo. **M:** Marcador molecular en pb.

V. Expresión de caspasa -12 en la línea celular CALO.

Caspasa -12 es una de las principales moléculas involucradas en la activación de muerte celular mediada por Estrés en el Retículo Endoplasmático. Por lo cual, el presente estudio evaluó la participación de 100UI/mL de IL-2 en la regulación de la expresión de esta caspasa.

Al examinar en el gel los productos de amplificación para caspasa 12 (228pb), en células de la línea CALO cultivada en presencia ó ausencia de IL-2 no se observa expresión de mensajero en ninguno de los tiempos de cultivo: 30', 2h, 48h, 96h y 144h (Fig. 11). El control interno de la técnica para las células cultivadas con IL-2 muestra el producto para β -actina esperado de 232 pb al igual que en las células cultivadas en ausencia de IL-2.

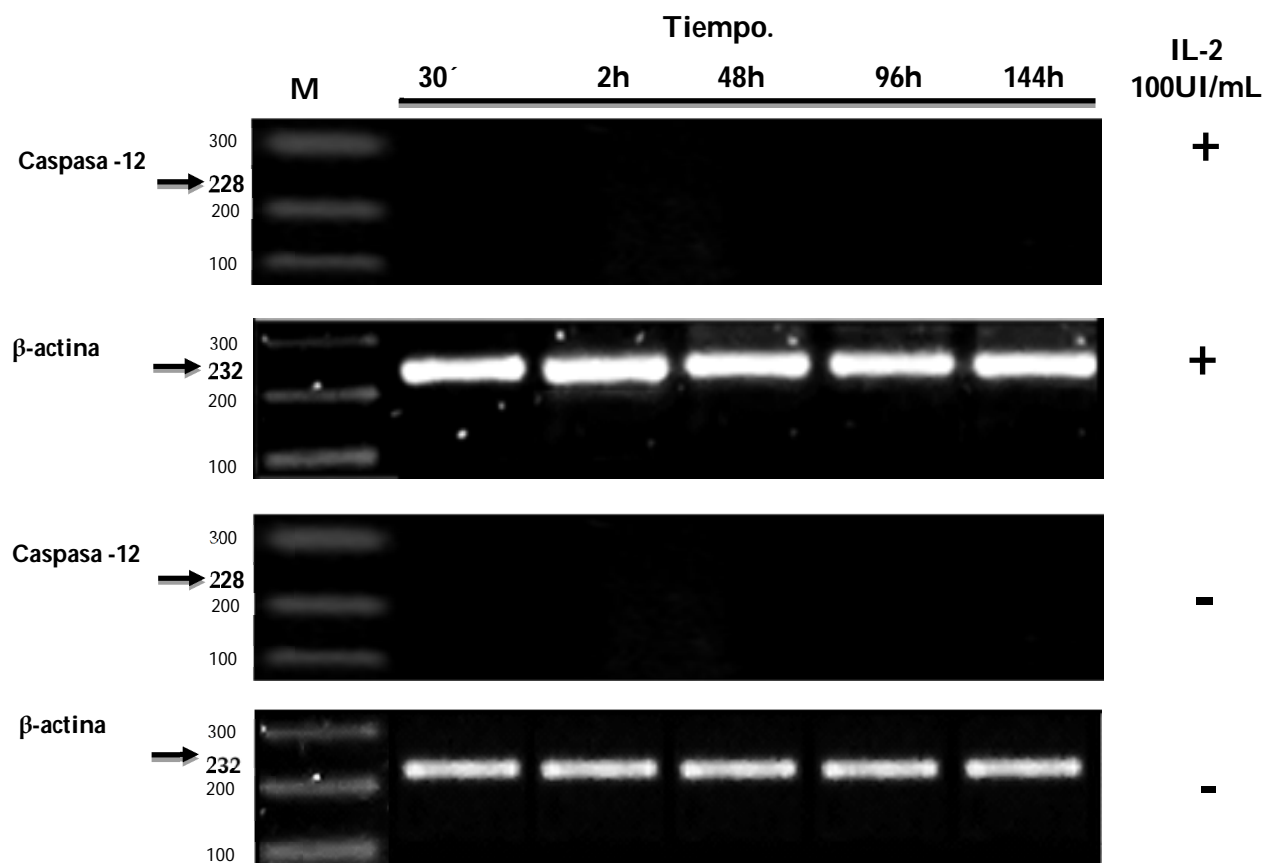


Fig. 11.- Expresión de Caspasa -12 en la línea celular CALO. Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. Los resultados no muestran producto de amplificación de caspasa -12 en las muestras de células cultivadas en ausencia o presencia de IL-2 sin importar el tiempo de cultivo. Solo se obtuvo producto de amplificación para β -actina (control interno de la técnica) 232pb en ambos cultivos. **M:** marcador molecular en pb.

VI. Expresión de Caspasa -12 en la línea celular INBL.

Para el caso de la línea celular INBL cultivada en presencia ó ausencia de 100UI/mL de IL-2, obtuvimos resultados semejantes a los de la línea celular CALO. Ya que no se observa el producto de amplificación para caspasa -12 en ninguno de los tiempos (Fig. 12). El control interno de la técnica para las células cultivadas con IL-2 muestra el producto para β -actina esperado de 232 pb, al igual que en las células cultivadas en ausencia de IL-2.

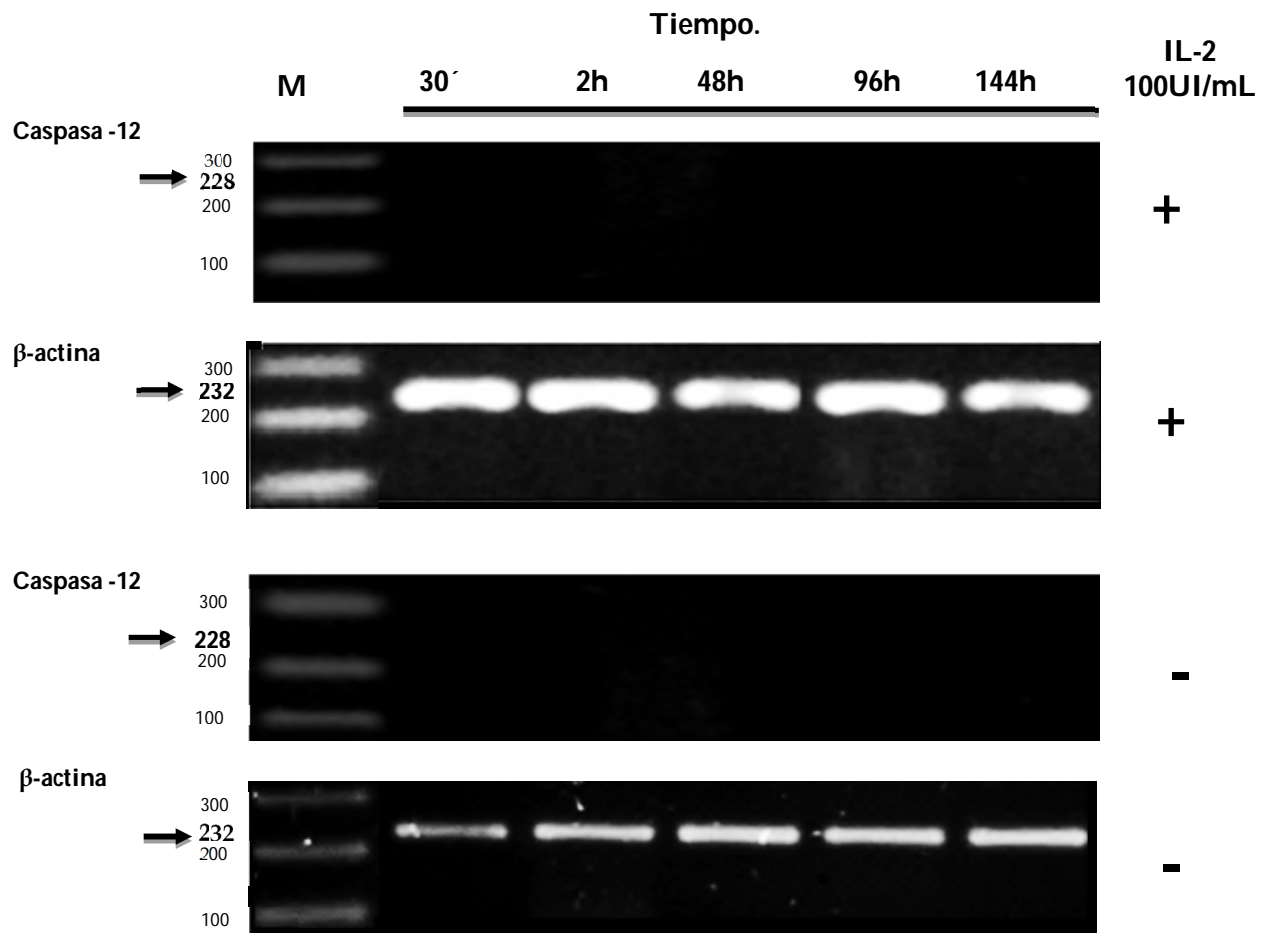


Fig. 12-- Expresión de Caspasa 12 en la línea celular INBL. . Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/mL (+). Células cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Tiempo de cultivo 30', 2h, 48h, 96h y 144h. Los resultados no muestran producto de amplificación de caspasa -12 en las muestras de células cultivadas en ausencia o presencia de IL-2 sin importar el tiempo de cultivo. Solo se obtuvo producto de amplificación para β -actina (control interno de la técnica) 232pb en ambos cultivos. **M:** marcador molecular en pb.

Para confirmar que los primers específicos de caspasa -12 utilizados en el presente estudio son los adecuados para amplificar su gen y de ese modo confirmar que esta caspasa no es regulada por IL-2. Se realizaron ensayos de la pertinencia de los primers para caspasa -12, para ello se sometió a diferentes líneas celulares a Estrés Celular, utilizando células positivas a HPV: CALO (HPV-18) e INBL (HPV-18); así como células no relacionadas con carcinoma de cérvix B16-F0 (Melanoma), se cultivaron en condiciones estresantes privándolas de Suero Fetal Bobino, durante: 5 días (B16-F0), 10 días (CALO, INBL). Una vez obtenidas las muestras se realizó la extracción del RNA, por la técnica de TRIzol.

VII. Expresión de caspasa -12 por Estrés celular en diferentes líneas celulares.

Con la finalidad de confirmar la integridad del RNA extraído de las células sometidas a estrés, se corrió un gel de agarosa al 1.5% donde se muestran las subunidades del 18S y 28S del RNAr de cada una de las líneas celulares empleadas, observándose en todos los casos bandas nítidamente visibles (Fig. 13).

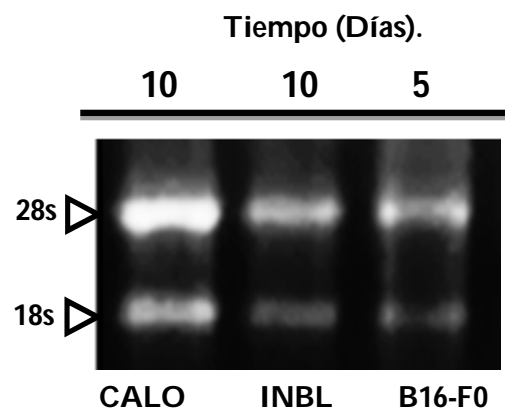


Fig. 13 Expresión del RNAr en diferentes líneas celulares sometidas a estrés celular. Se realizó la extracción del RNAm mediante la técnica de TRIzol™ de células cultivadas en condiciones estresantes en ausencia de SFB durante 5 y 10 días. Se observa la expresión del RNAr de diferentes líneas celulares: carril 1: CALO, Carril 2: INBL, Carril 3: B16-F0 correspondiente a una línea celular de melanoma. Se muestra la subunidad 28S y 16S del RNAr lo cual indica que se realizó una correcta extracción de RNA total.

Posteriormente se realizó la RT-PCR, los resultados muestran un producto de amplificación de 228 pb que corresponde a caspasa -12. Los resultados obtenidos (Fig. 14a) muestran que en la línea celular CALO existe una mayor expresión del mensajero para esta caspasa en comparación con el producto para esta caspasa en la línea INBL, sin embargo en la línea celular B16-F0 proveniente de melanoma existe una sobre-expresión del producto de amplificación de caspasa -12, que era de esperarse ya que esta línea celular es mucho más sensible a modificaciones en el cultivo y responden de manera muy positiva en la expresión de caspasa -12 inducida por estrés en el retículo Endoplasmático. Se utilizó el producto de amplificación de β -actina como control interno de la técnica, obteniendo como resultado un producto de amplificación homogéneo con respecto al tiempo (Fig. 14b),

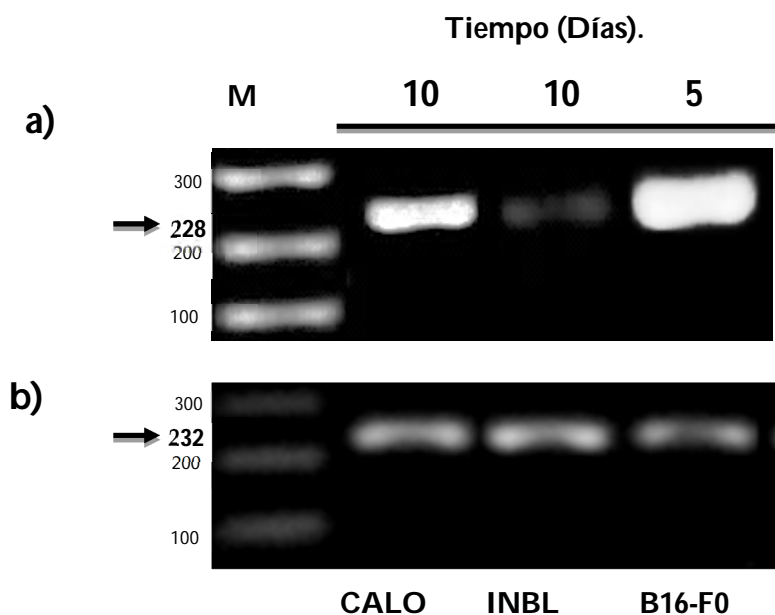


Fig. 14 Expresión de Caspasa -12 en diferentes líneas celulares inducida por Estrés celular. Líneas celulares cultivadas en condiciones estresantes privándolas de Suero Fetal Bovino durante 5 y 10 días. Por la Técnica de RT-PCR se obtuvo un producto de amplificación para Caspasa -12 de 228 pb.

a): Productos de amplificación de caspasa -12 en diferentes líneas celulares, observándose su expresión en las líneas celulares CALO, INBL y B16-F0; **b):** Productos de amplificación para β -actina, utilizados como control interno de la técnica, se aprecia un producto de amplificación de 232pb homogéneo en todos los tiempos de estudio. **M:** marcador molecular en pb

VII. Comparación de la expresión del mensajero para caspasa -8 en líneas celulares CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2

Para comprender el papel de IL-2 en el efecto anti-proliferativo y apoptótico en las líneas celulares CALO e INBL, se determinó la expresión del RNAm de caspasa -8 cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 durante 30', 2h, 48h, 96h y 144h, dicha caspasa es importante en la muerte celular apoptótica mediada por receptores de muerte. Los resultados muestran que ambas líneas celulares expresan el RNAm de caspasa -8, sin embargo, se observa una expresión diferencial del mensajero tanto entre las líneas celulares como con respecto al tiempo de cultivo.

En la línea celular CALO se tiene una mayor expresión del mensajero a 30', 2h y 144h (Fig. 15a) sin observar cambios en el control (Fig. 15b). Para la línea celular INBL se observa una mayor expresión a 48h y 96h (Fig. 15d) sin cambios en la expresión del mensajero para esta caspasa en el control (Fig. 15c).

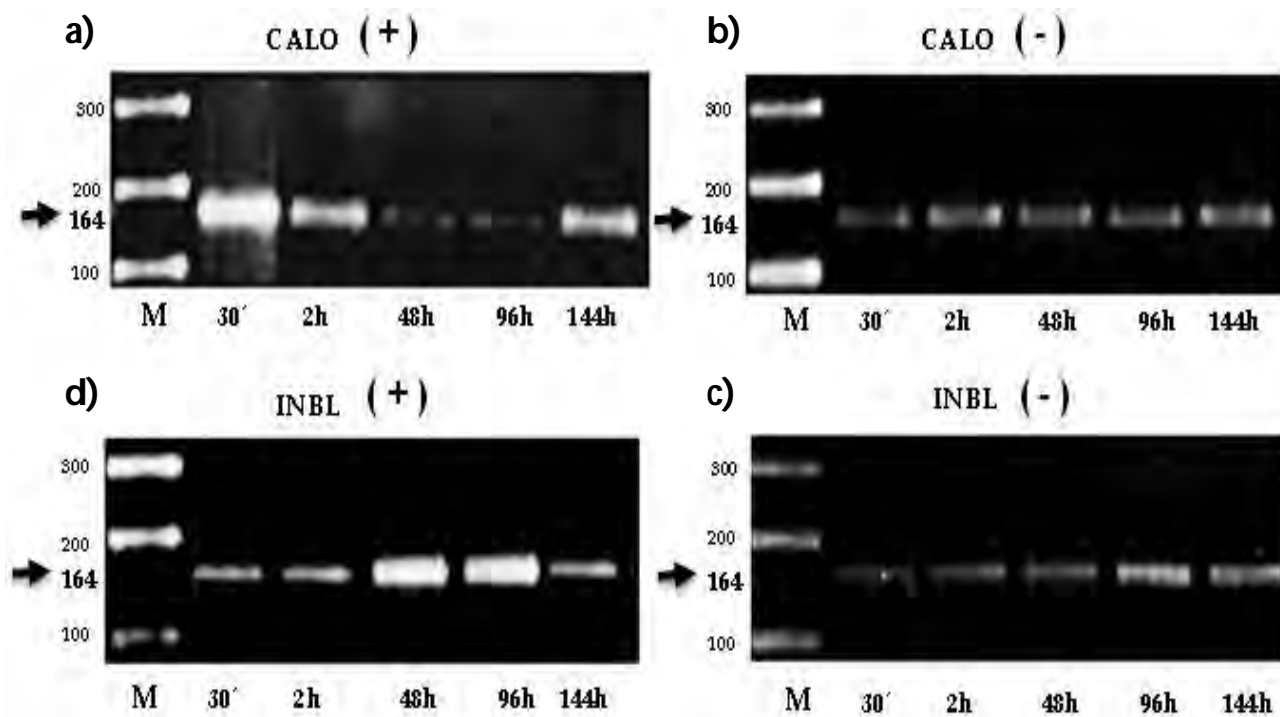


Fig. 15.- IL-2 regula la síntesis del mensajero para caspasa -8 en líneas celulares de CaCU. Células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 (+) o ausencia (-) a 30', 2h, 48h, 96h y 44h. **a):** línea celular CALO en las cuales existe una mayor expresión del mensajero de caspasa -8 a 30', 2h y 144h. **b):** Línea celular CALO en ausencia de 100UI/mL de IL-2. **c):** línea celular INBL cultivada en presencia de IL-2, se observa un aumento en la expresión del mensajero a 48h y 96h. **d):** línea celular INBL en ausencia de IL-2. **M:** marcador molecular en pb.

DISCUSIÓN

La IL-2 es un potente activador de linfocitos T, células NK, macrófagos, linfocitos B y estimula la liberación de otras citocinas en la respuesta inmunológica. Su efecto antitumoral es mediado por la activación de células NK, que se diferencian en células asesinas activadas por linfocinas (LAK). En esta respuesta antitumoral también, participan otras células citotóxicas, así como, citocinas; IFN- γ TNF- α (Yang, 2003). El uso de IL-2 como terapia contra el cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma de Cabeza y Cuello, Sarcomas, Plasmocitoma, Carcinoma de mama, Linfomas (Lui, 2004; Deshmukh, 2001). En particular nuestro grupo de trabajo ha usado como modelo de estudio al Cáncer Cérvico Uterino, por su alta incidencia en la población mexicana, y actualmente evalúa el uso de IL-2 como una alternativa terapéutica para este tipo de tumor.

El mecanismo de inhibición del desarrollo tumoral por IL-2 se ha determinado por su capacidad para promover el infiltrado de linfocitos T y células NK en el sitio del tumor, lo que aumenta el nivel de actividad lítica (Indrova, 2003; Mikyskova, 2000). Además, la presencia de IL-2 favorece la expresión de las subunidades β y γ del receptor de IL-2 (IL-2R), las cuales se requieren para los eventos de traducción de señales (Chen, 2004). Se ha demostrado que el IL-2R no es exclusivo de células linfoides, existen reportes acerca de su presencia en Fibroblastos humanos, células endoteliales, células epiteliales intestinales, de igual manera se ha encontrado ampliamente distribuido en distintos tumores sólidos. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor para IL-2, de alta afinidad, en líneas celulares de CaCU (Rocha et al, 2004; Rangel et al, 2010). Asimismo, se ha reportado que el receptor para IL-2, en estas células tumorales, tiene una expresión diferencial dependiente del estadio clínico del tumor (Rangel, et al., 1998).

La interleucina-2(IL-2) recombinante es una de las citocinas empleadas en la inmunoterapia contra tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped. Estudios previos desarrollados en nuestro grupo de trabajo han reportado que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de líneas celulares de CaCU se obtiene una respuesta dual. 1) Se puede inhibir su proliferación en presencia de 100UI/mL de IL-2 desencadenando una respuesta apoptótica; 2) O bien se puede inducir su proliferación en presencia de 10 UI/mL (Alvarado 1997; Rangel et al, 2010, Del Rio Ortíz 2011).

Por otro lado, se ha reportado que estas células de CaCU, no sólo expresan IL-2R, sino que también producen y secretan IL-2, lo que sugiere que las células tumorales de CaCU han adquirido una dependencia por este factor para su proliferación como un mecanismo de evasión inmunológico (Rangel et al, 2010).

Hasta ahora se ha observado que las células de CaCU, CALO e INBL, inhiben su proliferación en presencia de 100UI/mL de IL-2, sin embargo, desconocemos el mecanismo molecular utilizado por IL-2 para inducir su muerte. Por lo antes mencionado, el presente estudio evaluó la participación de caspasa -8 y -12 en la inducción de apoptosis mediada por 100UI/mL de IL-2, en un modelo *in vitro*. Se eligió determinar la regulación del mensajero para estas caspasas ya que pertenecen a la familia de cisteín-proteasas, las cuales juegan un papel crítico en la apoptosis, de acuerdo a su función dentro de la cascada de señalización apoptótica, se clasifican como iniciadoras participando en la activación del proceso apoptótico por vías diferentes, caspasa -8 es capaz de activar la vía apoptótica extrínseca y caspasa -12 la vía intrínseca mediada por estrés del Retículo Endoplasmático (RE). Al esclarecer la participación de estas caspasas en la inducción de muerte por IL-2 en células de CaCU proporcionamos información para la comprensión del mecanismo molecular inducido por IL-2 en células de CaCU.

Caspasa- 8 actúa como una caspasa iniciadora en el proceso apoptótico mediado por receptores de muerte como FAS, TNFR, TRAILR, los cuales con ayuda de moléculas adaptadoras denominadas FADD forman el Complejo de Señalización Inductor de Muerte "DISC", dando como resultado el reclutamiento y activación de caspasa -8. Caspasa -12 interviene como una caspasa iniciadora en la apoptosis mediada por RE, cuando ocurre un Estrés celular causado por una respuesta al mal plegamiento proteico (UPR), concentraciones elevadas de Ca^{2+} en el citosol, entre otros factores indicadores de estrés (Nakagawa et al, 2000).

Para la determinación de caspasa -8 y -12 se utilizó la técnica RT-PCR, debido a su alta especificidad en la amplificación de productos de interés. Se determinó la expresión de β -actina como control interno de la técnica dada su característica de ser una proteína constitutiva de la célula, ya que desempeña una variedad de funciones biológicas en los componentes que la integran, como el citoesqueleto, dentro de sus principales funciones biológicas están relacionadas con la movilidad celular y los cambios en la forma de la célula durante el ciclo celular, también, participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares. Es esencial para algunas actividades contráctiles, controla las interacciones celulares, la adhesión molecular y el transporte intracelular. Por lo cual β -actina es utilizado como un indicador de síntesis proteica continua por lo cual en este estudio el mensajero para esta proteína es utilizado como control positivo de amplificación (Mori et al, 2008; Bas et al, 2004).

Por lo que el haber obtenido productos de amplificación de 232pb homogéneos para β -actina, en nuestros ensayos corroboramos que las condiciones de amplificación empleadas en la PCR fueron correctas, con lo cual podemos obtener resultados confiables durante la determinación de los productos de amplificación para la caspasa -8 (164 pb) y caspasa -12 (221pb). Por otro

lado, el hecho de observar que en células cultivadas en presencia de IL-2 muestren un aumento en los productos de amplificación para β -actina sugiere que IL-2 induce una mayor actividad metabólica regulando la síntesis de diversas proteínas.

Sabemos que algunas modificaciones intracelulares mediadas por la presencia de sustancias tóxicas, así como el estrés intracelular pueden activar la vía intrínseca regulada por el RE, la cual está caracterizada por la síntesis de caspasa -12 (Kalai et al, 2003). Con el propósito de esclarecer si IL-2 puede inducir esta vía apoptótica analizamos la expresión del mensajero para caspasa -12, los resultados indican que el mensajero para caspasa -12 no se encuentra presente de forma natural en células cultivadas en ausencia de IL-2 y que esta caspasa no es regulada por IL-2, por tanto las células de las líneas de CaCU CALO e INBL, si mueren por apoptosis no lo hacen a través de esta vía apoptótica, es decir no es por estrés en el Retículo Endoplasmático.

La afirmación anterior se basa en los resultados obtenidos de un experimento adicional, en el cual se indujo a estrés intracelular a las líneas CALO e INBL incluyendo la línea celular B16-F0 que se sabe es muy susceptible a morir por apoptosis a través de estrés en retículo endoplásmico y en particular por la activación de caspasa -12. Los resultados obtenidos, muestran la expresión de RNAm para caspasa -12 en las líneas celulares CALO e INBL, en donde la mayor expresión se obtuvo en la línea CALO en comparación con la línea INBL, lo cual, se podría correlacionar con su estadio clínico. Y como era de esperarse en la línea B16-BF0 se observó la mayor expresión de mensajero para caspasa -12.

Con ello se demuestra que 100UI/mL de IL-2 no induce la síntesis del mensajero para caspasa -12 y que la citocina no induzca estrés en el RE, sin embargo, Obeng (2005) reporta que se puede inducir muerte celular por estrés en el RE mediado por otras caspasas como caspasa -7 (Obeng y Boise, 2005), por lo cual proponemos que futuros estudios no descarten la participación de otras moléculas que activan un respuesta de muerte celular mediada por el RE como m-calpaína, o concentraciones de Ca^{2+} , en la inducción de muerte celular mediada por IL-2.

Por otro lado, en cuanto los resultados para caspasa -8, el hecho de que las células de las líneas de CaCU, CALO e INBL, en ausencia de IL-2, expresen el mensajero para caspasa -8 sin grandes variaciones con respecto al tiempo, sugiere que las células pueden estar sintetizando el mensajero de caspasa -8 de manera continua, para transcribir una proteína en su forma inactiva (cimógenos), que necesita ser sometida a un estímulo apoptótico para su activación. Lo que se interpreta como un mecanismo de seguridad, por medio del cual la célula solo entra en apoptosis cuando recibe una señal de muerte externa ó interna. Y responde ante esta señal activando por hidrólisis a estos cimógenos. Otra posibilidad es que caspasa -8 participe en funciones no apoptóticas como en los mecanismos de proliferación, supervivencia, migración y activación de NF- κ B tal como se ha reportado en linfocitos y macrófagos (Lamkanfi et al, 2007).

En particular, el que en la línea celular CALO, estadio IIB, cultivada en ausencia de IL-2, detectamos el mensajero para caspasa -8, es muy interesante, sin embargo, es más relevante que 100UI/mL IL-2 modifica su expresión en tiempos cortos, dado que la mayor expresión del mensajero para caspasa -8 a 30' y 144h con una disminución a través de este intervalo, podemos sugerir que hay un ciclo de regulación en la síntesis del RNAm de caspasa -8 mediado por IL-2. Lo cual puede ser un evento inicial para la activación de esta caspasa, tal como lo reporta Du 2005, quien sugiere que caspasa -8 puede ser activada directamente por una baja regulación de su inhibidor "c-Flip" el cual es regulado por IL-2.

En lo que se refiere al efecto de IL-2 en la regulación de caspasa -8 en la línea celular INBL, estadio clínico IVB (Cáceres et al, 2001; Rangel et al, 2010). Notamos que estas células requieren de un mayor tiempo de interacción con la citocina, 48h, para inducir aumento de la expresión del mensajero para caspasa -8. Estos datos sugieren, una resistencia a la inducción de la apoptosis en células en estadios avanzados, por lo cual, estas células necesitan de más tiempo en contacto con la citocina para activar la síntesis del RNAm de caspasa -8.

La expresión diferencial del mensajero de caspasa -8 regulada por IL-2, sugiere que las células derivadas de CaCU, son sensibles a IL-2 y que esta sensibilidad pudiera depender el estadio clínico.

La expresión de caspasa -8 nos sugiere que IL-2 regula la apoptosis por activación de la vía extrínseca, sin embargo aún desconocemos como IL-2 puede mediar la sobre-expresión de ésta caspasa en células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 y que tipo de muerte celular puede activar caspasa -8, si la muerte celular tipo I donde solo participan receptores de muerte, caspasa -8 y una caspasa efectora; ó activa la tipo II en donde caspasa -8 provoca la activación proteolítica de algún miembro de la familia Bcl-2 como "BID" para activar y amplificar la señal de muerte con la vía intrínseca mitocondrial (Li et al, 2009).

Diversos estudios indican que la activación de caspasa -8 pudiera estar mediada por su inhibidor "c-Flip", el cual se ha descrito como un regulador clave en la apoptosis mediada por receptores de muerte (Krueger, 2001). c-Flip tiene una estructura casi idéntica a caspasa -8, contiene dos dominios de muerte (DEDs), pero carece del pentapéptido conservado QAC(R/Q)G esenciales para la catálisis de cistein-proteasas y es capaz de formar tetrámeros no funcionales que se unen a FAS/TNFR-1 y evitar la apoptosis (Safa y Pollok, 2011).

Du y colaboradores (2005) indican que la expresión de c-Flip en células T, está regulada por citocinas y especialmente por IL-2, también han demostrado que IL-2 regula una baja expresión de c-Flip en células de riñón en ratón así como, en humanos (Du et al, 2005; Wang et al, 2010), otro estudio demuestra que IL-2 aumenta la apoptosis en células T CD4+, la cual es asociada con una baja regulación del RNAm de c-Flip (Refaeli et al 1998).

En células de cáncer de mama (MCF-7) se ha demostrado que la ausencia de c-Flip desencadena la auto-activación de caspasa -8 (Travis et al ,2008). En la mayoría de los tumores c-Flip se encuentra sobre-expresado como un posible mecanismo de inhibición de apoptosis en células tumorales (Safa y Pollok, 2011), se ha reportado la presencia de c-Flip en líneas celulares de CaCU: SiHa, C33-A, y en neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) clase I, II y III (Hou et al, 2009; Wang et al, 2010).

De acuerdo a lo discutido anteriormente proponemos que IL-2 puede regular negativamente a c-FLIP y activar a caspasa -8 o bien generar una mayor susceptibilidad a una activación de receptores de muerte (FAS, TRAILR, TNFR), y desencadenar así una respuesta apoptótica al activar a una caspasa efectora. Por lo antes mencionado hemos diseñado un modelo hipotético del mecanismo molecular desencadenado por IL-2 para inducir muerte celular por apoptosis, considerando que CALO e INBL pudieran tener sobre-expresado a c-Flip (Fig. 16).

Esta hipótesis se apoya en datos recientes, proporcionados por Del Río-Ortíz (2011), que muestra una fragmentación de DNA (200 pb) en células CALO e INBL cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2, la cual es una característica del proceso apoptótico. Martínez-Hernández (2011) reporta en estas mismas líneas celulares que 100UI/mL de IL-2 aumenta la expresión del RNAm de caspasa -3 (caspasa efectora), lo que confirma la muerte celular inducida por IL-2.

Nuestra investigación proporciona información del mecanismo molecular de la muerte celular inducida por IL-2 en células de las líneas de CaCU CALO e INBL, regulando la expresión del RNAm para caspasa -8, la cual es inversamente proporcional al estadio clínico del tumor. Sin embargo, no debemos perder de vista que en dicho mecanismo de regulación de la apoptosis también pueden influir la sobre-expresión de c-Flip, común en células neoplásicas. Con los resultados aquí descritos podemos proponer el siguiente esquema de la inducción de la vía apoptótica en células de CaCU por IL-2 (Fig. 16).

Finalmente planteamos que, el tratamiento con IL-2 para pacientes con Cáncer Cérvico Uterino puede proponerse como una alternativa terapéutica prometedora, para inducir la muerte por apoptosis de tumores en estadios tempranos. Y al mismo tiempo activar la respuesta inmunológica del paciente por la presencia de IL-2, con un beneficio dual para las pacientes.

Modelo Hipotético del mecanismo de acción de IL-2 en líneas celulares de CaCU

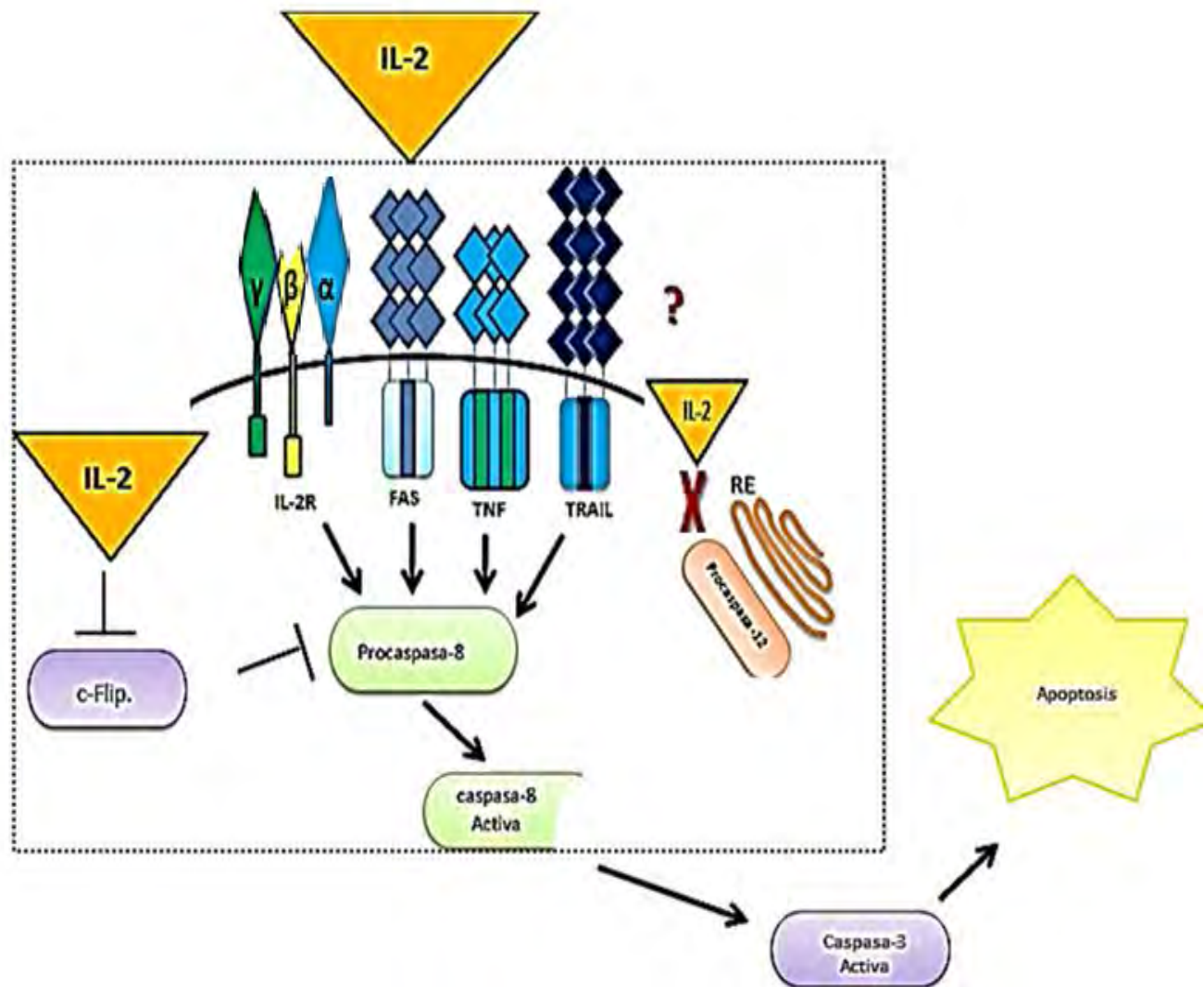


Fig. 16.- Modelo Hipotético del mecanismo de acción de IL-2 en líneas celulares de CaCU.

Modelo Hipotético propuesto, para la activación de apoptosis mediada por IL-2 a 100UI/mL. En el cual IL-2 regula negativamente a c-Flip e induciendo una auto-activación de caspasa -8 o haciendo a las células más susceptibles a la activación de receptores de muerte.



CONCLUSIONES.

- El RNAm de caspasa -8 es expresado en líneas celulares de CaCU: CALO e INBL cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.
- 100UI/mL de IL-2 regula la síntesis del mensajero para caspasa -8 y aumenta su expresión en las líneas celulares CALO e INBL.
- En la línea celular CALO cultivada en presencia de 100UI/mL de IL-2 aumenta la expresión del RNAm de caspasa -8 a 30, 2h y a 144h en comparación de su transcripción normal (control).
- En la línea celular INBL cultivada en presencia de 100UI/mL de IL-2 aumenta la expresión del RNAm de caspasa -8 a 48h y 96h en comparación de su transcripción normal (control).
- 100UI/mL de IL-2 NO regula la expresión del RNAm para caspasa -12 en las líneas celulares CALO e INBL.
- IL-2 a 100UI/mL podría no regular un estrés en el ER.



PERSPECTIVAS.

Para ampliar los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería interesante continuar con las siguientes propuestas:

- Determinar la Regulación de la Proteína de caspasa -8 en células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 por Western Blot.
- Determinar la actividad de caspasa -8 por método colorimétrico.
- Analizar la expresión de c-Flip en células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.
- Determinar la posible participación de los receptores de muerte (FAS, TRAIL, TNFR), en células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.
- Determinar la posible participación de algunas moléculas claves en la muerte celular mediada por el RE (Concentraciones de Ca^{2+} , Calpaínas), en células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.

APENDICE I.

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR.

a. Retrotranscripción:

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (Células cultivadas en presencia y ausencia de 100UI/mL de IL-2). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

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

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:50 en un volumen de 200µL.

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

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

1000

= 1 µg / µL

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

Reactivos	1 RX	5 RX controles	5 RX estímulos
Amortiguador 5x (PROMEGA)	5 µL	25µL	25µL
DNTP's 10 Mm (INVITROGEN)	1.5 µL	7.5µL	7.5µL
Enzima MMLV-RT (PROMEGA)	1 µL	5µL	5µL
Oligo dt (PROMEGA)	2 µL	10µL	10µL
Muestra	¿ µL	¿µL	¿µL
Agua libre RNAsas (FERMENTAS)	¿ µL	¿µL	¿µL
Volumen Total	20 µL	200µL	200µL

Tabla 3. Condiciones para RT.

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

Con los cDNAs obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requirieron (tabla 4), para cada primer utilizado en el presente estudio (β -actina, Caspasa -8 y Caspasa -12).

Reactivos	1 RX	10 RX β -actina	10 RX Caspasa -8	10 RX Caspasa -12
Amortiguador 5x Green (PROMEGA)	6 μL	60μL	60μL	60μL
DNTP's 10 Mm (INVITROGEN)	0.8μL	8μL	8μL	8μL
Primer 1 (Sentido) (UNIPARS, S.A.)	1 μL	10μL β-actina	10μL Caspasa -8	10μL Caspasa -12
Primer 2 (Antisentido) (UNIPARS, S.A)	1 μL	10μL β-actina	10μL Caspasa -8	10μL Caspasa -12
Go Taq Polimerasa (PROMEGA)	0.15 μL	1.5μL	1.5μL	1.5μL
Muestra cDNA	4 μL	4μL	4μL	4μL
Agua libre RNAsas (FERMENTAS)	7.05 μL	70.5 μL	70.5 μL	70.5 μL
Volumen Total	20 μL	200μL	200μL	200μL

Tabla 4. Condiciones para cada reacción en la técnica PCR.

APENDICE II.

Reactivos y Soluciones Utilizados.

Soluciones para cultivo

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

Reactivos Extracción ARN Total

- TRIzol (Invitrogen)
- Cloroformo (Sigma)
- Isopropanol (Sigma)
- Etanol 70% (J.T Baker)
- H₂O inyectable (Pisa)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP´S 5mM (Invitrogen)
- Oligo dT (Promega)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP´S 10 mM (Invitrogen)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers: β - actina (1:5), Caspasa -8 (1:5), Caspasa -12 (1:5) (Unipars S.A)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga Blue/yellow 6X (promega)
- Bromuro de etidio

APENDICE III.

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**

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

– Tris base	3.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Cloruro de sodio	8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Cloruro de potasio	0.04 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Etilen –diamen-tetra-acético (EDTA)	0.40 g (sigma chemical Co.U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)**

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

– Cloruro de magnesio	0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Cloruro de calcio	0.10 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Cloruro de sodio	8.00 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Cloruro de potasio	0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Fosfato monoácido de sodio	2.16 g (sigma chemical Co.U.S.A)
– Fosfato diácido de potasio	0.20 g (sigma chemical Co.U.S.A)



El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

- **DNTPS 10 mM (MIX)**

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

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

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

- **TBE 10X**

- Tris base 108g (sigma chemical Co.U.S.A)
- Ácido bórico 55g (sigma chemical Co.U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 mL. (sigma chemical Co.U.S.A)

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

- **TBE 1X**

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

- **TBE 0.5X**

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

BIBLIOGRAFIA.

- Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome. Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*; **9**: 423–432.
- Aggarwal B. y Gutterman J (1992). Human cytokines: Handbook for basic and clinical research. *Blakwell Scientific Boston*, 441.
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, ES. (1997) CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res*; **57**:615–9.
- Alnemri E. S., Livingston D. J., Nicholson D. W., Salvesen G., Thornberry N. A., Wong W. W. and Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*; **87**:171.
- Alvarado, M.J.A (1997). Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F.
- Anderson P y Sorenson M (1994). Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet*; **27**(1):19-31.
- Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*; **12**(6): 611-620
- Asfar S. Azmi1 and Ramzi M. Mohammad. (2009) Non-Peptidic Small Molecule Inhibitors against Bcl-2 for Cancer Therapy. *J Cell Physiol*; **218**(1): 13–21.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*; **281**:1305-1308.
- Baliga BC, Colussi PA, Read SH, Dias MM, Jans DA, Kumar S. (2003) Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *J Biol Chem*; **278**:4899–4905.
- Baliga C, Kumar S (2003) The Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow? *Cell Death Differ*; **10**: 15–17.
- Bas A, Forsberg G, Hammarstro M. (2004). Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, β -actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*; **59**: 566–573
- Batista LFZ, Kaina B, Meneghini R, Menck CFM. (2009) How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res*; **681**:197-208.
- Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrissette NS, Walsh CM. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:16677–16682.
- Ben Moshe T, Barash H, Kang TB, Kim JC, Kovalenko A, Gross E, Schuchmann M, Abramovitch R, Galun E, Wallach D. Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. *Hepatology* 2007; **45**:1014–1024.
- Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D. and Onteniente B. (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci*; **21**: 7127-7134.
- Bermúdez Morales Víctor Hugo, Peralta Zaragoza Oscar y Madrid Marina Vicente (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública de México*, **47**(6):458-468.

- Bhardwaj A. and Aggarwal B. B. (2003) Receptor-Mediated Choreography of Life and Death. *Journal of Clinical Immunology*; **23**:317-332.
- Bian, Zong-Mei., Elner, Susan G., Elner, Victor M. (2008) Regulated Expression of Caspase-12 Gene in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Suggests Its Immunomodulating Role Investigative *Ophthalmology & Visual Science*; **49**(12): 5593-5601.
- Bitko, V., y S. Barik. 2001. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J. Cell. Biochem*; **80**:441-454.
- Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 90-98.
- Boatright, K.M. and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol*; **15**: 725-731.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherlin, D.P., Green, D.R. and Salvesen, G.S. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*; **11**: 529-541.
- Bortner, C. D. and J. A. Cidlowski (2002). "Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell." *Cell Death Differ*; **9**(12): 1307-10.
- Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*; **70**:231-239
- Bredesen, and H.M. Ellerby. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem*; **277**:21836-21842.
- Buendia B., Santa-Maria A. and Courvalin J. C. (1999) Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci*; **112**:1743-1753.
- Caballero A. y Moran J. (2002) Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *REB*. **21**:235-244.
- Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, et al. (2001). Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res*; **61**: 6281-6289.
- Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J. H., Hubbard S. R., Harding H. P., Clark S. G. and Ron D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*; **415**:92-96.
- Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES, Shi Y. (2001) Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell*; **107**(3):399-407.
- Cohen GM. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*; **326**(Pt 1):1-16.
- Cotter, Thomas G. (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer* **9**:501-507.
- Creagh, E. M., Conroy, H. and Martin, S. J. (2003) Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev*; **193**: 10-21.
- Curtin J. F. and Cotter T. G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*; **15**:983-992.
- D'Amours D., Sallmann F. R., Dixit V. M. and Poirier G. G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci*; **114**: 3771-3778.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). Cell death: critical control points. *Cell* **116**(2): 205-219.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. (2005) Does autophagy contribute to cell death?. *Autophagy*; **1**: 66-74.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene*; **22**(53): 8543-8567.

- Depuydt, B., G. Van Loo, et al. (2005). "Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors." *J Cell Sci*; **118**(3): 497-504.
- Diaz - Horta, O., A. Kamagate, A. Herchuelz, and F. Van Eylen. 2002. Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin-releasing BRIN-BD11 cells. *Diabetes*. 51:1815–1824.
- Diwan A, Wansapura J, Syed FM, Matkovich SJ, Lorenz JN. (2008). Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation. *Circulation*; **117**: 396–404.
- Dix M.M., Simon GM, Cravatt BF. (2008) Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell*; **134**:679-691.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., and Grütter, M. G. (2003) Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell*; **11**, 543–549.
- Dohrman, A., T. Kataoka, et al. (2005). "Cellular FLIP (Long Form) Regulates CD8+ T Cell Activation through Caspase-8-Dependent NF- κ B Activation." *J Immunol* **174**(9): 5270-5278.
- Du Caigan, Guan Qionong, Yin Ziqin, Zhong Robert, and Jevnikar Anthony M. (2005). IL-2-mediated apoptosis of kidney tubular epithelial cells is regulated by the caspase-8 inhibitor c-FLIP. *Kidney International*; **67**:1397–1409.
- D-zul-Rosado Karla, Puerto-Solís Maylin, González-Losa María del R. (2004). Cáncer cervico uterino: métodos actuales para su detección. *Rev. Biomed*; **15**:233-241.
- Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ et al. (2004) Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug treated cells die. *J Cell Biol*; **165**: 835–842.
- Elmore Susan. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*; **35**(4): 495–516.
- Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. and Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*; **391**:43-50.
- Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2005) Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Mol Cell Biol*; **25**: 2808–2818.
- Feig, C., V. Tchikov, et al. (2007). "Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling." *Embo J*; **26**(1): 221-31.
- Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M, Vandenberghe P. (2006). Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem*; **387**:1005–1016.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000) Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a synthetic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*; **182**: 41-49.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*; **384**:201–232
- Fujita E, Kuroku Y, Jimbo A, Isoai A, Maruyama K, Momoi T. (2002). Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ*; **9**: 1108.
- Gaur U. and Aggarwal B. B. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*; **66**:1403-1408.
- Glucksmann, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev*; **26**:59–86 (1951).
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*; **281**:1309-1312
- Gröbner, S., I. Adkins, et al. (2007). "Catalytically active Yersinia outer protein induces cleavage of RIP and caspase-8 at the level of the DISC independently of death receptors in dendritic cells." *Apoptosis*; **12**(10): 1813.

- Guicciardi ME, Gores GJ. (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J*; **23**:1625-1637.
- Guimares, Cinthya Assunca and Linden Rafael. (2004) Programmed cell death Apoptosis and alternative deathstyles *Eur. J. Biochem*; **271**:1638–1650.
- Guzmán, C., et.al. (2004) Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y en pacientes con neutropenia. *Alergia, Asma e inmunológica pediátricas*; **13**(1):15-23.
- Han, J., W. Hou, et al. (2008). "Involvement of Protective Autophagy in TRAIL Resistance of Apoptosis-defective Tumor Cells." *Journal of Biological Chemistry*; **283**(28): 19665-19677.
- Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell*. **6**: 1099-1108.
- 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.
- Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T. and Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell*; **10**, 3787-3799.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*; **407**(6805): 770-6.
- 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.
- Hernández Jiménez Miriam Araceli. Determinación de la interacción de liposomas catiónicos con IIL-2. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. México D.F. 2005.
- Herrero-Martin, G., M. Hoyer-Hansen, et al. (2009). "TAK1 activates AMPKdependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells." *EMBO J*; **28**(6): 677.
- Horvitz, H. R. Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci. Rep.* 5, 239–303 (2003).
- Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM.(1998) Caspase- 14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem*; **273**:29648–53.
- Hur, J., S.Y. Kim, H. Kim, S. Cha, M.S. Lee, and K. Suk. 2001. Induction of caspase- 11 by inflammatory stimuli in rat astrocytes: lipopolysaccharide induction through p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *FEBS Lett.* 507:157–162.
- Igney FH, Krammer PH.(2002)Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; **2**:277–88.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; **388**: 190.
- Jin, Z., Y. Li, et al. (2009)."Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling." *Cell* **137**(4): 721.
- Jost, P. J., S. Grabow, et al. (2009). "XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis." *Nature*; **460**(7258): 1035.
- Kalai, Michael, M Lamkanfi, ohamed., Denecker Geertrui., Boogmans, Michael ., Lippens, Saskia., Meeus, Ann., Declercq, Wim y Vandenabeele, Peter. (2003) Regulation of the expression and processing of caspase-12. *The Journal of Cell Biology*; **162**(3):457-467.
- Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. (2002) Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ*; **9**:1115–1125.
- Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, Waisman A, Brenner O, Haffner R, Gustafsson E, et al. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol*; **173**:2976–2984.

- Kaufman R. J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*; **13**: 1211-1233.
- Kendall A. Smith, Helen L. Henry y Anthony W. Norman (2002). Interleukin 2 (IL-2), of enciclopedia of hormones. Division of Immunology, Departamento of Medicine Weil Medical College of Cornell University, New York; **1**:7
- Kerr, J. F. (1965). A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol*; **90**:419-435
- Kilic, M., R. Schafer, J. Hoppe, and U. Kagerhuber. (2002). Formation of noncanonical high molecular weight caspase-3 and -6 complexes and activation of caspase-12 during serum starvation induced apoptosis in AKR-2B mouse fibroblasts. *Cell Death Differ*; **9**:125-137.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489. cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells." *EMBO J*; **28**(6): 677.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*; **276**: 46639-46646.
- Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*; **285**:1150-4.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*; **7**:1166-1173
- Kruidering M, Schouten T, Evan GI and Vreugdenhil E (2001) Caspase-mediated cleavage of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-like kinase facilitates neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem*; **276**: 38417-38425.
- Kruidering Marieke, and Gerard I. Evan (2000) Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of "The End"? *IUBMB Life*; **50**: 85-90.
- Kumar, S (2007). "Caspase function in programmed cell death" *Cell Death and Differentiation*; **14**:32-43.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; **171**:4672-9.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter Jr GA, Booth CJ, Mehal WZ et al. (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*; **311**: 847-851.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci*; **118**:265-267
- Lavrik Inna N, Golks Alexander, and Krammer, Peter H (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death *The Journal of Clinical Investigation*; **15**(10):2665-2672.
- Lee K., Tirasophon W., Shen X., Michalak M., Prywes R., Okada T., Yoshida H., Mori K. and Kaufman R. J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*; **16**:452-466.
- Leyton, L. and A. F. Quest (2004). Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on a recurrent theme in cell life and death. *Biol Res*; **37**(1): 29-43.
- Li, Y., L. Qi, et al. (2009). "Alternative Fas-mediated cell death pathway is dependent on the different cleavage patterns of procaspase-8." *Mol Cell Biochem*; **331**(1-2): 231-8.
- Lin, X. Y., M.S. Choi, and A.G. Porter. (2000). Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon- γ . *J. Biol. Chem*; **275**:39920-39926.

- Lindsey A. Allan and Paul R. Clarke (2009) Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS Journal*; **276**: 6063–6073.
- Liu QA, Hengartner MO (1999) The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*; **887**: 92-104
- Liu X., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1997) DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. *Cell* ; **89**:175-184.
- Loegering DA, Ruchaud S, Earnshaw WC, Kaufmann SH (2006) Evaluation of the role of caspase-6 in anticancer drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ*; **13**:346–347.
- López- Saavedra A. y Lizano- Soberón M., 2006. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerol*; **1**: 31-55.
- Luthi A. U. and Martin S. J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*; **14**, 641-650.
- M Lamkanfi1, N Festjens1, W Declercq, T Vanden Berghe and P Vandenabeele. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation*; **14**: 44–55.
- Maelfait J. y Beyaert R. (2008). "Non-apoptotic functions of caspase-8." *Biochemical Pharmacology* 76(11): 1365.
- Mahrus S, Trinidad JC, Barkan DT, Sali A, Burlingame AL, Wells JA. (2008). Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell*; **134**:866-876.
- Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol*; **149**:603–12.
- Marsden VS, Ekert PG, Van Delft M, Vaux DL, Adams JM, Strasser A (2004) Bcl-2 regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol*; **165**: 775–780.
- Martinon F, Tschopp J. (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*; **14**:10-22.
- Martínez M Francisco Javier (2004). Epidemiología del cancer del cuello uterino *Medicina Universitaria*, **6**(22):39-46.
- Mayer, B. and R. Oberbauer (2003). "Mitochondrial regulation of apoptosis." *News Physiol Sci*; **18**: 89-94.
- Medema, J. P. y, Scaffidi C. (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." *Embo J*; **16**(10): 2794-804.
- Mendoza-Rincon and B Weiss-Steider. (1998). Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors*; **3**:1239-1243.
- Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca² signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*; **32**: 269–278, 2002.
- Milhas D, Cuvillier O, Therville N, Clave´ P, Thomsen M, Levade T, Benoist H, Se´gui B. (2005). Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *J Biol Chem*; **280**: 19836–42.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*; **75**(4): 653-660.
- Mori Ryutaro, Wang Qingcai, Kathleen D. Danenberg, Jacek K. Pinski, Danenberg Peter V. (2008). Both β -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *The Prostate*; **68**(14):1555–1560.



- Morishima, N., K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata, and Y. Yasuhiko. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J. Biol. Chem*; **277**:34287–34294.
- Morris D. R. and Geballe A. P. (2000) Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Mol. Cell. Biol*; **20**: 8635-8642.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. (1997) *Cell*; **88**:355-65.
- Naismith J. H. and Sprang S. R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*; **23**:74-79.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; **403**:98–103.
- Nakagawa, T., y J. Yuan.(2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150:887–894.
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*; **17**:1475-1486
- Norbury CJ, Zhivotovsky B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*; **23**:2797-808.
- O'Reilly LA, Ekert P, Harvey N, Marsden V, Cullen L, Vaux DL, Hacker G, Magnusson C, Pakusch M, Cecconi F, Kuida K, Strasser A, Huang DC, Kumar S. (2002). Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase-9. *Cell Death Differ*; **9**:832–41.
- Oberst A, Bender C, Green DR: Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ*; **15**:1139-1146.
- Oberst, A., C. Pop, et al. (2010). "Inducible Dimerization and Inducible Cleavage Reveal a Requirement for Both Processes in Caspase-8 Activation." *Journal of Biological Chemistry*; **285**(22): 16632-16642.
- Paschen W. and Mengesdorf T. (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*; **38**: 409-415.
- Peter ME, Krammer PH. (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*; **10**: 26–35.
- Pistritto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri ES (2002) Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ*; **9**(9): 995-1006.
- Pop, C., P. Fitzgerald, et al. (2007). "Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization." *Biochemistry*; **46**(14): 4398-407.
- Pop, Cristina and Salvesen, Guy S. (2009) Minireview. Human Caspases: Activation, Specificity and Regulation. *JBC*; **1**:1-10.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*; **4**:138–44.
- Rangel Rosalva, Rocha Leticia Ramírez, José Luis, Ibarar Ma. J., Solorza Gilberto, Monroy Alberto, Ramírez Miguel A, Herrera Angel, and Weiss-Steider Benny. (1995). Generation of memory CD4+, CD8+, CD45Ro+ and CD16+ lymphocytes activated with IL-2 IFNg and TNFa with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cell in mixed lymphocytes tuour culture. *Eur. Cytokine Netw*; **6**:195-202.
- Rangel-Corona, M.A. Hernández-Jiménez, T Corona-Ortega, M.A. Ibáñez-Hernández, I. Baeza-Rodríguez and B. Weiss-Steider. (2004) Interleukin-2 interaction with liposomes of different formulations (Neutral and Cationics) *Immunology*; 309-312.
- Rao L., Perez D. and White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol*; **135**:1441-1455

- Rao, R.V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L.M. Ellerby, H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem*; **276**:33869–33874.
- Rao, R.V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D.E. Renehan AG, Booth C, Potten CS. (2001) What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*; **322**:1536–8.
- Refaeli Y, Van Parijs L, London Ca, et al. (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*; **8**:615–623.
- Reed JC, Tomaselli KJ. (2000) Drug discovery opportunities from apoptosis research. *Curr Opin Biotechnol*; **11**:586-92.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA*; **98**: 14250-14255.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. (2001) What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*; **322**:1536–1538.
- Riedl Stefan J. y Shi Yigong (2004) Molecular Mechanisms Of Caspase Regulation During Apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; **5**:897-907.
- Riedl, S. J. and Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*; **5**:405-413.
- Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S., and Bode, W. (2001). Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **98**:14790–14795.
- Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*; **391**:96-99.
- Salmena L, Lemmers B, Hakem A, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Au PY, Berry DM, Tambllyn L, Shehabeldin A, Migon E. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev*; **17**: 883–895.
- Sánchez, I., C.-J. Xu, et al. (1999). "Caspase-8 Is Required for Cell Death Induced by Expanded Polyglutamine Repeats." *Neuron*; **22**(3): 623.
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*; **407**(6805): 784-788.
- Schmitz I., Kirchhoff S., and Krammer P. H. (2000) Regulation of death receptor mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**: 1123–1136,
- Shi Yigong. (2004) Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity Model. *Cell*; **117**: 855–858.
- Shi Yigong. (2005) Activation of Initiator Caspases: History, Hypotheses, and Perspectives. *Cancer Mol*; **1**(1): 9-18.
- Shi, Yigong. (2002) Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*; **9**:459–470.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*; **276**:7320–7326.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*; **97**:14376-81.
- Stennicke H. R., Jurgensmeier J. M., Shin H., Deveraux Q., Wolf B. B., Yang X., Zhou Q., Ellerby H. M., Ellerby L. M., Bredesen D., Green D. R., Reed J. C., Froelich C. J. and Salvesen G. S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem*; **273**, 27084-27090.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem*; **69**: 217-45.
- Suzuki, A., G. Kusakai, et al. (2003). "ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation." *Oncogene*; **22**(40): 6177-82.

- Szewczyk, A. and L. Wojtczak (2002). "Mitochondria as a pharmacological target." *Pharmacol Rev*; **54**(1): 101-27.
- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S (2006) Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol*; **176**: 4520–4524.
- Taylor RC, Brumatti G, Ito S, Hengartner MO, Derry WB, Martin SJ. (2007) Establishing a blueprint for CED-3-dependent killing through identification of multiple substrates for this protease. *J Biol Chem*; **282**:15011-15021
- Thierry, F. and C. Demeret (2008). Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. *Cell Death Differ* 15(9): 1356.
- Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 16: 139–144, 2004.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998) Caspases: enemies within. *Science*; **281**(5381): 1312-1316.
- Timmer, J. C., and Salvesen, G. S. (2007) Review Caspase substrates. *Cell Death Differ*; **14**(1), 66-72
- Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a Protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*; **304**: 843–846, 2004.
- Ting-Jun FAN1, Li-Hui HAN2, Ri-Shan CONG1, and Jin LIANG1 Caspase Family Proteases and Apoptosis *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005, 37(11): 719–727
- Tsujimoto Yoshihide y Shimizu Shigeomi (2000) Bcl-2 family: Life-or-death switch. *FEBS Letters*; **46**:6-10
- Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H. P. and Ron D. (2000) Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*; **287**:664-666.
- Valle Mendiola Arturo (2000). Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL en comparación con linfocitos normales Tesis de licenciatura. México, D.F. FES Zaragoza, UNAM.
- Vandekerckhove, J., Declercq, W., Gevaert, K., and Vandenaabeele, P. (2009) Proteome wide substrate analysis indicates substrate exclusion as a mechanism to generate caspase-7 versus caspase-3 specificity. *Mol Cell Proteomics*.
- Vander Heiden, M. G. and C. B. Thompson (1999). "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?" *Nat Cell Biol*; **1**(8): E209-16.
- Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted Disruption of the Mouse Caspase 8 Gene Ablates Cell Death Induction by the TNF Receptors, Fas/Apo1, and DR3 and Is Lethal Prenatally." *Immunity*; **9**(2): 267.
- Vincenz C. Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics. *Cardiol. Clin*; **19**: 31–43, 2001.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*; **10**:789-99.
- Wang Shuang, Xu-Zhu Zhang, Yin Ziqin, Liu Weihua, GarciaBertha, Xuyan Huang, Philip Acott and Jevnikar Anthony M. (2010). Anti-IL-2 receptor antibody decreases cytokine-induced apoptosis of human renal tubular epithelial cells (TEC). *Nephrol Dial Transplant*; 1-10.
- Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*; **15**: 2922-2933.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*; **292**:727-730.
- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*; **17**:617-625
- Annan, Wilson- J, O'Reilly LA, Crawford SA, Hausmann G, Beaumont JG, Parma LP, Chen L, Lackmann M, Lithgow T, Hinds MG, Day CL, Adams JM, Huang DC (2003) Proapoptotic BH3-

only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol*; **162**:877-887

- Won, So-Jung. Yo Sook KI, Kyung-Sook CHUNG, Jung-Hye CHOI, Ki Hwan BAE and Kyung-Tae LEE. (2010) 3,23-Isopropylidenedioxyolean-12-en-27-oic Acid, a Triterpene Isolated from *Aceriphyllum rossii*, Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer HeLa Cells through Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress. *Biol. Pharm. Bull*; **33**(9) 1620-1626.
- Wong, W. W. L., I. E. Gentle, et al. (2009). "RIPK1 is not essential for TNFR1- induced activation of NF- κ B." *Cell Death Differ*; **17**(3): 482.
- Ye J., Rawson R. B., Komuro R., Chen X., Dave U. P., Prywes R., Brown M. S. and Goldstein J. L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell*; **6**:1355-1364.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*; **75**(4): 641-652.
- Zhang Y, Padalecki SS, Chaudhuri AR, De Waal E, Goins BA, Grubbs B, Ikeno Y, Richardson A, Mundy GR, Herman B. (2007) Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mech Ageing Dev*; **128**:213–21.
- Zhaoyu Jin, Wafik S (2004) Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*; **4**:2, 139-163

