



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EXPRESIÓN DE MENSAJERO PARA COX1 y COX2, EN
LAS LÍNEAS CELULARES DE CANCER CERVICO
UTERINO CALO E INBL TRATADAS CON
INTERLEUCINA 2 (IL-2)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

AMARO GODINEZ ALFREDO ARISTIDE



DIRECTOR DE TESIS: Dra. Rosalva Rangel Corona

México D.F.

Diciembre de 2011



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

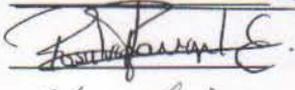
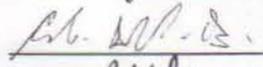
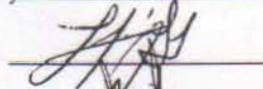
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **AMARO GODINEZ ALFREDO ARISTIDE**, con número de cuenta **302062966**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **06** del mes de **diciembre** de 2011 a las **18:00 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 | BIÓL. CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ |  |
| SUPLENTE | M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ |  |
| SUPLENTE | BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ |  |

El título de la tesis que presenta es: **Expresión de mensajero para COX1 y COX2, en las líneas celulares de cáncer cervico uterino CALO e INBL tratadas con Interleucina 2 (IL-2).**

Opción de titulación: tesis.

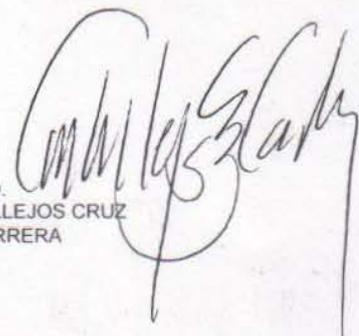
Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
 México, D. F., a 16 de noviembre de 2011.


Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR
 ZARAGOZA
 DIRECCION

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en la UIDCC en el Laboratorio de Oncología celular L-4 PB, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM".
Dirigido por la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Durante la realización del presente trabajo se conto con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, mediante el programa de becas para tesis de licenciatura, convenio: IN-220108 y PAPIME PE-208910

MÉXICO D.F. DICIEMBRE DEL 2011

Dedicatorias

A mis papás Elena y Alfredo por que sin su esfuerzo y apoyo este logro solo sería un sueño.

A Jazmín por estar conmigo en todo momento durante la realización de este proyecto, por tu ayuda, por tu paciencia y por todos los momentos que hemos vivido juntos pero sobre todo por tolerar mi persona.

Agradecimientos

A la M. en C. Rosalva Rangel Corona, directora de tesis, pero sobre todo profesora ejemplar que me oriento en todo momento para realizar este trabajo.

Al jurado: Dr. Benny Weiss Steider, Biol. Cristina Alvarado Domínguez, M. en C. Luis Sánchez Sánchez, y a la Biol. Reynalda Roldán Pérez, por sus atentas observaciones para mejorar el trabajo.

A José Chavarría por el apoyo técnico.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a la Biol. Itzel Del Rio por haber compartido conmigo parte de sus conocimientos, los cuales fueron necesarios para culminar este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEORICO	5
Cáncer	5
Cáncer cérvico uterino	7
Estadios o etapas del cáncer cérvico uterino	8
Factores de riesgo de cáncer cérvico uterino.....	10
Tratamiento.....	14
Muerte celular	16
Cadena de transporte de electrones	27
Enfermedades mitocondriales.....	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del cuello uterino	7
Figura 2. Estadio I del cáncer cérvico uterino	8
Figura 3. Estadio II del cáncer cérvico uterino	9
Figura 4. Estadio III del cáncer cérvico uterino	9
Figura 5. Estadio IV del cáncer cérvico uterino	10
Figura 6. Cortes histológicos.....	10
Figura 7. Virus del Papiloma Humano.....	12
Figura 8. Hipótesis de la remodelación del cuello de las crestas mitocondriales	25
Figura 9. Mensajero total de células CALO e INBL cultivadas en ausencia de IL-2	42
Figura 10. Mensajero total de células CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2	43
Figura 11. Producto de amplificación	44
Figura 12. Producto de amplificación para COX1 IL-2 (-) INBL.....	45
Figura 13. Producto de amplificación para COX1 IL-2 (+) INBL.....	45
Figura 14. Producto de amplificación para COX1 IL-2 (-) CALO.....	46
Figura 15. Producto de amplificación para COX1 IL-2 (+) CALO.....	46
Figura 16. Producto de amplificación para COX2 IL-2 (-) INBL.....	47
Figura 17. Producto de amplificación para COX2 IL-2 (+) INBL.....	47
Figura 18. Producto de amplificación para COX2 IL-2 (-) CALO.....	48
Figura 19. Producto de amplificación para COX2 IL-2 (+) CALO.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre tumores benignos y malignos.....	6
Tabla 2. Formas clínicas de cáncer y tejido afectado	7
Tabla 3. Mezcla de reactivos para la retrotranscripción	39
Tabla 4. Mezcla de reactivos para la amplificación de DNAC.....	39
Tabla 5. Cuantificación del RNAm	41

ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato.

AIF: Factor inductor de apoptosis.

ANT: Translocador de nucleótidos de Adenina.

APAF-1: Factor de activación 1 de las proteasas apoptóticas.

ATP: Adenosin trifosfato.

CaCu: Cáncer cérvico uterino.

CC: Calo control.

CT: Calo tratamiento.

COX1: Complejo mitocondrial 1.

COX2: Complejo mitocondrial 2.

COX3: Complejo mitocondrial 3.

COX4: Complejo mitocondrial 4.

DFF: Factor de fragmentación del DNA.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

FAD: Flavín adenín dinucleótido.

FP: Flavoproteína.

IAP: Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

IC: INBL control.

IL-2: Interleucina 2.

IT: INBL tratamiento.

LEEP: Escisión electroquirúrgica.

LEIAG: Lesión intraepitelial de alto grado.

LEIBG: Lesión intraepitelial de bajo grado.

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical.

Pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PPMT: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

RE: Retículo endoplasmático.

RIL-2: Receptor para interleucina 2.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNA_m: Ácido Ribonucleico mensajero.

RNA_{mt}: Ácido Ribonucleico mitocondrial.

RNA_r: Ácido Ribonucleico ribosomal.

ROS: Especies reactivas del Oxígeno.

RT: Retrotranscripción.

SFB: Suero fetal bovino:

TBE: Tris borato EDTA.

TOR: Objetivo de rapamicina.

UPR: Proteínas no plegadas.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

VPH: Virus de papiloma humano.

RESUMEN

El cáncer se distingue por el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión desarrollando metástasis. Existen diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer cérvico uterino que consiste en la transformación de las células que cubren las paredes del cuello uterino, situado en la parte inferior de la matriz que va del útero a la vagina; este tipo de cáncer, como muchos otros es curable si se detecta a tiempo. En los últimos años, se han administrado tratamientos con diferentes citocinas, cuyo objetivo principal, es aumentar la respuesta inmunológica del paciente, proporcionando una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad. Con base a lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la IL-2 sobre la expresión del RNA mensajero de los complejos mitocondriales COX1 y COX2 en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL.

El complejo 1 (COX1), la NADH ubiquinona oxidorreductasa también conocida como simplemente como NADH deshidrogenas, cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona, acoplado a la translocación vectorial de protones. El complejo 2 (COX2) ó succinato deshidrogenasa tiene una función dual, participa como una enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y como un complejo de la cadena respiratoria. La posición única del complejo 2 como miembro del ciclo del ácido cítrico y de la cadena respiratoria lo coloca como un regulador importante en el metabolismo.

En la mitocondria existe un proceso latente de transporte, conocido como permeabilidad transicional mitocondrial, cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial a iones que incluyen el calcio. Se ha propuesto que esta permeabilidad mitocondrial, podría ser una de las vías de conducción de moléculas pro-apoptóticas. Se sabe que el poro se abre cuando hay un exceso de calcio y fosfato, lo que despolariza la mitocondria y desacopla la cadena respiratoria de la cual son parte COX1 Y COX2. El poro de permeabilidad

transicional mitocondrial, favorece la cascada de caspasas y la muerte celular al liberar factores inductores de apoptosis como el citocromo c.

Para confirmar la participación de estos complejos en la regulación de muerte por apoptosis en las líneas de CaCu en este trabajo se extrajo el RNA mensajero de las líneas celulares CALO e INBL cultivadas a 0.3, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos en presencia de 100 UI/mL de IL-2, posteriormente se empleó la técnica de RT-PCR, para su retrotranscripción. Los resultados obtenidos muestran que al administrar IL-2 se presentó variación en la expresión de los complejos mitocondriales. En el caso de COX1, se observó un aumento en su expresión en la línea celular CALO, mientras que en la línea celular INBL, la síntesis de COX1 no se vio modificada. Sin embargo, el tratamiento de IL-2 indujo una baja expresión de RNAm para COX2 en la línea celular INBL en todos los tiempos excepto a los 5min de tratamiento, sugiriendo que ejerce una regulación positiva de sus expresión. En cuanto a la línea celular CALO, IL-2 aumenta la expresión de COX2 en todos los tiempos.

Estos resultados aportan información sobre la regulación de la síntesis de los complejos mitocondriales estudiados, y su posible papel en la modulación de la respuesta apoptótica, De esta manera, se contribuye en el diseño de nuevas alternativas terapéuticas para el cáncer cérvico uterino, en la que se proponga el uso de IL-2 como alternativa clínica para las pacientes con este tipo de cáncer, que en México representa un grave problema de salud pública.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte, se sabe que es un proceso progresivo y fatal, hay numerosos tipos diferentes de cánceres, pero todos comparten una característica común: el crecimiento celular descontrolado que progresa hacia la expansión en diferentes tejidos u órganos generando lo que se conoce como metástasis. Entre estos cánceres se encuentra el cáncer cérvico uterino (CaCu), que consisten en un cambio en morfología y fisiología de las células que cubren las paredes del cuello uterino que es la parte inferior de la matriz y que va del útero a la vagina, o el canal de parto. Estas células son inicialmente normales y gradualmente van adquiriendo una morfología alterada, displasia, hasta llegar a la transformación, en donde pierden la capacidad del control de crecimiento y se convierten en precancerosas, manifestándose como lesiones en la pared del útero. Este tipo de cáncer es curable si se detecta a tiempo.

Uno de los factores que pueden participar en este evento de transformación es la infección del virus del papiloma humano (VPH). Del tejido de tumores cancerígenos del cérvix se han obtenido las líneas celulares CALO e INBL, que han sido muy utilizadas en el Laboratorio de Oncología Celular. En los últimos años se han administrado como tratamiento para algunos tipos de cáncer diversas citocinas (Interferones e Interleucinas), su administración tienen como principal objetivo aumentar la respuesta inmunológica del paciente, así como inducir muerte en las células transformadas, para eliminar el crecimiento tumoral. De esta manera el uso de citocinas se convierte en una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad.

Se pretende que los tratamientos por citocinas puedan inducir la muerte por apoptosis de las células tumorales. El inducir este tipo de muerte es una excelente alternativa ya que durante su ejecución los cuerpos apoptóticos son fagocitados y eliminados limpiamente. En este proceso de muerte celular la mitocondria juega un papel muy importante en la amplificadora de la señal a través de la liberación de factores como AIF, las endonucleasas y el citocromo c. Siendo este último parte de la cadena de transportadores de electrones ubicada en la membrana interna de la mitocondria, los cuales han sido descritos como complejos mitocondriales de la cadena respiratoria (COX).

COX1 y COX2 son complejos mitocondriales que participan en la “poza de quinonas” concepto propuesto según el cual la ubiquinona reducida por las distintas deshidrogenasas de la cadena respiratoria (los complejos 1 y 2), forman una poza móvil de ubiquinol que es oxidada por el complejo 3. Esta pequeña molécula hidrofóbica está constituida por un anillo de quinona unida a una cadena de 10 unidades isoprenoides. Sus características hidrofóbicas le permiten difundir rápidamente en el interior de la bicapa lipídica, permitiéndole transferir los electrones desde las dos deshidrogenasas hasta el complejo 3.

Los complejos COX1 y COX2 se expresan durante la apoptosis debido a la despolarización de la mitocondria y desacople de la cadena respiratoria debido a la apertura del poro mitocondrial por el exceso de calcio y fosfato, para permitir la conducción de moléculas proapoptóticas.

Con base a lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo fue, evaluar la expresión de los complejos mitocondriales: COX1 y COX2 en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL tratadas con IL-2.

Para ello se empleó la técnica de RT-PCR, el análisis de los amplificadores para cada uno de los complejos mitocondriales nos permitieron determinar cómo la administración de IL-2 puede modificar la síntesis de COX1 y COX2 y comprobar si existen variaciones en los niveles de estos complejos mitocondriales inducidos durante la muerte celular, con esta información podremos saber si IL-2 está induciendo muerte celular por apoptosis ya que en ésta participan las proteínas de la cadena respiratoria, esta información nos permitirá proponer a IL-2 como una alternativa terapéutica para los pacientes con cáncer cérvico uterino.

MARCO TEORICO

CÁNCER

Una célula mantiene sus características morfológicas, químicas, bioquímicas y fisiológicas debido a la acción de múltiples vías de regulación sutiles y al mismo tiempo restringidas. Cuando los mecanismos de homeostasis se alteran, la célula puede modificar alguna de sus características.

Todas ellas están interrelacionadas de manera que la modificación en alguna de ellas repercute en las demás, en grados variables. Básicamente esto es el cáncer, la alteración de la homeostasis celular con cambios estables y permanentes que se transmiten en la progenie de las células alteradas.

Las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma, tamaño, apariencia presentando aberraciones en el número de cromosomas, cambios químicos y bioquímicos y se manifiestan de manera importante en su capacidad de controlar su crecimiento y división, además de la aparición de antígenos propios de las células cancerosas (Good R, 1990).

Las células cancerosas muestran, a menudo, alteraciones en los caminos de transducción de señales asociados a la proliferación en respuesta a estímulos externos. De hecho, muchos factores de crecimiento y sus receptores, así como sus intermediarios y efectores localizados en membrana, citoplasma o núcleo han sido identificados como oncogenes o como supresores tumorales.

Además de estos, otros genes mutados en cánceres incluyen aquellos relacionados con la inactivación de la apoptosis, la inducción de la inestabilidad genómica o la promoción de la angiogénesis. La mutación en estas moléculas

resulta en una alteración de los mecanismos regulatorios que controlan el ciclo celular (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

El crecimiento anormal de las células puede llegar a formar masas de tejidos llamados tumores. El Cáncer se desarrolla en etapas e intervienen diferentes factores para dar lugar a un tumor visible. Las principales diferencias entre los tumores benignos y malignos (Tabla 1).

Las células cancerosas pueden acumular múltiples mutaciones en genes cruciales, permitiendo su replicación autónoma e invasión. A pesar de todo esto, una mutación en un gen particular es un evento relativamente raro, e incluso después de un daño químico deliberado, la frecuencia de mutación en un gen particular es de 10^{-6} , lo que implica, que solo una célula en un millón está mutada.

Tabla 1
Diferencias entre tumores benignos y malignos

TUMORES BENIGNOS	TUMORES MALIGNOS
Son de crecimiento lento.	Algunos son de crecimiento lento, pero la mayoría de crecimiento rápido.
Solo crecen hasta determinado tamaño.	Crece de manera progresiva e invasiva, sin control.
No destruyen células normales.	Destruyen células, tejidos y órganos.
Crece de manera ordenada.	Crece de manera desordenada y descontrolada.
No invaden otros tejidos.	Las alteraciones trascienden a tejidos de otros órganos del cuerpo, metástasis.
Normalmente no producen efectos secundarios graves.	Si no se controla su crecimiento ocasionan la muerte.

La frecuencia de mutación en las células humanas es de aproximadamente 10^{-10} por cada división celular, a pesar de esta probabilidad tan baja, y debido al gran número de divisiones celulares, es muy probable que todos los adultos

presenten muchas células mutadas. Afortunadamente, un suceso como el cáncer requiere al menos de mutaciones en cinco genes (Valle A. y Weiss B. 2003).

Al ser muchos los factores que pueden inducir el desarrollo del cáncer, es posible que todos los tipos celulares puedan sufrir, en algún momento de la vida, la transformación neoplásica (Rojas E. 1996). Es por esto que existen alrededor de un centenar de formas clínicas de cáncer las cuales pueden agruparse según el tipo de tejido afectado (Tabla 2).

Tabla 2
Formas clínicas de cáncer y tejido afectado

TIPOS DE CANCER	TEJIDO QUE AFECTA
LEUCEMIAS	Tejido hematopoyético en medula ósea.
LINFOMAS	Ganglios linfáticos
SARCOMAS	Tejidos de sostén: tejido conectivo, músculos, vasos sanguíneos y linfáticos.
CARCINOMAS	Melanoma, epitelios mucosos, sistema nervioso, y viseras (hígado, páncreas, etc.).
ADENOMAS	Glándulas

CANCER CÉRVICO UTERINO

El cuello uterino o cérvix es la abertura del útero o matriz que a la vez se conecta con la vagina (Figura 1). El Cáncer Cérvico Uterino (CaCu) es una lesión o alteración celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de evolución lenta y progresiva, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa; evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable, cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Ministerio de salud; 2004).

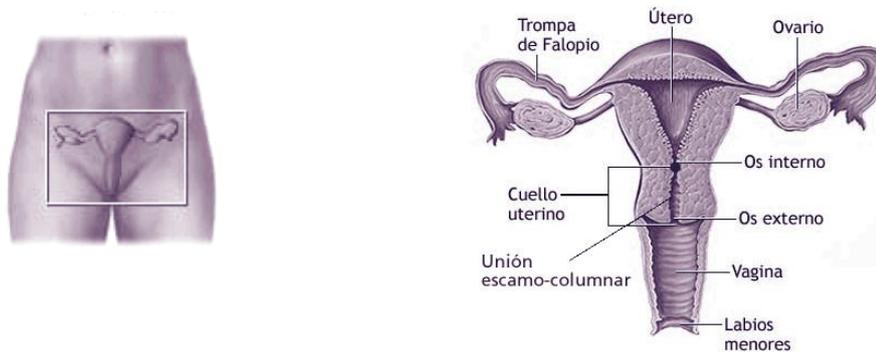


Figura 1. Ubicación del cuello uterino (Tomado de la página: www.insp.mx)

ESTADIOS O ETAPAS DEL CANCER CÉRVICO UTERINO

Las siguientes etapas se usan en la clasificación del cáncer cérvico uterino (Disaia; 2002):

Estadio 0 ó carcinoma *in situ*.

El carcinoma *in situ* es un cáncer en su etapa inicial. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.

Estadio I.

El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores. (Figura 2).

I-a: Una cantidad muy pequeña de cáncer, sólo visible por microscopio, se encuentra ya en el tejido más profundo del cuello uterino.

I-b: Una cantidad mayor de cáncer se encuentra en dicho tejido.



Figura 2. Estadio I del Cáncer Cérvico Uterino. (Tomado de la página: www.insp.mx).

Estadio II.

El cáncer se ha diseminado a áreas cercanas, pero aún se encuentra en el área pélvica. (Figura 3).

II-a: El cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina.

II-b: El cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.



Figura 3. Estadio II del Cáncer Cérvico Uterino, indicado en negro. (Tomado de la página: www.insp.mx)

Estadio III.

El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres (los tubos que conectan los riñones a la vejiga). (Figura 4).



Figura 4. Estadio III del Cáncer Cérvico Uterino, el avance se muestra con negro. (Tomado de la página: www.insp.mx)

Estadio IV.

El cáncer se ha diseminado a otros órganos del cuerpo. (Figura 5).

IV-a: Diseminación a la vejiga o al recto (órganos cerca del cuello uterino).

IV-b: Diseminación a órganos distales como por ejemplo los pulmones.



Figura 5. Estadio IV (Invasivo) avance del Cáncer Cérvico Uterino mostrado con negro. (Tomado de la página: www.insp.mx)

Displasia cervical: crecimiento anormal de células en la superficie del cuello uterino y, aunque no es un cáncer, se considera una afección precancerosa. Dependiendo de la magnitud de los cambios, la afección se clasifica más ampliamente como:

NIC I: displasia leve (pocas células son anormales)

NIC II: displasia moderada a acentuada

NIC III: displasia severa a carcinoma in situ (cáncer confinado a la capa superficial del cuello uterino) (Wright, 2002; Hoffman, 2004).



a

b

c

d

e

Figura 6. Cortes histológicos mostrando los cambios morfológicos celular y grado de displasia según tipo de NIC: a) tejido normal, b) NIC I, c) NIC II, d) NIC III, e) NIC invasor

FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO

Se ha demostrado que la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) es la causa necesaria, pero no la única del cáncer cérvico uterino (Walboomers, 1999).

Cofactores como la paridad, el uso de anticonceptivos hormonales, el tabaquismo, la inmunosupresión (particularmente la relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH), la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la desnutrición se han asociado, en grado variable, con el desarrollo de cáncer invasivo del cuello uterino (Isla, 2002).

La edad de comienzo de las relaciones sexuales, el número de compañeros sexuales que se han tenido, los antecedentes de infecciones de transmisión sexual y otras características de la actividad sexual se vinculan con la probabilidad de contraer el VPH (Rodríguez, 1999).

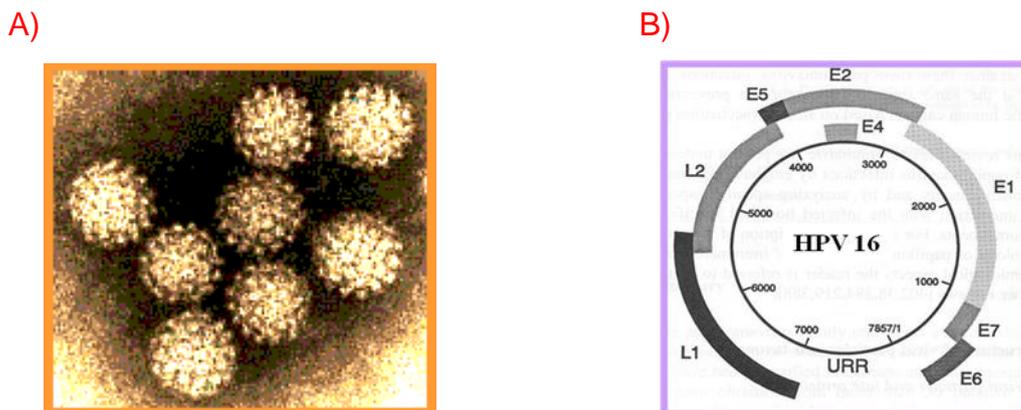
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma (VPH) está ampliamente distribuido en la naturaleza, infecta una amplia gama de animales vertebrados superiores entre ellos al hombre. Los virus son altamente específicos de especie y de células. Infectan epitelio húmedo (mucosas) y seco (piel). Causan lesiones proliferativas (verrugas) en el epitelio escamoso, algunos pueden transformar células. Actualmente se han descrito más de 70 tipos de virus y por tecnología de DNA recombinante se han identificado 77 y algunos de ellos están asociados con tumores.

La clasificación en tipos se basa en la especie de origen y en el grado de homología de las secuencias de nucleótidos en regiones específicas del genoma (marcos de lectura de los genes L1, E6 y E7), los tipos se subdividen en subtipos. Clínicamente se clasifican de acuerdo al epitelio que infectan: de mucosas o cutáneo. Por otro lado, de acuerdo a la frecuencia de progresión de

las lesiones a carcinoma maligno, los virus se han clasificado en: de bajo riesgo (6, 11,13, 21 y 63) y de alto riesgo (tipos 16, 18) (Zur, 1996; Gariglio, 1995).

Son virus pequeños de 52 a 55 nm, simetría icosaédrica, con una cápside de 72 capsómeros, no tienen envoltura. La cápside está formada de dos proteínas estructurales L1 Y L2. Su genoma está formado por una molécula de DNA de cadena doble, es circular de aproximadamente 8000 pb. Los genes se localizan en una de las dos cadenas. El genoma se puede dividir en tres regiones: región temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los dos últimos se consideran oncogenes, ya que se relacionan con la aparición de tumores malignos en cérvix (E6 facilita la degradación de la proteína supresora de tumores P53, y E7 secuestra a la proteína Rb también supresora de tumores; región tardía (L1 y L2) y una región larga de control (Figura 7).



La capacidad que tienen algunos VP de producir lesiones malignas se relaciona con el tipo de virus. Algunos de los que infectan la piel anogenital y mucosas causan condilomas y neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de diferente gravedad. En el hombre los virus de papiloma humano (VPH) inducen displasia, lesiones intraepiteliales escamosas de piel y mucosas, el daño puede progresar a cáncer, en forma particular cáncer cérvico uterino (CaCu). En las lesiones precancerosas, el DNA se encuentra episomal (plásmido) y en células cancerosas se encuentra integrado al genoma celular y se expresan los genes

E6 y E7. De la expresión de estos genes depende mucho la capacidad de los virus para causar cáncer, ya que las oncoproteínas de los VPH de alto riesgo interactúan y alteran las funciones fisiológicas de proteínas celulares involucradas en el control celular, lo cual puede conducir a inestabilidad genética de las células infectadas.

Existen alrededor de 40 tipos de VPH que pueden infectar el área genital de mujeres y hombres. Pero dos de los tipos de alto riesgo (16 y 18) son los responsables de la mayoría de los cánceres relacionados con el VPH en el mundo (Muñoz, 2003). Se ha observado también que la mayoría de las líneas celulares derivadas de cáncer cérvico uterino contienen DNA de alto riesgo y expresan los genes E6 y E7 del VPH (Chen, 1993). Se ha propuesto que la integración del genoma celular es un mecanismo de activación de la progresión de las lesiones preinvasivas en cáncer cervical (Zur, 1996; Chen, 1993).

Las mujeres infectadas por el VIH contraen más fácilmente los tipos del VPH de alto riesgo y tienen mayor probabilidad de presentar lesiones precancerosas y de aparición más rápida, que las mujeres seronegativas para VIH (Clarke, 2002).

Las lesiones asociadas a VPH se pueden dividir en dos categorías: Lesión Escamosa Intraepitelial de Bajo Grado (LEIBG) y Lesión Escamosa Intraepitelial de Alto Grado (LEIAG). Esta división es para indicar que las LEIBG corresponden básicamente a infecciones víricas, en general auto limitadas y que solo excepcionalmente progresan a carcinoma. Mientras que las LEIAG son lesiones cancerosas causadas principalmente por los VPH de alto riesgo.

PARIDAD ELEVADA

Estudios sobre el carcinoma *in situ*, efectuados en cuatro continentes, sugieren que las mujeres con tres o cuatro embarazos de término tenían un riesgo 2,6 veces más alto de aparición de cáncer cérvico uterino que aquellas que nunca habían dado a luz; las mujeres con siete partos o más, presentaron un riesgo 3,8 veces mayor (Muñoz, 2002). El motivo fisiológico de esta asociación está

poco claro; las posibilidades incluyen factores hormonales vinculados al embarazo o traumatismo cervical asociado con el parto.

ANTICONCEPTIVOS HORMONALES

Las investigaciones indican que hay una relación potencial a largo plazo entre el uso prolongado de anticonceptivos hormonales y la aparición de CaCu. Un análisis de los datos compartidos de diez estudios de casos y testigos, de pacientes con CaCu, sugiere que el uso a largo plazo de los anticonceptivos hormonales podría aumentar hasta cuatro veces el riesgo de este cáncer en las mujeres infectadas con el VPH (World, 2002; Moreno, 2002).

TABAQUISMO

El tabaquismo parece estar firmemente asociado con la aparición de lesiones cervicales precancerosas y cáncer. El tabaquismo se encuentra entre los factores ambientales más uniformemente identificados con la probabilidad de influir en el riesgo de padecer CaCu; los estudios revelan que el riesgo para las fumadoras actuales al menos duplica el de las no fumadoras (Szarewski, 1998; Castellsagué, 2002).

ACCESO LIMITADO A LOS SERVICIOS DE SALUD

Se considera que una baja condición socioeconómica es un factor de riesgo de numerosos problemas de salud, incluido el CaCu; en particular, en entornos de bajos recursos. Las mujeres con una baja condición socioeconómica a menudo tienen bajos ingresos, limitaciones para acceder a los servicios de atención de salud, nutrición deficiente y escasa concientización acerca de los temas de salud y de una conducta preventiva. Todos estos factores pueden hacerlas más proclives a enfermarse o a padecer enfermedades que pueden prevenirse, como el CaCu (Dos Santos, 1997; Isla, 2002).

TRATAMIENTO

Existen tratamientos para todas las pacientes con CaCu y básicamente se emplean tres clases de ellos (Franklin, 1952):

Cirugía: Eliminación del tejido cancerígeno en una intervención quirúrgica, para eliminar la masa tumoral.

Radioterapia: Se utiliza partículas de alta energía capaces de penetrar al cuerpo. A través de una máquina, llamada acelerador lineal, se genera y dirigen esas partículas hacia el lugar concreto donde se tengan que aplicar. Las demás zonas del cuerpo se protegen para no recibir la radiación. La radioterapia utiliza partículas similares a los rayos X, que se utilizan para hacer una radiografía normal, lo que ocurre es que en éstas últimas, la cantidad suministrada es muy pequeña. Las células cancerosas son especialmente sensibles a la radiación. La radioterapia puede utilizarse como tratamiento único en aquellos casos en que los tumores sean especialmente sensibles a la radiación y no haya señales de que se haya extendido hacia ningún otro lugar.

Quimioterapia: La quimioterapia consiste en la administración de fármacos antineoplásicos que provocan la destrucción de las células tumorales, al obstaculizar sus funciones, incluida la división celular, se emplea ante todo para el tratamiento de neoplasias generalizadas, aunque a veces se utiliza para lesiones localizadas como coadyuvante de otros tratamientos.

Entre las técnicas que se utilizan para eliminar el tejido canceroso se encuentran las siguientes intervenciones (Brunschwig, 1948; Lazcano-Ponce, 1996):

- Criocirugía. En este método, se recurre a la aplicación de congelamiento para la eliminación del tejido dañado.

- Cirugía con rayo láser. Consiste en el uso de un haz de luz intensa para eliminar las células cancerosas.

- Conización. Se define como una escisión de un cono o cilindro tallado del cérvix, incluye la zona de transición, que según sea la lesión es todo o solo una porción del canal endocervical. Se emplea para obtener una biopsia para realizar el diagnóstico, pero también para el tratamiento de cánceres tempranos del cuello uterino.

-
- La escisión electroquirúrgica (LEEP) por sus siglas en inglés, se usa una corriente eléctrica que pasa por un aro de alambre delgado, el cual sirve como cuchilla.
 - La histerectomía es una cirugía, utilizada en casos muy avanzados, por la cual se extrae todo el útero, incluyendo todo el cuello uterino, además del cáncer. Son diferentes las técnicas utilizadas para este propósito:

A) *Histerectomía vaginal*: El útero se extrae a través de la vagina.

B) *Histerectomía abdominal*: El útero se extrae mediante una incisión en el abdomen. Puede ser necesario también extraer los ovarios y las trompas de Falopio.

C) *Histerectomía radical*: Es una operación en la cual se extrae el cuello uterino, el útero y parte de la vagina. También se extraen los ganglios linfáticos del área.

MUERTE CELULAR

La nomenclatura utilizada en relación a la muerte celular ha sido confusa. Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue hecho por Schweichel y Merker (Vaux, 1999), quienes identificaron 3 tipos de muerte celular (Tipo 1, 2 y 3).

Tipo 1 se manifiesta por condensación nuclear y picnosis, con reducción del volumen citoplasmático, con fragmentación celular tardía y fagocitosis.

Tipo 2, o degeneración autofágica, se caracteriza por la vacuolización autofágica del citoplasma.

Tipo 3 o muerte citoplasmática, se caracteriza por una desintegración general con pérdida de los organelos.

De esta manera, la tipo 1 correspondería a la apariencia descrita por Kerr para la apoptosis, la tipo 2 a Autofagia y la 3 muestra características asociadas a la necrosis. (Bradham, 1998; Qian 1999).

AUTOFAGIA

Es un proceso altamente conservado en la evolución, que ocurre virtualmente en todas las células eucariotas, desde las levaduras a los mamíferos, como parte de su desarrollo normal (Klionsky, 2005). Es un proceso en el cual citoplasma y organelos son secuestrados en vesículas con membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de lisosomas, para su degradación y reciclaje de macromoléculas. Así como el recambio proteico, está mediada por ubiquitinación y degradación por el proteosoma. El recambio de grandes proteínas y organelos, es atribuido parcialmente a la Autofagia (Shintani, 2004).

La autofagia sirve como respuesta al estrés producido por la falta de alimentos y es uno de sus principales mecanismos de control en los organismos unicelulares. A nivel de membrana, existen moléculas que actúan como sensores del medio extracelular, activando vías regulatorias intracelulares. Uno de estos sensores es la proteína TOR (Target de rapamicina) (Kamada, 2004), el cual inhibe la autofagia en un medio rico en nutrientes. La autofagia también tiene funciones homeostáticas y de biosíntesis, Por ejemplo en condiciones en las cuales los peroxisomas no son necesitados, son degradados a través de un tipo específico de autofagia denominado pexofagia (Iwata, 2006).

Además puede actuar como un mecanismo de defensa contra la invasión de varias bacterias y virus, lo que algunos de ellos aprovechan para evadir la destrucción y replicarse en la célula hospedera. Recientemente se le ha asociado a varias enfermedades humanas, incluido el cáncer (Hait, 2006).

NECROSIS

Se considera como necrosis el tipo de muerte sin signos de apoptosis o autofagia. Su morfología es a menudo la de la Oncosis la cual constituye un proceso de reabsorción ósea caracterizado por una desmineralización asociada a una alteración de la célula ósea. Término del griego Onkos “hinchado” fue

introducido por von Recklinghausen en 1910, al observar la tumefacción de los osteocitos en la osteomalacia (Degterev, 2005).

La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la rápida pérdida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos. Entre ellos hay sinergia, ya que la alteración de uno produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cual ocurre primero (Nishimura, 2001).

Falla energética como causa de necrosis: La disminución de la función de las bombas de ATP dependientes puede llevar a la apertura de los canales de muerte en la membrana citoplasmática. La apertura de estos canales resulta en una gran fuerza coloidal osmótica y entrada de cationes que llevan al hinchamiento celular y posterior ruptura de la membrana. El estrés resultante de la escasez de alimento o de un aporte de O₂ insuficiente, a menudo resulta en disminución del ATP. Este tipo de necrosis es vista por ejemplo en la región interna de tumores, donde el suministro de oxígeno y nutrientes es limitado (Lum, 2005).

Calcio como mediador de la muerte por necrosis: El calcio intracelular es importante en numerosas respuestas celulares. En ciertas condiciones patológicas, ligandos extracelulares pueden inducir necrosis dependiente de Ca. La mayor parte del calcio se almacena en el Retículo Endoplásmico (RE), cuando el calcio del RE es liberado al citosol, o el calcio extracelular atraviesa la membrana plasmática, la muerte celular puede iniciarse por activación de proteasas dependiente de calcio o sobrecarga de calcio mitocondrial (Berridge, 2002; Yermolaieva, 2004).

La entrada inicial de calcio impulsa proteasas activadas por calcio, como las calpaínas, que clivan el intercambiador Na/Ca, lo que lleva a la incapacidad de la célula para extraer el calcio, provocando un aumento sostenido de la concentración intracelular (Bano, 2005). Esto lleva a una auto amplificación del

calcio citosólico y su prolongada estadía en el citoplasma lleva a la sobrecarga mitocondrial de calcio, lo que provoca la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), perdiendo la capacidad de producir ATP por la cadena respiratoria, además de la activación de las proteasas dependientes de calcio (McConkey, 1997).

Otras consecuencias en el aumento de la concentración de calcio, es que puede iniciar, ya sea la apoptosis o la necrosis. El destino de la muerte celular es probablemente determinado por la concentración de Calcio citoplasmático. Concentraciones bajas a moderadas (200-400 nM) inducen apoptosis, mientras que altas concentraciones (mayores de 1mM) se asocian con necrosis. Esto puede explicar porque la liberación del calcio del RE es principalmente apoptótico, mientras que la entrada a través de la membrana plasmática se asocia principalmente a la necrosis (Ankarcrona, 1998).

APOPTOSIS

La apoptosis es un término descriptivo que define un tipo de muerte celular con diversas características morfológicas (Vaux, 1999; Kroemer, 1995). Es el término más usado actualmente como referente de muerte celular programada. Apoptosis proviene del griego y significa la caída otoñal de hojas y pétalos. Se ha utilizado el término con diferentes connotaciones:

- (a) Contracción atípica del volumen celular.
- (b) Cambios morfológicos nucleares, acompañados por la contracción exagerada del volumen celular.
- (c) Condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del DNA.
- (d) Alteraciones de las membranas celulares con aumento de la permeabilidad y ampollado (blebbing).
- (e) Aumento de la capacidad para ligar anexina.
- (f) Activación de proteasas catabólicas (caspasas).
- (g) Escisión de la queratina (Thompson, 1995; Buja, 1993).

La apoptosis es de fundamental importancia para explicar procesos biológicos como por ejemplo la formación y maduración de embriones, la senilidad, la formación de queratocitos, la renovación del epitelio de las membranas

mucosas etcétera, en otras palabras la apoptosis es un término funcional, que se usa para definir la muerte celular como parte normal de la vida de los organismos multicelulares (Vaux, 1999; Kroemer 1995).

También, puede ser un proceso para eliminar células infectadas o dañadas genéticamente, con efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos. Los términos apoptosis y muerte celular programada han originado controversias y en general, se acepta su sinonimia cuando la muerte celular depende de la intervención de caspasas (Vaux, 1999).

Es importante señalar que mientras muchas formas de apoptosis representan muerte celular programada, no se puede decir que todas las muertes celulares programadas están comprendidas dentro de la apoptosis. Por ejemplo, una muerte celular con todos los signos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis puede ser inducida por drogas citotóxicas y estímulos físicos. Estos casos de apoptosis no son programados, ya que representan las respuestas celulares a cambios en su entorno aunque la expresión estructural del proceso responde a las características de la apoptosis (Vaux, 1999).

Las células apoptóticas no provocan reacciones inflamatorias de las células vecinas, y son eliminadas sin provocar daño tisular inmediato, dos características fundamentales para interpretar la importancia fisiológica de la apoptosis (Palomba, 1996).

Hay una estrecha relación entre la apoptosis y el ciclo celular. En concreto, la apoptosis puede iniciarse en el tercio final de la fase G1 para evitar que una célula dañada pase a la fase de síntesis, y en la fase G2 para evitar que algunas células aun inmaduras entren en mitosis, de hecho en esta fase G2 existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis (Alberts, 1994). El resultado final es que durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse, lo que en la práctica supone un equilibrio entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido (Nelson, 2005).

Pueden diferenciarse varias fases en la apoptosis (Dobrzansk, 2001; Del Rio, 2007; Ross 2005):

Efectora, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Calcio intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular produciendo cambios en el tamaño y forma celular.

Degradativa, se degradan los ácidos nucleicos y hay más cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase se activan las endonucleasas que se encargan de fragmentar el DNA; además se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

Limpieza, los macrófagos eliminan todas las células apoptóticas, sin que eso afecte al tejido circundante, atraídos por ligandos específicos para ellos, presentes en la superficie de las células apoptóticas

VIAS DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal pro apoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL (CD95L) es un trímero que al unirse con Fas (CD95 o APO-1) induce la trimerización de este. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la pro-caspasa 8 favoreciendo su auto activación, la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, además puede activar a Bid y esta inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Kroemer, 1995; Martin, 1994).

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria. Lo anterior provoca la liberación de

citocromo-c al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol el citocromo-c se une a Apaf-1 en presencia de ATP y forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual activa a la pro-caspasa 9, que a su vez puede activar a las caspasas 3, 6 y 7, estas son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en la célula apoptótica ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del DNA entre otras (Vaux, 1999; Orrenius, 1995).

ORGANELOS INVOLUCRADOS EN LA MUERTE CELULAR APOPTÓTICA

LISOSOMAS

La liberación de las proteínas lisosomales se produce por permeabilización de la membrana lisosomal, que puede ser causada por ROS o por acumulación de esfingosina, detergente lisosomotrópico (Bursch, 2001). Una permeabilidad parcial se produce en la apoptosis, mientras que un quiebre masivo provoca necrosis. Las cistein proteasas catepsinas B y L y la proteasa catepsina D son las proteasas lisosomales mas abundantes y se ha reportado que pueden actuar activando caspasas o una vía independiente de éstas. Otros han reportando que su acción sería más indirecta, promoviendo la disfunción mitocondrial y liberación de las proteínas proapoptóticas (Johansson, 2003). Además la Catepsina D puede activar a Bax, llevando a la liberación de AIF de la mitocondria (Bidere, 2003; Kagedal, 2005).

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Es un importante sensor de estrés celular que puede detener la síntesis proteica y el metabolismo para restablecer la homeostasis celular (Travers, 2000). Incluso puede desencadenar apoptosis si el daño es muy intenso, iniciándose como respuesta a proteínas no plegadas o vía liberación de calcio en el citoplasma. La acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico desencadenará la respuesta adaptativa al estrés denominada respuesta a proteínas no plegadas (UPR unfolded protein response), la cual es mediada por una proteína quinasa transmembrana y endoribonucleasa, la

proteína del RE IRE1a. La activación de (IRE1a) requiere de Bax y Bak (Hetz, 2006).

Este hecho permite conectar físicamente a los miembros de la vía apoptótica y de la UPR. También, es posible la activación de la caspasa 12 posiblemente por vía de la translocación de Bim, un miembro de la familia BCL-2, al interior del retículo endoplásmico (Boya, 2002). Además, el estrés del retículo endoplásmico puede inducir permeabilización de la mitocondria y entonces activar la vía clásica, así como otras vías de muerte mitocondrial. Los miembros de la familia BCL-2 y el calcio citoplasmático orquestan esta respuesta cruzada entre la mitocondria y el RE (Annis 2004).

Además, el influjo intracelular de calcio causado por el estrés sobre el retículo endoplásmico, activa un organelo que actúa como un depósito de calcio en la célula, que induce la activación de una familia de proteínas citosólicas, las calpaínas, las cuales se encuentran inactivas en el citoplasma (Yamashima, 2004). Las calpaínas actúan río abajo en la activación de caspasas y son inhibidas por calpastatina, la cual a su vez es inactivada al ser procesada por calpaína o caspasas activas. Bax y otros de su tipo aun no bien identificados, están involucrados en la asociación entre calpaínas y el sistema proteolítico de las caspasas. La manera en que se relacionan aun se desconoce (Liu, 2004).

MITOCONDRIA

La mitocondria juega un papel muy importante dentro del proceso de apoptosis. Su función amplificadora de la señal empezada por las caspasas iniciadoras, asegura la culminación del proceso incluso ante la existencia de un reducido número de moléculas de proenzimas actuando como unidades iniciadoras. Así mismo, aporta a la ruta ejecutora de la apoptosis un sitio de regulación mediante las proteínas de la familia Bcl-2 (Scheffner, 1991).

La mitocondria mantiene la vida celular a través de la producción de ATP y desencadena la muerte al liberar proteínas del espacio intermembrana, como citocromo-c, Smac/Diablo (Smac: second mitochondrial activator of caspases:

DIABLO: direct IAP binding protein with low pI) u Omi (Htr2), al citosol. Las dos últimas compiten con las caspasas, para unirse a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), ya que ellas unen caspasas y las marca para su posterior ubiquitinación. El citocromo-c participa en la formación del apoptosoma, que junto a la molécula adaptadora Apaf-1, resultan en el reclutamiento y activación de la caspasa 9, requiriendo para esto ADP o ATP. Posteriormente la caspasa 9 activa las procaspasas 3 y 7, siendo estas caspasas efectoras las responsables del clivaje de varias proteínas que llevan a la morfología y bioquímica de la apoptosis (Honda, 2005).

La membrana interna mitocondrial presenta múltiples complejos enzimáticos, cadena transportadora de electrones, la ATP sintetasa y proteínas transportadoras, como el traslocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés adenine nucleotide translocator). Además posee unas invaginaciones denominadas crestas, donde se encuentra secuestrado y unido al fosfolípido de membrana cardiolipina y el 85% del citocromo-c, el cual es utilizado por el complejo IV en la producción de energía. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales, y en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y de metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Da, a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, del inglés voltaje dependent anion channel). El poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) es un complejo multiproteico, aun no totalmente dilucidado tanto en estructura como función, que se forma en las zonas de unión entre las membranas interna y externa de la mitocondria. En él participan proteínas de localización citoplasmática (hexocinasa), de la membrana externa (VDAC), de la membrana interna (ANT) y de la matriz mitocondrial (ciclofilina D) (Nakagawa, 2005; Baines, 2005).

El mecanismo propuesto consiste en que cierto estímulo, sobrecarga de calcio o daño por radicales libres y produce una remodelación del cuello de la cresta mitocondrial (figura 8), que incrementa su tamaño de aproximadamente 20 nm a 60 nm, con lo que el citocromo-c, que previamente se ha dissociado de la cardiolipina mediante oxidación por ROS, puede acceder a la membrana externa, atravesándola por medio de la formación de megacanales constituidos

por combinación de Bid, Bax y cardiolipina o por ruptura de la membrana externa si el volumen de la matriz se expande excesivamente (por apertura del PPTM o cierre de VDAC) (Brdiczka, 2006 ; Gogvadze, 2006).

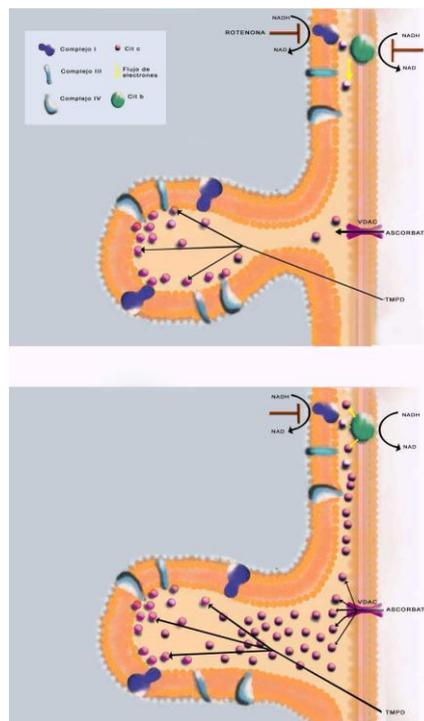


Figura 8. Hipótesis de la remodelación del cuello de las crestas mitocondriales. (De Toro 2006).

CASPASAS EN LA APOPTOSIS

Las caspasas son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína), caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas en la vecindad de residuos aspárticos (Zhivotovsky, 1997; Fadeel, 1998). Su especificidad catalítica ha originado el término caspasa en el que la c representa al residuo cisteína de la enzima y caspasa representa residuos aspárticos de la proteína sustrato (Cohen, 1997; Thornberry, 1998). Por su estructura y actividad proteolítica específica, se conocen por lo menos 10 caspasas que se ordenan por los números correspondientes, caspasa 1,

caspasa 2, caspasa 3, etc. Las caspasas actúan en las mitocondrias, en el citosol y en el núcleo celular e incluyen los siguientes grupos (Cohen, 1997; Thornberry, 1998):

- (a) Mediadoras de la inflamación (caspasa 1, 4 y 5).
- (b) Efectoras de la apoptosis (caspasa 3, 7 y 2).
- (c) Activadoras de caspasas apoptogénicas (caspasas 6, 8, 9 y 10).

Todas las caspasas tienen en su sitio activo una secuencia pentapeptídica (Glu-Ala-Cys-X-Gly; X puede ser Arg, Glu o Gly). En la célula se sintetizan como pro-enzimas inactivas (procaspasas) que se pueden activar por autocatálisis. La actividad proteolítica depende del estado redox y del balance pro-oxidante/antioxidante en la célula (Hampton, 1998; Martinou, 1999). Algunas caspasas son reguladas por el receptor FAS, por el citocromo c y por el factor inductor de la apoptosis (AIF) que pasan de las mitocondrias al citosol como consecuencia del daño mitocondrial inducido por la apoptosis (Kroemer, 1999; Susin, 1999).

La actividad proteolítica de las caspasas está limitada por la naturaleza de las proteínas sustrato. Así el sustrato, PARP (poli-(ADP-ribosa) polimerasa), es hidrolizado por la caspasa 3 en dos fragmentos, uno de los cuales contiene el extremo N-terminal y liga el DNA, mientras que el otro fragmento contiene el extremo C-terminal que ejerce la actividad catalítica. Otra proteína sustrato blanco de las caspasas es la proteína quinasa DNA-dependiente, una enzima que interviene en la reparación de la doble-hélice del DNA. Durante la apoptosis la proteína-quinasa es degradada por la caspasa 5 pero no por las caspasas 1, 4 y 6. Su degradación produce una disminución significativa de la aptitud celular para reparar DNA lo que suprime una función homeostática esencial y facilita la degradación de la cromatina del núcleo (Cohen, 1997; Thornberry, 1998; Samali, 1999).

Otro sustrato es la laminina, una proteína importante de la membrana del núcleo. La caspasa 6 parece ser la responsable de su degradación cuya cinética es más lenta que la de las otras proteínas hidrolizadas por caspasas.

Los oncogenes activan a las caspasas. Así, extractos de células transformadas por el oncogén adenovirus EA, (extractos transformados) activan la apoptosis, efecto que no se observa con los extractos testigos o no transformados. La actividad oncogén-dependiente de los extractos transformados, se debe a la acción del factor APAF-1, activo sobre la caspasa 9, lo que indica que esa caspasa es la iniciadora de la actividad apoptótica (Fearnhead, 1998). La caspasa 3 activa selectivamente al receptor a FAS, la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. La activación de la caspasa 3 por el calcio activa la apoptosis nuclear y correlaciona los movimientos del calcio con el impulso pleno de la apoptosis (Juin, 1998; Deaciuc, 1999).

Las mitocondrias pueden liberar por lo menos dos factores fundamentales en la apoptosis: el primero es AIF que es capaz de activar a la caspasa 3, y a las endonucleasas y el segundo es el citocromo c, que con ADP, el factor Apaf-3 y la caspasa 9, constituye el apoptosoma (Sun, 1999).

Como resultado de esa conjunción de factores, se activa la caspasa 3 que cliva y activa el factor de fragmentación del DNA (DFF), un activador de endonucleasas que actúan sobre el DNA nuclear. Por su parte, el citocromo-c activa las caspasas en su forma holo, con el grupo hemo unido, aunque parece ser que esa estructura y su función como aceptor de electrones son esenciales para la actividad sobre las caspasas. La activación primaria de las caspasas no es suficiente para disparar la cascada apoptótica y es requerida la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales liberados por las caspasas, para así llevar a cabo el proceso apoptótico.

Las caspasas actúan como ejecutantes principales de la apoptosis inducida por drogas, mientras que en la apoptosis iniciada por los receptores apoptogénicos activados, las caspasas forman, además, una parte integral del mecanismo que conduce a la muerte celular (Sun, 1999).

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES

La cadena de transporte de electrones o fosforilación oxidativa es un proceso que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial y está constituido por una serie de complejos enzima-coenzima de oxidorreductasas y ferroproteínas, además también está compuesta por una serie de complejos, ubicados en la membrana interna de la mitocondria.

Las fuentes de energía como la glucosa son inicialmente metabolizados en el citoplasma y los productos resultantes son llevados al interior de la mitocondria donde se continua el catabolismo usando rutas metabólicas que incluyen el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la beta oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos. El resultado final de estas rutas es la producción de dos donadores de electrones: NADH y FADH₂. El NADH almacena dos electrones en el primer complejo de la cadena. Los electrones vienen desde las reacciones de oxidación en etapas tempranas de la respiración celular. El FADH₂ también, aporta electrones a la cadena de transporte de electrones, pero en una etapa ligeramente más tardía que el NADH (Nicholls, 2002).

Al término de la cadena del transporte de electrones estos son cedidos al oxígeno. Al mismo tiempo, el oxígeno acepta iones hidrógeno, para formar agua. Esto sucede en la matriz, en la superficie de la membrana interna. Este evento corresponde a la etapa en la cual el oxígeno es usado en la respiración celular. Si a lo largo de la cadena de transporte de electrones no hay oxígeno disponible, el flujo de electrones se detiene y el NADH + H⁺ no pueden ser convertidos en NAD⁺. Los suministros de NAD⁺ en la mitocondria se liberan y la reacción de síntesis y el ciclo de Krebs no pueden continuar. La glucólisis puede continuar porque la conversión de piruvato en lactato o etanol y dióxido de carbono produce tanto NAD⁺ como el usado en la glucólisis. Sin embargo, mientras la respiración celular aeróbica da una cantidad aproximada a las 30 moléculas de ATP por glucosa, la glucólisis produce sólo dos. De esta manera el oxígeno incrementa enormemente el suministro de ATP. Éste es un proceso de múltiples pasos que ocurren en la membrana mitocondrial interna. Las

enzimas que catalizan estas reacciones tienen la remarcable capacidad de crear simultáneamente un gradiente de protones a través de la membrana, produciendo un estado altamente energético con el potencial de generar trabajo (Voet 2004).

Se han identificado cuatro complejos enzimáticos unidos a membrana interna mitocondrial. Tres de ellos son complejos transmembrana, que están embebidos en la membrana interna, mientras que el otro está asociado a membrana. Los tres complejos transmembrana tienen la capacidad de actuar como bombas de protones (Raha, 2000).

Complejo 1 (COX1)

El complejo 1 ó NADH deshidrogenasa, ó NADH ubiquinona oxidorreductasa es un gran complejo multienzimático que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q denominada ubiquinona en la cadena respiratoria. Es el mayor complejo de la cadena respiratoria, en los mamíferos consta de 45 cadenas polipeptídicas, de las cuales, siete están codificadas por el genoma mitocondrial. Su estructura tienen forma de "L" y posee un gran dominio en la membrana (con alrededor de 60 hélices transmembrana) y un dominio periférico hidrófilo donde se produce la reducción del NADH (Carroll, 2003).

El complejo 1 constituye el punto de entrada a la cadena de transporte electrónico en las bacterias y en la membrana interna de las mitocondrias de las células eucariota. La transferencia electrónica se inicia mediante la oxidación del NADH ya que sus dos electrones son transferidos simultáneamente a un flavin mononucleotido unido no covalentemente a la enzima, y desde allí, a través de una serie de centros Fe-S, transportadores de electrones capaces de aceptar un electrón por ciclo, al aceptor final, la coenzima Q, ó a aceptores artificiales como ferrocianuro (Dupuis, 2001).

Más de cien genes están involucrados en la biosíntesis del complejo 1, participan en: transcripción, traducción, transporte, procesamiento, inserción de cofactores y ensamblado. El proceso de biosíntesis debe estar estrictamente

regulado para mantener los niveles de actividad metabólica en células y tejidos, de acuerdo a su demanda energética (Schultz, 2001).

Mutaciones en las subunidades del complejo 1 pueden causar enfermedades mitocondriales, entre las que destaca el síndrome de Leigh. Hay algunas evidencias de que defectos en el complejo I pueden jugar cierto papel en la etiología de la enfermedad de Parkinson, tal vez porque el complejo I (al igual que el III) puede padecer fugas de electrones hacia el oxígeno formando superóxidos muy tóxicos.

Complejo 2 (COX2)

El complejo 2 ó Succinato deshidrogenasa ó Succinato coenzima Q reductasa es una flavoproteína ligada a la membrana interna mitocondrial que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones, además contiene FAD (flavín adenín dinucleótido) unido covalentemente a ocho átomos de hierro y ocho átomos de azufre lábiles frente a los ácidos. El complejo II consta de cuatro subunidades codificadas en el núcleo: una flavoproteína (FP) y una proteína hierro-azufre (IP), que en conjunto constituyen la parte catalítica del complejo enzimático, y dos subunidades hidrofóbicas del citocromo b (CybL y CybS). Varias mutaciones en tres genes de la subunidad (SDHB, SDHC y SDHD) que no sea FP han sido reportadas en feocromocitoma y paraganglioma, lo que sugiere que estos genes podrían actuar como genes supresores de tumores (Tomitsuka, 2009).

La molécula de FAD de la enzima, es el aceptor de electrones de la reacción, en general la función bioquímica del FAD es oxidar los alcanos a alquenos, mientras que el NAD^+ oxida los alcoholes a aldehídos o cetonas. Esto es debido a que la oxidación de un alcano como el succinato, a un alqueno como el fumarato es suficiente exergónica como para reducir el FAD a FADH_2 , pero no para reducir el NAD^+ a NADH. Es poco usual hallar una unión covalente entre el FAD y una proteína, en la mayoría de los casos, el FAD se encuentra unido a su enzima asociado de forma no covalente por lo que en este caso el FAD actúa como grupo prostético y no como una coenzima móvil, como lo hace normalmente.

El FADH₂ cede sus dos hidrógenos a la ubiquinona (coenzima Q) que se reduce a ubiquinol (QH₂) y abandona el enzima, difundiendo en la bicapa lipídica hasta alcanzar en siguiente complejo enzimático de la cadena respiratoria. El complejo 2 actúa separando los átomos de hidrógeno que se hallan en posición trans de los átomos de carbono metilénicos del succinato.

Complejo 3 (COX3)

El complejo 3 ó Complejo citocromo bc₁; obtiene dos electrones desde QH₂ y se los transfiere a dos moléculas de citocromo c, que es un transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Al mismo tiempo, transloca dos protones a través de la membrana por los dos electrones transportados desde el ubiquinol.

Complejo 4 (COX4)

El complejo 4 ó citocromo c oxidasa es una proteína transmembrana que se encuentra incluida en bicapas lipídicas de bacterias y en mitocondrias. Se trata de la última enzima de la cadena de transporte de electrones, recibiendo un electrón de cada uno de las cuatro moléculas de citocromo c, después, los transfiere a una molécula de oxígeno, reduciéndola a dos moléculas de agua. Acoplado a este proceso, se produce una translocación de protones a través de la membrana, lo cual genera un gradiente electroquímico en el que la enzima ATP sintasa la emplea para sintetizar adenosín trifosfato (ATP) (Mathews, 2003).

Estructuralmente, el complejo 4 es una proteína integral de membrana que incluye varios grupos prostéticos metálicos así como 13 subunidades, de estas 13, 10 están codificadas por genes situados en el genoma nuclear y tres en el mitocondrial. El complejo posee dos grupos hemo, así como dos centros de cobre (Schultz, 2001).

ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las enfermedades mitocondriales, también conocidas como encefalomiopatías mitocondriales o afecciones de fosforilación oxidativa, son un grupo heterogéneo de alteraciones, caracterizadas por un fenotipo complejo en el que la mayoría de los pacientes presentan encefalopatía y lesiones musculares, además de que pueden dañarse otros órganos como hígado, riñones, corazón, retina, médula ósea, nervios periféricos y páncreas (Ruano, 2002).

La disfunción mitocondrial ocasionada por estrés oxidativo ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como el síndrome de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la ataxia de Friedreich. Las manifestaciones clínicas de estas afecciones son muy variadas, de modo que pueden consistir en: deterioro de las funciones mentales, trastornos motores, cansancio, intolerancia al ejercicio, epilepsia, alteraciones vasculares encefálicas, oftalmoplejía, ptosis palpebral, retinosis pigmentaria, hipoacusia/sordera, ceguera, cardiopatía, insuficiencia hepática y pancreática, anemia sideroblástica, pseudoobstrucción intestinal, acidosis metabólica y otras (Mecocci, 1994).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cérvico uterino es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas, por este motivo en el laboratorio de Oncología Celular se desarrollan diferentes líneas de investigación con el propósito de contribuir en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la proliferación de las células de este tipo de cáncer. Hasta el momento se ha demostrado la presencia del receptor para IL2 (RIL-2) en las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL, y se ha confirmado que 100 UI/ml de IL-2 tienen un efecto inhibitor sobre la proliferación *in vitro* de estas células, el cual se repite en modelos *in vivo* (Alvarado, 1997; Rangel-Corona, 1998; Ayala, 2005), otros estudios indican que la regulación de la proliferación se lleva a cabo por la inducción de apoptosis. Por otro lado, se sabe que la apoptosis puede regular proteínas mitocondriales como COX1 y COX2 (Honda, 2005; Baines, 2005), sin embargo se desconoce si IL-2 al inducir la muerte en células provenientes de CaCu tiene algún efecto en la regulación de estas proteínas.

HIPÓTESIS

Se sabe que 100 UI/mL de Interleucina 2 (IL-2), induce muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL. Dicho proceso de muerte está mediado por la liberación de citocromo c que es un componente de la cadena respiratoria en mitocondria. Por lo tanto, si células de las líneas CALO e INBL se cultivan en presencia de IL-2 a la dosis señalada, se espera una modificación de la expresión del RNAm de los complejos COX1 y COX2 que forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la IL-2 sobre la expresión del RNA mensajero de los complejos COX1 y COX2 en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino CALO e INBL.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Cultivar las líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino CALO e INBL.
- 2) Administrar como tratamiento 100 U/mL de IL-2 a las líneas celulares.
- 3) Extraer y cuantificar el RNAm de las líneas celulares CALO e INBL tratadas con IL-2 para valorar si corresponden a los complejos COX1 y COX2.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

a) Líneas Celulares: Se utilizaron las líneas celulares de CaCu CALO e INBL de la reserva crió preservada del Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Las células se cultivaron en medio líquido RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado. La incubación se realizó a 37° C, una atmósfera de 95% de humedad relativa y 5% de CO₂.

b) IL-2: Se utilizó IL-2 recombinante humano (R&D, systems).

REACTIVOS:

RT

Amortiguador 5X (Invitrogen)

DTT 0.1 M (Invitrogen)

Enzima MMLV-RT (Invitrogen)

DNTP'S 5 mM Mix (Fermentas)

Oligo (DT) 15 Primer 500 µg/mL (Promega)

PCR

Amortiguador 5X Green Go Taq (Promega)

DNTP'S 10 mM Mix (Fermentas)

Enzima Go Taq DNA Polímerasa 5u/µL (Promega)

Primers

ELECTROFORESIS

Agarosa (Invitrogen)

Marcador de peso molecular Puc19 DNA/ MSPL 34-501 Pb (Fermentas)

Buffer de Carga Blue/Orange 6X (Promega)

METODOS:

1) Cultivo y Conteo de Células:

Se cultivaron las líneas celulares CALO e INBL en cajas de cultivo de 75 cm² adicionando medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado, cuando las células se encontraron en fase exponencial, se desprendieron de la caja de cultivo con una solución de verseno, se realizó el conteo de células utilizando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) en cada ensayo se ajustó a una cantidad de 1×10^6 células, que fueron resuspendidas en 1.0 mL de medio, por cada ensayo que se realizó a los diferentes tiempos 30s, 1min., 2min., 3min., 4min., y 5min.

2) Cultivo en presencia de IL-2:

Una vez obtenido el número de 1×10^6 células para cada ensayo, se administró el tratamiento de 100 UI/mL de IL-2, que se retiró a diferentes tiempos: 30s, 1min., 2min., 3min., 4min., y 5min. Tiempos elegidos para conocer la rapidez del efecto de la IL-2.

3) Extracción de RNA mensajero de células de CaCu:

En cada ensayo se ajustó a 1×10^6 de células (inducidas) y se lavaron con 3mL de PBS.

Se centrifugo a 12000 rpm por 5min.

Por cada millón de células se agregó 1mL de Trizol se dejó reposar de 10 a 15 min. a Temp. Amb.(lisado).

Se agregaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente en vórtex de 3 a 5 min. (para separar fases).

Se dejó reposar de 3 a 5 min en hielo, para después centrifugar a 12000 rpm por 15min a una temperatura de 2 y 8 °C.

Se mantuvo a -70 °C. por 24h.

Pasado este tiempo la muestra se sacó del congelador y centrifugó 10 min a 7500 rpm entre 2 y 8 °C.

Posteriormente se decantó con pipeta y se agregó 1mL. de etanol por cada mL. de Trizol.

Se centrifugó 10 min 7500 rpm a una temperatura de 2 y 8 °C. para decantar y dejar secar durante 2h. a temperatura Ambiente.

Se agregaron 20 µL de agua libre de RNAsas (1 stock)

Se guardó a -70 °C para su posterior cuantificación.

4) Cuantificación del RNA mensajero:

Se tomaron 4 µL del stock de RNA y se resuspendió en 196 µL de agua DEPC para determinar las concentraciones de RNA (µg/mL).

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro y se tomaron las absorbancias a 260, 280, la relación 260-280 y concentración de la muestra.

5) Retrotranscripción (RT):

Para llevar a cabo la RT fue necesario que cada muestra de RNAm tuviera una concentración de 2µg/µL de RNA, la cual se calculó con la siguiente fórmula:

(ABSORBANCIA DE 260) (VOLUMEN DE LA DILUCIÓN) (40) / 1000 = 1 µg / µl de RNAm.

Y se ajustó a 2µg/µL.

Posteriormente se realizó la retrotranscripción de cada una de las muestras bajo condiciones determinadas como se muestra en la Tabla 3.

Después de esto se incubó en el termociclador durante 1 hora a 42°C. para obtener el DNA complementario (DNAC).

Reactivo	$\mu\text{L/ RX}$
Amortiguador 5x	5
dNTP` S 5Mm (Mix)	1.5
Enzima MMLV-RT	1
Oligo DT	2
Muestra de RNAm	15.5
Total	25

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la retrotranscripción.

6) Reacción en cadena de la plimerasa (PCR):

El DNAc obtenido en la retrotranscripción, se utilizó para la amplificación del DNAc de COX 1 Y COX 2 usando los oligonucleotidos correspondientes.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador, realizando la mezcla que se muestra en la Tabla 4.

REACTIVO	$\mu\text{L/ RX}$
Amortiguador 5x Green	6
dNTP`s 10Mm(Mix)	0.8
Primers 3'-5' sentido	1.0
5'-3' antisentido	1.0
Go Taq polimerasa 5 unidades/ μL	0.15
Muestra de DNAc	4
H ₂ O libre de RNAsas	7.05
Total	20

Tabla 4. Mezcla de reactivos para la amplificación de DNAc.

7) Electroforesis:

Se preparó el gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X añadiendo 30 μL de bromuro de etidio.

Ya polimerizado se colocó el control de peso molecular (escalera pb) para ubicar el peso molecular de COX1 Y COX2.

Posteriormente se colocaron 4 μ L de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel.

Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis (Owl, USA), cubierto de TBE 0.5 % a 80-90 Volts durante 60 min.

Finalmente se colocó el gel en un transiluminador (UVP, USA) para observar los productos de amplificación, localizando las bandas de COX1 Y COX2, que deben de tener fragmentos de 191pb y 188pb respectivamente.

SECUENCIA DE PRIMERS USADOS:

COX1

GTGGTTCCAAGATGGTTGCT

CACATGGGGATGGGAATTAG

COX2

AACCCGTGTTAATGCCTCTG

CAAACGAGGGAACATGTGTG

Todos los experimentos se realizaron dos veces por duplicado.

RESULTADOS

Se cultivaron las líneas celulares de CaCu en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado, en presencia y ausencia de 100UI/mL de IL-2, por 0.3, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos. Una vez concluido el tiempo de cultivo se extrajo el RNA mensajero (RNAm) total de cada muestra.

Para saber si el RNAm extraído de las líneas celulares CALO e INBL contenían una cantidad suficiente de mensajero, para realizar la retrotranscripción, se llevó a cabo la cuantificación del mismo utilizando un biofotómetro. Los datos de absorbancia a 260nm se utilizaron para calcular la concentración de RNAm.

Para que la muestra de RNA se considere aceptable para realizar una retrotranscripción, se debe calcular su pureza esto se hace a través de la determinación de la relación 260/280nm, la cual debe estar en el rango entre 1-2 unidades, tal como se muestra para los valores obtenidos para cada una de las muestras evaluadas. Los datos del biofotómetro, también, nos permitieron ajustar la cantidad de RNAm a una concentración de 2µg/µL (Tabla 5).

Cuantificación de RNA mensajero

MUESTRA	mg/mL RNAm	ABSORBANCIA 260	ABSORBANCIA 260-280	2mg/mL RNAm
CC0	2692.9	0.269	1.71	0.929
CC1	2999.8	0.300	1.59	0.833
CC2	3327.0	0.350	1.72	0.714
CC3	2312.7	0.248	1.47	1.008
CC4	614.8	0.074	1.57	3.378
CC5	3920.0	0.460	1.60	0.543
CT0	13065.0	1.293	1.74	0.193
CT1	5828.7	0.563	1.70	0.444
CT2	3150.0	0.296	1.66	0.844
CT3	14144.0	1.414	1.52	0.176
CT4	386.6	0.039	1.99	6.410
CT5	3027.0	0.326	1.59	0.766
IC0	2218.8	0.287	1.75	0.871
IC1	2910.2	0.299	1.74	0.836
IC2	2275.5	0.316	1.78	0.791
IC3	2053.9	0.251	1.69	0.996
IC4	608.0	0.085	1.68	2.941
IC5	1864.8	0.206	1.66	1.213
IT0	724.7	0.049	1.83	5.10
IT1	416.7	0.061	2.00	4.098
IT2	818.8	0.020	1.67	12.50
IT3	2798.2	0.273	1.62	0.915
IT4	3032.1	0.291	1.61	0.859
IT5	3736.3	0.366	1.58	0.683

Tabla 5.- Lecturas de absorbancia a 260nm, y relación 260/280 del mensajero obtenido para cada muestra: CC (CALO Control), CT (CALO Tratamiento IL-2), IC (INBL Control) e IT (INBL Tratamiento IL-2). Los números indican el tiempo; 0 (30seg.) 1 (1min) 2 (2min), 3 (3min) 4 (4min), 5 (5min), Los controles corresponden a células cultivadas en ausencia de IL-2.

Una vez, confirmada la pureza del RNAm extraído para cada una de las muestras de las líneas celulares CALO e INBL cultivadas en ausencia (Figura 9) y presencia (Figura 10) de IL-2, a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, se procedió a determinar su integridad. Para ello se utilizó un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio para visualizarlo. En el gel se pueden observar dos bandas definidas del RNA ribosomal, una banda corresponde a la fracción 40s y la otra a la fracción 60s. No se observan cambios en la integridad del RNA obtenido de las células cultivadas en presencia de IL-2 en comparación de aquellas cultivadas en ausencia de IL-2.

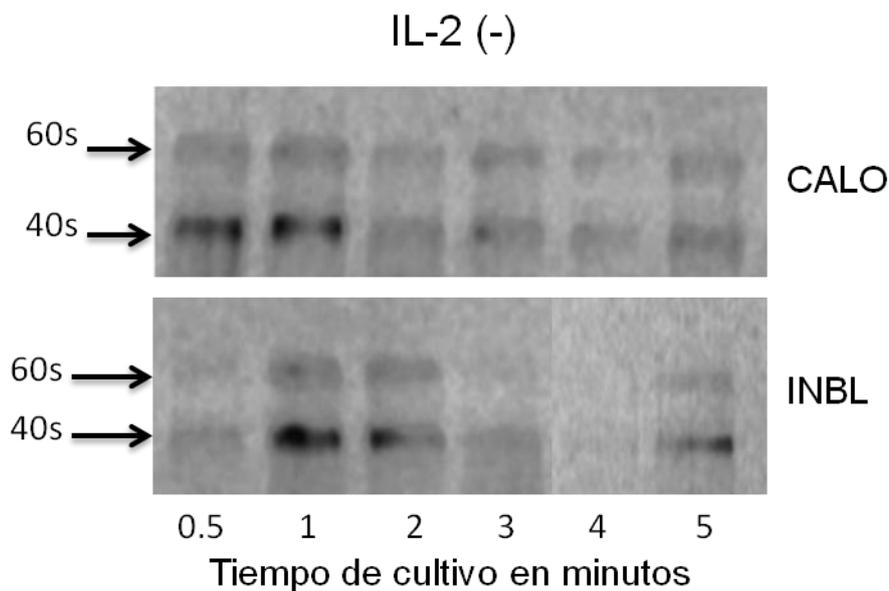


Figura 9. Mensajero total de Células CALO e INBL cultivadas en ausencia de IL-2. Se pueden observar dos bandas que corresponden al RNA ribosomal, en las muestras de las células cultivadas a diferentes tiempo. Una banda corresponde a la fracción 40s y la otra a la 60s.

Confirmada la integridad del RNAm se llevó a cabo la retrotranscripción, obteniendo el DNA complementario (DNAc) para cada una de una de las muestras.

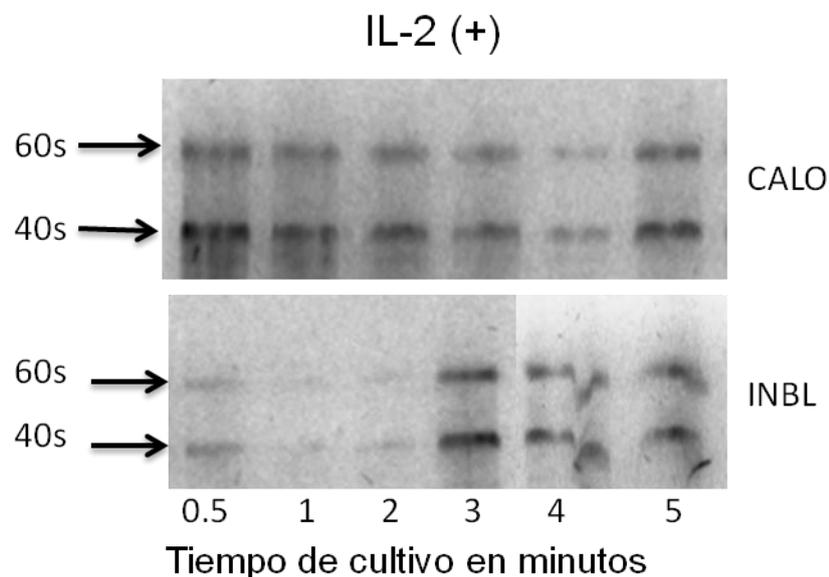


Figura 10. Mensajero total de células CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2. Se pueden observar dos bandas que corresponden al RNA ribosomal, en las muestras de las células cultivadas a diferentes tiempo. Una banda corresponde a la fracción 40s y la otra a la 60s.

Para comprobar que las condiciones establecidas para la PCR eran las correctas se incluyó como control interno de la técnica la determinación de productos de amplificación para β -actina. En este caso observamos, en todas las muestras, la expresión del producto de amplificación de 234 pb esperado, para esta proteína (Figura 11).

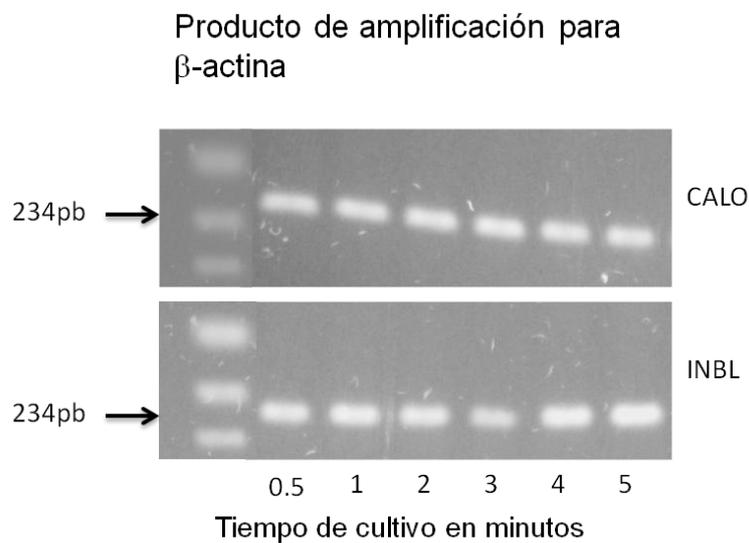


Figura 11. Productos de amplificación para β -actina en células CALO e INBL. En todas las muestras se observa un producto de 234pb que corresponde a β -actina.

EXPRESIÓN DE COX1 EN LA LÍNEA CELULAR INBL

Para evaluar la expresión de los complejos mitocondriales regulados por IL-2, se utilizaron los DNAs previamente obtenidos para cada una de las muestras los cuales fueron amplificados utilizando primers específicos para COX1 y COX2. Los primers utilizados con un tamaño de pares de bases (pb) conocidos fueron: para COX1 aquel que dio un producto de 191pb y de 188pb para COX2.

En las células INBL cultivadas en ausencia de IL-2 por 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, no se observó la banda de 191pb, esperada para el producto de amplificación de COX1 (Figura 12).

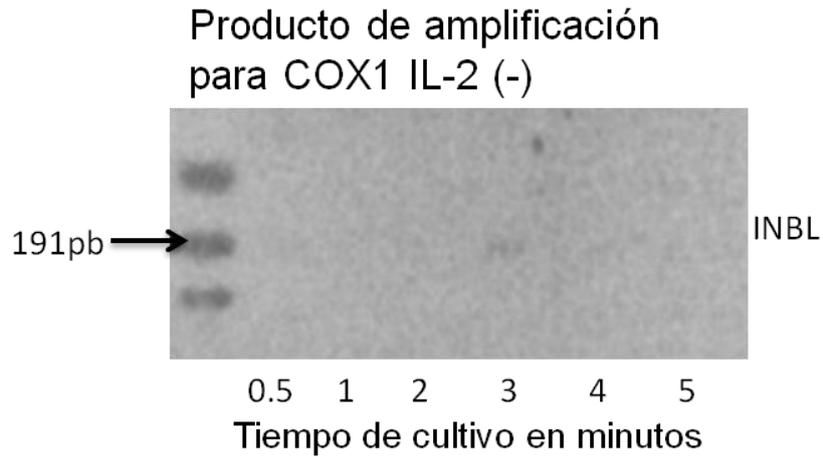


Figura 12. Productos de amplificación para COX1 en células INBL cultivadas en ausencia de IL-2. No se observa, para ninguna de las muestras, el producto de amplificación de 191pb para el RNAm de COX1.

Por otro lado, al cultivar la línea celular INBL, en presencia de IL-2, no se observó el producto de amplificación de 191 pb para COX1 (Figura 13).



Figura 13. Productos de amplificación para COX1 en células INBL cultivadas en presencia de IL-2. No se observa, para ninguna de las muestras, el producto de amplificación de 191pb para el RNAm de COX1.

EXPRESIÓN DE COX1 EN LA LÍNEA CELULAR CALO

Por su parte la determinación de COX1 en la línea celular CALO, cultivada en ausencia de IL-2, a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5min, al igual que la línea INBL, fue negativa ya que no se observó el producto de amplificación de 191 pb esperado para este complejo (Figura 14).

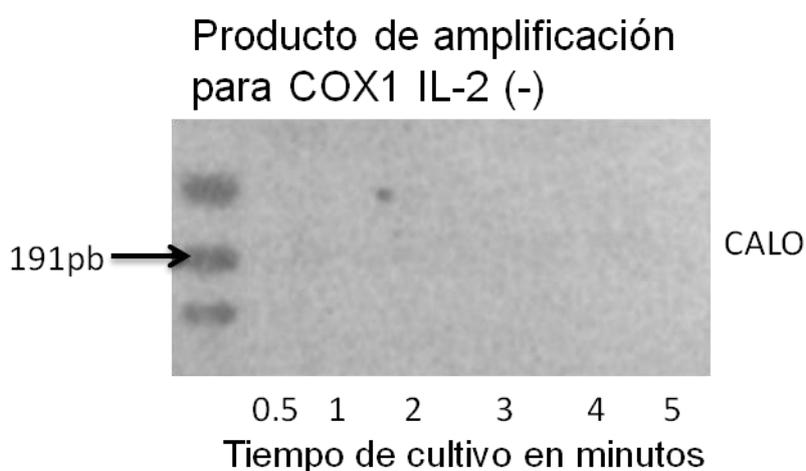


Figura 14. Productos de amplificación para COX1 en células CALO cultivadas en ausencia de IL-2. No se observa, para ninguna de las muestras, el producto de amplificación de 191pb para el RNAm de COX1.

En el caso de las células de la línea CALO cultivadas en presencia de IL-2, se observa el producto de amplificación de 191 pb para COX1, resultado opuesto al obtenido con las células de la misma línea celular cultivada en ausencia de IL-2 (Figura 15).

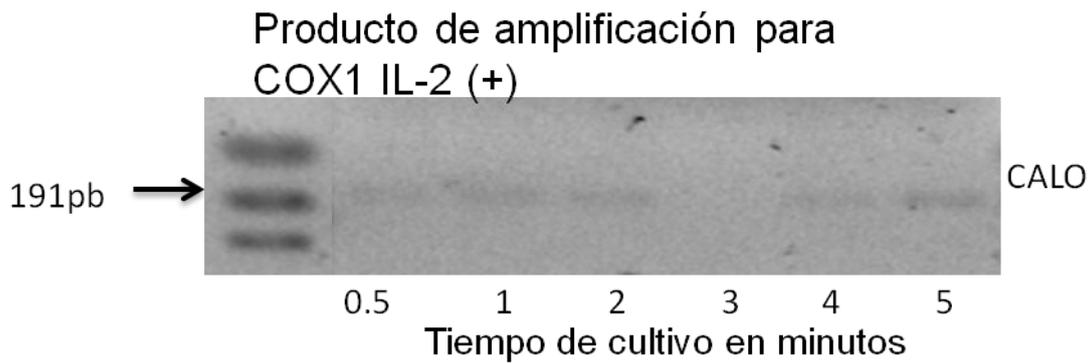


Figura 15. Productos de amplificación para COX1 en células CALO cultivadas en presencia de IL-2. Se puede observar, un incremento del producto de amplificación de 191pb para el RNAm de COX1.

EXPRESIÓN DE COX2 EN LA LÍNEA CELULAR INBL

Al analizar el gel para los productos de amplificación para COX2, en las células de la línea INBL, cultivada en ausencia de IL-2, a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5min, observamos un producto de amplificación de 188 pb, que corresponde a este complejo (Figura 16).

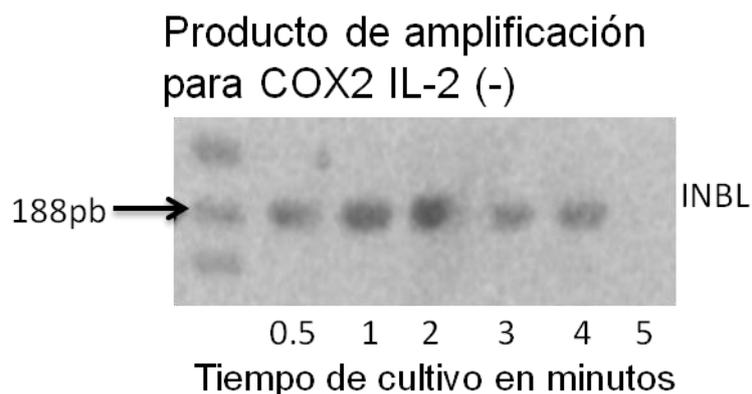


Figura 16. Productos de amplificación para COX2 en células INBL cultivadas en ausencia de IL-2. Se puede observar en las muestras el producto de amplificación de 188pb para el RNAm de COX2, excepto en la muestra correspondiente a 5 min.

En lo que se refiere a las células INBL cultivadas en presencia de IL-2, no se observó una expresión tan marcada del producto de amplificación de 188 pb en

todas las muestras a diferencia de los controles, excepto en la muestra de 5min, donde se regula positivamente la expresión del mensajero, con respecto a los controles. (Figura 17).

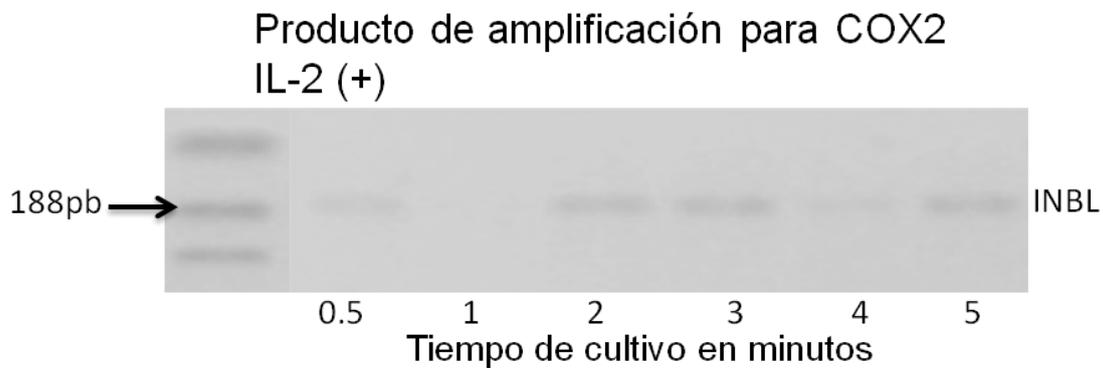


Figura 17. Productos de amplificación para COX2 en células INBL cultivadas en presencia de IL-2. Se localizó producto de amplificación de 188pb para el RNAm de COX2.

EXPRESIÓN DE COX2 EN LA LÍNEA CELULAR CALO

Para la línea celular CALO cultivadas en ausencia de IL-2, a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos, se puede observar una banda de 188 pb a los 4 y 5min, a diferencia del resto de la muestra en las cuales no se detectó la expresión del mensajero para este complejo mitocondrial. (Figura 18).

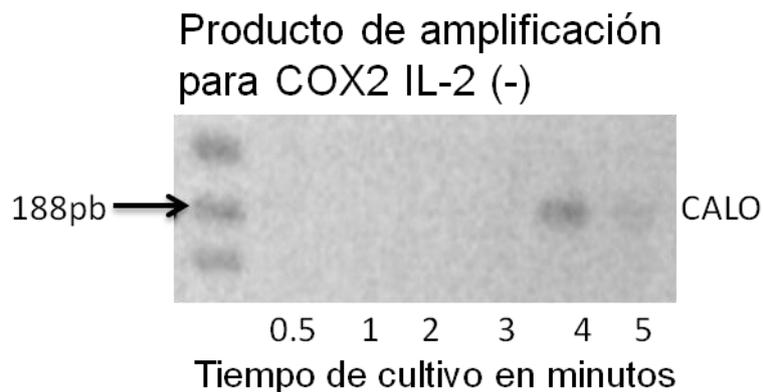


Figura 18. Productos de amplificación para COX2 en células CALO cultivadas en ausencia de IL-2. Solo se puede observar el producto de amplificación de 188pb para el RNAm de COX2, en las muestras de 4 y 5min.

Para el caso de la línea celular CALO, cultivada en presencia de IL-2 se observó un incremento en la expresión del producto de amplificación de 188 pb, esto se pudo observar en todas las muestras comparadas con las muestras control. (Figura 19).

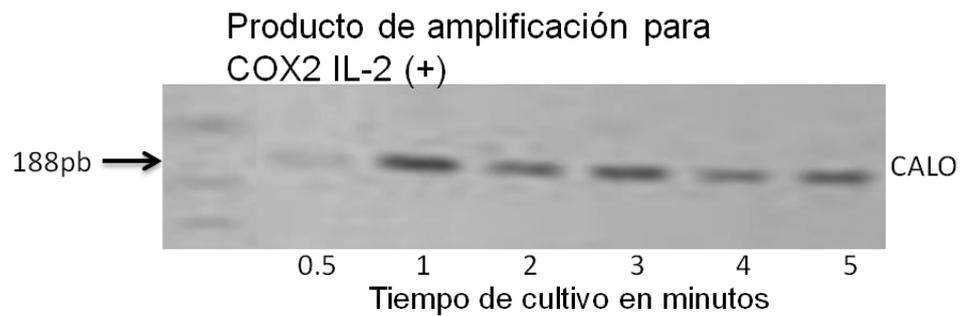


Figura 19. Productos de amplificación para COX2 en células CALO cultivadas en presencia de IL-2. Se localizó producto de amplificación de 188pb para el RNAm de COX2. Se observó un incremento de la expresión en todas las muestra con respecto al control.

DISCUSIÓN

Debido a su papel esencial en el metabolismo energético, el genoma mitocondrial ha sido durante mucho tiempo considerado como el responsable de contribuir en las alteraciones metabólicas en los tumores. Desde la década de los 60s se cuenta con reportes sobre numerosas mutaciones somáticas del DNA mitocondrial (DNAmt) en varios tipos de tumores humanos (Brandon, 2006; Modica-Napolitano, 2007). La disfunción de enzimas de la cadena respiratoria, ha sido reportada una como consecuencia de las mutaciones en el DNAmt, lo que tiene un papel importante en la formación de tumores. Estas afirmaciones se basan en estudios con células cultivadas *in vitro* (Petros, 2005, Modica-Napolitano, 2007). También Chatterjee (2006) y Baysal, (2006) han reportado que en diferentes tipos tumorales se han detectado mutaciones somáticas en el DNA mitocondrial. En oncocitomas renales se ha detectado una pérdida del complejo I de la cadena respiratoria, como consecuencia de mutaciones en el DNAmt lo que resulta en la formación de tumores. (Johannes, 2008).

Mutaciones en las subunidades del complejo 1 pueden causar enfermedades mitocondriales, entre las que destaca el síndrome de Leigh. Hay algunas evidencias de que defectos en el complejo I pueden jugar cierto papel en la etiología de la enfermedad de Parkinson y cáncer.

Recientemente, se demostró que COX1 es un integrante de las vías apoptóticas. Este complejo, parece tener una doble función en la creación de un gradiente de protones en condiciones normales y en la participación de la apoptosis después de la activación de caspasa-3 (Ricci, 2004). La pérdida de esta etapa intermedia de la apoptosis debido a una deficiencia de COX1 podría representar una ventaja a las células tumorales. En otras palabras, ante la falta de COX1 la apoptosis es atenuada, lo que a su vez favorece la formación de tumores.

Es importante considerar estos antecedentes, ya que muestran la importancia de COX1 en la inducción de apoptosis y que numerosos tumores se originan debido a su ausencia o por la presencia de mutaciones para el gen de este complejo. (Lorenc, 2003; Shidara, 2005).

Al respecto en este trabajo, demostramos que las células de las líneas CALO e INBL, derivadas de CaCu no expresan el RNAm para COX1 como se ha reportado previamente otros tipos de células tumorales. Los antecedentes arriba descritos son relevantes ya que el hecho de que las líneas CALO e INBL no expresa producto de amplificación para COX1 se puede interpretarse como un mecanismo de escape de apoptosis que presentan este tipo de células tumorales.

Y que este mecanismo es más eficiente en células en estadios avanzados, esta suposición la hacemos en base al hecho de que en la línea INBL, estadio IVB, no se pudo inducir la expresión del mensajero para COX1 en presencia de IL-2 a diferencia de la línea CALO, en la cual la presencia de IL-2 es capaz de inducir la expresión del mensajero para COX1. Por lo tanto las células de CaCu en estadios avanzados no parecen ser un buen candidato para regular a COX1 y por tanto sería más resistente a ser inducida a apoptosis. Por lo que proponemos a IL-2 como un agente inductor de apoptosis en tumores en estadios tempranos.

La no expresión de COX1 en la línea celular INBL, ni aún en presencia de IL-2, y la regulación de su expresión en CALO sugiere que la muerte celular para esta línea es por apoptosis regulada por la vía mitocondrial.

Por otro lado, dado que las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de alteraciones, caracterizadas por un fenotipo complejo en el que la mayoría de los pacientes presentan encefalopatía y pueden afectarse los músculos y otros órganos como corazón, hígado, riñones, retina, médula ósea, nervios periféricos y páncreas. (Rubio, 2004).

La variación en manifestaciones clínicas pueden explicarse no solo por la heterogeneidad en las mutaciones del DNAm, sino también por mutaciones en el DNA nuclear que codifica parte de las subunidades proteicas de la cadena respiratoria, y más importante aún, por alteraciones del funcionamiento de las numerosas etapas que requiere esta cadena, las cuales están codificadas por DNA nuclear. (Wallace, 2002).

Esta información es muy importante porque se sabe que COX2 está constituido de cuatro subunidades (SDH1, SDH2, SDH3 y SDH4) y que son codificadas totalmente por DNA nuclear y su deficiencia es muy rara, (Recondo, 2001). Sin embargo, podemos observar que en nuestros controles de la línea celular INBL no se expresa este complejo mitocondrial en la muestra INBL control 5 min, lo que nos podría indicar que a manera que transcurre el tiempo, el complejo mitocondrial se va perdiendo. En el caso de la línea celular CALO pasa lo contrario COX2 no se expresa en las primeras muestras solo en las dos últimas que corresponden a CALO control 5min y CALO control 4min, lo que sugiere que a manera que avanza el tiempo COX2 empieza a expresarse, esto puede estar asociado a la naturaleza nuclear de este complejo, porque aunque se comporta de manera distinta en las líneas celulares debido a que corresponden a estadios diferentes, se puede apreciar la expresión de RNAm para COX2 desde tiempos muy cortos a diferencia de COX1.

Con respecto a la expresión de RNAm de COX2, se puede decir que aun cuando la IL-2 regula de manera distinta a cada una de las líneas celulares la expresión de COX2 es constante en todas las muestras con tratamiento. Lo que sugiere que la IL-2 podría estar induciendo muerte por apoptosis. De manera que los resultados obtenidos sugieren que IL-2 participa en la regulación de la expresión de COX2 que estaría activando la muerte por apoptosis.

Los resultados de este trabajo contribuyen en el entendimiento de los procesos moleculares regulados por IL-2 para inducir la muerte de células de carcinoma de cérvix.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir lo siguiente:

- IL-2 no modificó la expresión del RNAm de COX1 en la línea celular INBL.
- IL-2 reguló positivamente la expresión del RNAm de COX1 en la línea celular CALO.
- IL-2 reguló negativamente la expresión del RNAm de COX2 en la línea celular INBL.
- IL-2 aumentó la expresión del RNAm de COX2 en la línea celular CALO.
- Es posible que en la línea celular CALO, proveniente de un CaCu IIIB, a diferencia de la línea INBL estadio IV, la acción de IL-2 es más efectiva.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. México. 1994.

Alvarado M. 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. 1997.

Ankarcrona M. Glutamate induced cell death: apoptosis or necrosis?. *Prog Brain Res*. 1998.

Annis MG, Yethon JA, Leber B, Andrews DW. There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2004.

Ayala A., Corona O., Ibáñez H., Baeza R., Weiss S. y Rangel C. Efecto de IL-2 encapsulada en dos formulaciones de liposomas sobre la proliferación de células de CaCu. *Memorias del XIV congreso de Bioenergética y Bioquímica*. Oaxaca. 2005.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005.

Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, et al. Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell*. 2005.

Baysal BE. Role of mitochondrial mutations in cancer. *Endocr Pathol* 2006.

Ben-Porath, I., and Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-76.

Berridge G, Dickinson G, Parrington J, Galione A, Patel S. Solubilization of receptors for the novel Ca^{2+} -mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J Biol Chem*. 2002.

Bidere N, Lorenzo HK, Carmona S, Laforge M, Harper F, Dumont C, Senik A. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*. 2003.

Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL, Kroemer G. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ*. 2002.

Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998.

Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006.

Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS. Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006.

Brunschwig Alexander. A complete excision of pelvic viscera for advanced Carcinoma. One stage abdominoperineal operation with end colostomy and bilateral ureteral implantation into the color above colostomy. *Cancer*. Vol. 1 1948.

Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993.

Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2001.

Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE: Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2003.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Research* 2002.

Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* 2006.

Chen L., Ashe s., SinghaMC., Gallo DA., Hellstrow I. Metastatic conversion of cell by expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993.

Clarke B, Chetty R. Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer. *Molecular Pathology* 2002.

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997.

Deaciuc IV, Fortunato F, D'Souza NB, Hill DB, Schmidt J, Lee EY, et al. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells in vivo by alcohol and lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1999.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005.

Del Rio Ortiz Itzel. Determinación de las citocinas il-4, il-10, INF gamma y TNF alfa en células de bazo de ratón, activadas con IL-2 encapsulada. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza UNAM, México. 2007.

De Toro Gonzalo. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis, necrosis y formas alternativas de muerte celular. Acatas Hispanoamericanas de Patología. 2006

Disaia, Philip J. Creasman William T. Oncología ginecológica clínica. Elsevier Science, Madrid, España, 2002.

Dobrzansk J., Reome B., Dutton W. Role of Effector Cell-Derived IL-4, IL-5, and Perforin in Early and Late Stages of Type 2 CD8 Effector Cell-Mediated Tumor Rejection. *Journal of Immunology*, 2001.

Dos Santos IS, Beral V. Socio-economic differences in reproductive behaviour. IARC Scientific Publications 1997.

Dupuis A, Prieur I, Lunardi J: Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J Bioenerg Biomembr*. 2001.

Fadeel B, Anlin A, Henter J-I, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* 1998.

Fearnhead HO, Rodriguez J, Govek E-E, Guo W, Kobayashi R, Hannon G, et al. Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998.

Franklin Payne. The role of Radiation and of Surgery in the Management of uterine Carcinoma. *Sur. Gynec. & Obst.* Vol. 94 1952.

Gariglio P. Genética molecular del cáncer humano: Virus y Cáncer. *Ciencia y Desarrollo* 1995.

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2006.

Good Roberto y Wesley Alexander. *Principios De Inmunología Clínica*. Reverte. México. 1990.

Hait WN, Jin S, Yang JM. A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006.

Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1998.

Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*. 2006.

Hoffman MS, Martino MA. consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004.

Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.* 2005.

Isla Valeria. Cáncer Cérvicouterino. El Cáncer que no debe matar. En *Agenda Salud. No. 25, 2002.*

Iwata J, Ezaki J, Komatsu M, Yokota S, Ueno T, Tanida I, et al. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem.* 2006.

Johannes A. Mayr, David Meierhofer, Franz Zimmermann, Rene Feichtinger, Christian Kogler, Manfred Ratschek, Nikolaus Schmeller, Wolfgang Sperl, Barbara Kofler. Loss of Complex I due to Mitochondrial DNA Mutations in Renal Oncocytoma. *Human Cancer Biology.* 2008.

Johansson AC, Steen H, Ollinger K, Roberg K. Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ.* 2003.

Juin P, Pelletier M, Oliver L, et al. Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 1998.

Kagedal K, Johansson AC, Johansson U, Heimlich G, Roberg K, Wang NS, et al. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis—involvement of Bax?. *Int J Exp Pathol.* 2005.

Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004.

Klionsky DJ. Autophagy. *Curr Biol.* 2005.

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995.

Kroemer G: Mitochondrial control of apoptosis: an overview. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999.

Lazcano-Ponce EC, Aguilar PN, Alonso de Ruiz P, et al: Programa de detección Oportuna de Cáncer Cervical en México. 1. Diagnóstico situacional. *Cancerologia*, 1996.

Liu X, Van Vleet T, Schnellmann RG. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004.

Lorenc A, Bryk J, Golik P, et al. Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion* 2003.

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 1994.

Martinou J-C. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999.

Mathews, C. K.; Van Holde, K. E Ahern, K.G. *Bioquímica* (3 edición). (2003)

McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997.

Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994.

Ministerio de Salud. Comisión Nacional de Cáncer Cérvicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino, Chile 2004.

Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. *Curr Mol Med* 2007.

Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, 2003.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*, 2002.

Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005.

Nelson DL; Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed edición, W. H. Freeman. 2005

Nicholls DG; Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*. Academic Press. 2002.

Nishimura Y, Lemasters JJ. Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ*. 2001.

Orrenius S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human diseases. *J Inter Med* 1995.

Palomba L, Sestili P, Cattabeni F, Azzani A, Cantoni O. Prevention of necrosis and activation of apoptosis in oxidatively injured human myeloid leukemia U937 cells. *FEBS Lett* 1996.

PetrosJA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, et al. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005.

Qian T, Herman B, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999.

Raha S, Robinson BH. Mitochondria, Oxigen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, 2000.

Rangel-Corona, Rodríguez C, Flores F, Gómez R, Soto C, Mendoza R y Weiss S. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* 1998.

Recondo J de, Recondo AM de. Les myopathies métaboliques. *Pathologie du muscle strié de la biologie cellulaire a la thérapie*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 2001.

Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004.

Rodríguez Salvá Armando. et. all. Factores de riesgo del cáncer de cervix en el municipio Cerro. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 1999.

Rojas Espinosa Oscar.). *Inmunología*. Primera Edición. Panamericana. México, 1996.

Ross M., Kaye J., Pawlina W. (). *Histología Texto Y Atlas A Color Con Biología Celular Y Molecular*. Panamericana. México. 2005.

Ruano Calderón L. Para entender las mitocondriopatías. *Arch Neurocien*. México, 2002.

Rubio González T, Verdecia Jarque M. Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas . *MEDISAN* 2004.

Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999.

Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Acad. Sci.* 1991.

Schultz BE, Chan SI: Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 2001.

Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, et al. Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005.

Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004.

Sun X-M, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999.

Szarewski A, Cuzick J. Smoking and cervical neoplasia: a review of the evidence. *Journal of Epidemiological Biostatistics* 3, 1998.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 1995.

Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem & Biol* 1998.

Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. *Proc. Jpn. Acad., Ser.* 2009.

Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* 2000.

Valle Mendiola A. y Weiss Steider B. Origen Molecular Del Cáncer. *Vertientes.* 2003.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999.

Voet D; Voet JG. *Biochemistry* 3rd ed edición, Wiley. 2004.

Walboomers JM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 1999.

Wallace DC, Lott MT. Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. En: Emery and Rimoin's. Principles and practice of medical genetics. 14 ed. Edinburgh : Churchill-Livingstone, 2002.

World Health Organization. Cervical cancer, oral contraceptives and parity. Geneva, WHO, Weekly Epidemiological Record, No. 20 2002.

Wright TAC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ; ASCCP-Sponsored Consensus Conference. Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. JAMA. 2002.

Yamashima T. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade from nematodes to primates. Cell Calcium. 2004.

Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, Abboud FM, Welsh MJ. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004.

Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanags DM, Orrenius S. Breakthroughs and views. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1997.

Zur Hausen H. Papillomavirus. Biochimica et biophysica Acta 1996.