



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA II



## TESIS DE LICENCIATURA

**Interleucina 2 regula la expresión de la caspasa 3 en líneas  
celulares de cáncer cérvicouterino CASKI, CALO, INBL,  
SIHA**

Presenta:

**TORRES CORIORILES EDGAR IVAN**

Obtener el grado de:

**BIÓLOGO**

Director de Tesis.

**C. a Dr. ROSALVA RANGEL CORONA**

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

L-4



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer 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 C. a Dra. Rosalva Rangel Corona

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa PAPIIME de la DGAPA, UNAM Proyecto PE-208910.

MÉXICO D.F. MARZO DE 2012

A mi asesora y directora de tesis, la M. en C. Rosalva Rangel Corona por el tiempo dedicado, ayuda, apoyo y sugerencias para la elaboración de este proyecto y toda mi estancia en el laboratorio, la estimo y es un gran ejemplo a seguir. A los miembros del jurado: Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dra. María De Lourdes Mora Garcia, Biól. Maria Cristina Alvarado, Biól Reynalda Roldán Pérez por su tiempo, sugerencias y contribuciones para la elaboración de este escrito. A Itzel Del Río Ortiz por compartirme y trasmitirme sus conocimientos y experiencias en el trabajo experimental, así como a la Dra. Teresa Corona, Arturo Valle, Octavio Zerón por su valioso conocimiento y consejos dados.

Al Sr. Don José Chavarría por la convivencia y el mantenimiento de los materiales del laboratorio. A todos mis amigos del laboratorio: Tanita, Niño, Leo, Chencho, Dany, Edith, Karla, Miriam, Yet, Parra, Gomarianita, Rubi, Migue, los chicos Sargassum y aquellos más que han pasado por el laboratorio que como siempre lo dije fue el mejor labo de todos.

A mis amigos de la carrera y de la selección de Futbol rápido. Eli, Aide, Brau, Leo, Tona, Nestor, Adrian, Mario, Punk, Checo, Estrella, Sury, Juanito, Mes, Coco, Ivan y a los profes, Gus y Jarra por regalarme momentos inolvidables con cada uno de ustedes llenos de felicidad y logros momentos, llenos de historias que contar. A mis amigos de toda la vida: Jon, Harnol, Pedro, por conservar nuestra amistad y estar con migo en cualquier momento.

**GRACIAS** a todos ustedes por ser parte de mi vida.

## DEDICATORIAS

Con todo mi amor y mi respeto a mi papa IGNACIO TORRES TORRES y a mi mama MARIA DE LOURDES CORIORILES LEYTE, por sus incomparables consejos y por permitirme desarrollarme como persona, gracias por su inmenso amor que logro alentarme para demostrar lo mejor de mí, gracias por empeñarse en mi educación en todas las formas posibles, gracias por creer en mi respetando mis decisiones, por su comprensión y apoyo sin condición ni medida y por abrirme camino a la vida, siempre estaré infinitamente agradecido con ustedes, los AMO.

A mis hermanos Sergio, Vele, gracias por su apoyo por estar en mi vida y formar la maravillosa familia que tenemos, los quiero, admiro y respeto, A mis abuelitos en especial a mi abuelo José Corioriles que ya no está con nosotros y se le extraña a mi abuelita Lupe que es como una madre para mí y por ultimo y no menos importante a mi Mama Lucha.

Gracias chaparrita hermosa por todos estos años de aguantarme sabes que te Amo y gracias por el hermoso regalo que me diste, no puedo olvidarme de una persona que me regalo su confianza y cariño gracias Sue.

**ÍNDICE.**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>9</b>
<b>Huellas del cancer</b> .....	<b>9</b>
<b>CANCER</b> .....	<b>12</b>
<b>Tipos de cancer</b> .....	<b>12</b>
<b>Cancer cérvicouterino</b> .....	<b>13</b>
<b>Estadificación del cancer cérvicouterino (FIGO)</b> .....	<b>15</b>
<b>APOPTOSIS</b> .....	<b>18</b>
<b>PROTEÍNAS PROAPOPTÓTICAS Y ANTIAPOPTOTICAS</b> .....	<b>20</b>
<b>Familia de proteínas Bcl-2</b> .....	<b>20</b>
<b>IAPs</b> .....	<b>22</b>
<b>Vía intrínseca de señalización de apoptosis</b> .....	<b>23</b>
<b>Via extrínseca o de los receptores de muerte</b> .....	<b>24</b>
<b>CASPASAS</b> .....	<b>26</b>
<b>Caspasa 3</b> .....	<b>28</b>
<b>CITOCINAS</b> .....	<b>28</b>

<b>Interleucina 2 (IL-2)</b> .....	<b>29</b>
<b>CAMPTOTECINA</b> .....	<b>31</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>METODO</b> .....	<b>36</b>
<b>Condiciones de cultivo y proliferación de las líneas celulares-</b>	<b>36</b>
<b>Cultivo en presencia de IL-2</b> .....	<b>37</b>
<b>Citometria de flujo</b> .....	<b>37</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>Expresión de caspasa 3 en células de (CaCu) CASKI</b> .....	<b>39</b>
<b>Expresión de caspasa 3 en células de (CaCu) CALO</b> .....	<b>41</b>
<b>Expresión de caspasa 3 en células de (CaCu) INBL</b> .....	<b>43</b>
<b>Expresión de caspasa 3 en células de (CaCu) SIHA</b> .....	<b>45</b>
<b>Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico II, CALO y SIHA</b> .....	<b>47</b>
<b>Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico IV, CASKI e INBL</b> .....	<b>48</b>
<b>Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV16+</b> .....	<b>49</b>

<b>Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV18+ -----</b>	<b>50</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES -----</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS -----</b>	<b>58</b>
<b>REFERENCIAS -----</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS

**Apaf-1:** Factor activador de apoptosis.

**Bad:** Miembro apoptótico de la familia Bcl-2.

**Bax y Bad:** Miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.

**Bcl-2:** B cell lymphoma 2 miembro de la familia Bcl-2, identificada como el producto del proto-oncogen bcl-2.

**CaCu:** Cáncer cérvicouterino.

**Bcl-w:** Miembro de la familia Bcl-2 antiapoptótico

**Bcl-XL.** Miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1

**BH:** (homología Bcl-2). Segmentos alfa helicoidales que funcionan como motivos de interacción proteica.

**BH3:** Dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.

**BH4:** Dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2

**Bid:** Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés *BH-3 Interacting domain Death*

**BiK:** Del inglés *Bcl-2 interacting killer*.

**Bim:** miembros proapoptóticos de la familia Bcl2 comparte la secuencia de homología sólo en el dominio BH3

**BIR:** (baculoviral IAP repeat) dominio muy conservado de 70 aminoácidos que es esencial para la actividad antiapoptótica de IAP

**CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasas.

**CASPASAS:** Cisteína proteasas específicas de aspartato.

**CPT:** Camptotecina

**CPTs:** Compuestos derivados o análogos de camptotecina

**dATP:** Participa en el reclutamiento y activación de la procaspasa 9.

**DD:** Dominio de muerte.

**DED:** Dominio efector de muerte.

**DISC:** Complejo de señalización de iniciación de muerte.

**DNA:** Acido desoxirribonucleico.

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas.

**FAS:** Miembro de la superfamilia de los receptores de la muerte (TNF).

**FBS:** Suero fetal bovino.

**FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

**FSC:** (forward scatter). Dispersión frontal.

**HR HPV:** Virus del papiloma humano de alto riesgo.

**IAP,** inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.

**ICAD/CAD,** heterodímero inhibidor/desoxirribonucleasa, que para actuar como desoxirribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD.

**ICAD:** DNAsa inhibidora de caspasas activadas.

**IF:** Intensidad de fluorescencia.

**IFNs:** Interferones.

**IL-2:** interleucina-2.

**RIL-2:** Receptor de interleucina-2.

**INF:** Interferón.

**ECM:** Matriz extracelular.

**LAK:** Células asesinas naturales estimuladas por citocinas.

**LR HPV:** Virus del papiloma humano de bajo riesgo.

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear del locus Kappa de las inmunoglobulinas en células B.

**Noxa:** Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

**Omi/HtrA2:** Del inglés *high temperatura required protein* .

**PARP,** poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por las caspasas.

**NK:** Células asesinas naturales.

**PBS:** Tampón salino de fosfato.

**RAIDD:** Proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**RNA:** Acido ribonucleico.

**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensajero.

**Smac/DIABLO:** Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa, /proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP.

**SSC:** (Side scatter). Dispersión lateral.

**TGF beta:** Factor transformador de crecimiento.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**TNFR:** Receptor de factor de necrosis tumoral.

**TNFR1:** Receptor de muerte del TNF.

**TOPO I:** Topoisomerasa I

**TRADD:** Proteína con dominio de muerte.

**TRAF:** Factor asociado al receptor TNF.

**TRAIL:** Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF.

## RESUMEN

El cáncer cérvicouterino (CaCu), según la Organización Mundial de la Salud es la segunda causa de mortalidad femenina en todo el mundo. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500 000 casos nuevos se presentan cada año, con unas 300 000 muertes. Tan sólo en el año 2002 se presentaron 493 243 casos y de estos, 273 505 fueron decesos. GLOBOCAN 2008 señala que en México la incidencia más alta en tumores ginecológicos es el cáncer de mama con 13939 casos de los cuales 5217 fueron decesos y en segundo lugar el cáncer cervico uterino con 10186 de los cuales 5061 fueron decesos.

Por otra parte, interleucina 2 (IL-2) es utilizada sola ó en combinación en inmunoterapia, para inducir regresión de tumores en estadios avanzados, mostrando una modesta respuesta antitumoral, sin embargo su aplicación vía sistémica perturba vías de regulación hematopoyética importantes y puede provocar serios efectos secundarios, por lo cual su uso es limitado.

Investigaciones del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cancer FES-ZARAGOZA UNAM, han demostrado que 100 UI/mL de IL-2 administrada en cultivos de líneas celulares de CaCu inhibe la proliferación de las células y después de tres días las células mueren por apoptosis, esta última determinada por la fragmentación del DNA extraído de células cultivadas en presencia de la citocina. Tomando en cuenta que las CASPASAS, son los principales reguladores de la muerte celular por apoptosis y que caspasa 3 es una caspasa efectora y se considera como un indicador de muerte por esta vía de señalización, se decidió estudiar si IL-2 regula la expresión de caspasa 3 en cultivos de las líneas celulares de CaCu: CASKI, CALO, INBL y SIHA.

Los resultados de este trabajo muestran que en las líneas celulares de CaCu CASKI, CALO, INBL, Y SIHA cultivadas en ausencia de IL-2 existen niveles basales de caspasa 3. Esto indica que la enzima puede estar siendo constantemente sintetizada y almacenadas en su forma de precursor inactivo (zimógeno). Por otra parte, el aumento de la intensidad de fluorescencia (IF), para determinar la presencia de caspasa 3 en células de las 4 líneas de CaCu, indica que 100UI/mL de IL-2 regula el aumento de caspasa 3 en las líneas de CaCu CASKI, CALO, INBL y SIHA. Y que la línea celular CALO mostró la mayor síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2.

También demostramos que el estadio clínico del tumor no es determinante en la regulación de la síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2. Finalmente, mencionaremos que en este trabajo se proporciona información importante del papel que juega el tipo de HPV que infecta a las células de CaCu en la regulación de la síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2. Y proponemos el uso de IL-2 como alternativa terapéutica para pacientes con CaCu en particular en tumores de estadio clínico temprano.

## INTRODUCCIÓN

La apoptosis es la forma fisiológica de muerte celular que puede ser activada por dos vías; la vía intrínseca ó mitocondrial y la via extrínseca ó de los receptores de muerte. Este proceso interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas ó dañadas. Morfológicamente, en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (Jun-jie Liu et al 2011), pero en el cáncer, aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes ó a la inactivación de genes supresores. De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se inclina hacia la proliferación descontrolada y la inmortalización celular. Sin embargo, el termino cáncer se define, no sólo por la inmortalización de las células sino también por su capacidad invasora local y a distancia (Meléndez Zajgla y Ceballos Cancino 2008). De manera normal las células tienen mecanismos de control de la proliferación capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre. Ya sea para repararlo ó bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy extenso y no se repara. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo, en una célula, hasta que el error se haya corregido; no obstante, las células tumorales suelen presentar mutaciones en proteínas reguladoras del ciclo celular y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del ADN.

Actualmente, se desarrollan terapias alternativas como la inmunoterapia. Se refiere al conjunto de estrategias de tratamiento para estimular el sistema inmune frente enfermedades como el cáncer o para aminorar los efectos secundarios de tratamientos muy agresivos usados contra el cáncer.

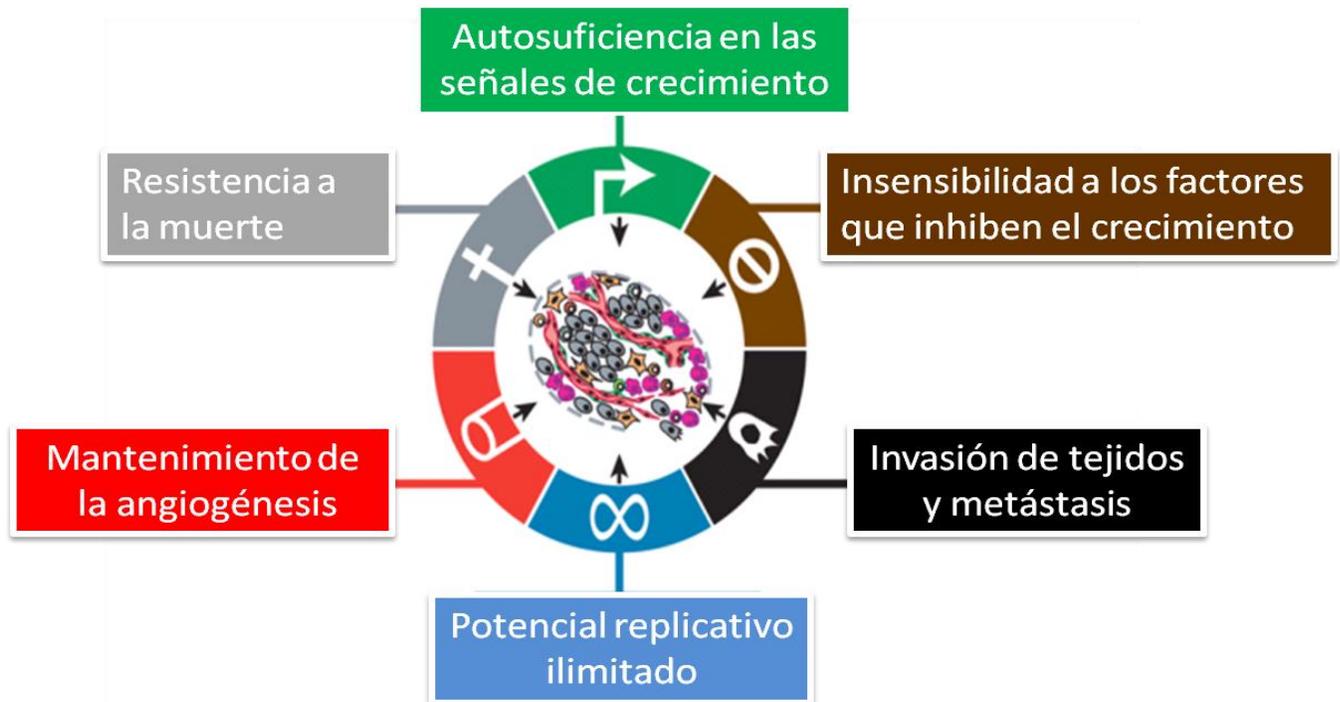
En la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer FES-ZARAGOZA UNAM. Se ha estudiado el efecto de IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer cérvicouterino (CaCu) CALO e INBL pudiendo aclarar que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de las líneas celulares se puede inhibir la proliferación de las células de CaCu en presencia de altas dosis de IL-2 exógena, sin embargo, en presencia de 5-10 UI/mL de IL-2 podemos inducir la proliferación de estas mismas células tumorales. (Rocha-Zavaleta et al 2004, Carpi A 2009).

Este trabajo tiene como principal objetivo determinar el comportamiento de caspasa 3 en las líneas celulares de (CaCu) cultivadas en presencia de (100 UI/mL) de IL-2 y observar si la expresión de esta proteína es regulada por la presencia de altas dosis de IL-2 exógena en los cultivos de estas líneas celulares, la regulación de esta proteína proporciona datos interesantes debido a que es uno de los principales indicadores de apoptosis por ser una caspasa que regula la ejecución de las señales apoptóticas y es la principal reguladora de la degradación de sustratos que favorecen la fragmentación del DNA y la culminación de la apoptosis.

## MARCO TEORICO

### HUELLAS DEL CÁNCER

Las células cancerosas se originan en respuesta a mutaciones genéticas (Hanahan y Weinberg 2000), que sugieren que el gran catálogo de genotipos en la célula del cáncer es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología de la célula que dicta de manera colectiva el crecimiento maligno y son: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a los factores que inhiben el crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis y evasión del programa de apoptosis observados en la Figura 1 (Hanahan y Weinberg 2011).



**Figura 1.** El esquema muestra las seis características ó huellas distintivas de las células cancerosas originales propuestas en el año 2000. "Tomado y modificado de Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg", 2011.

## **El mantenimiento de señalización proliferativa**

Posiblemente el rasgo más fundamental de las células cancerosas implica su capacidad para sostener la proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de la promoción del crecimiento así como señales que indican la entrada y la progresión a través del crecimiento celular y el ciclo de división, lo que asegura una homeostasis en la célula (Hanahan y Weinberg).

## **Evasión de los supresores de crecimiento**

Además de la capacidad característica de inducir y mantener la acción positiva de las señales de crecimiento, las células cancerosas también, deben sortear los programas que regulan negativamente la proliferación celular, muchos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumores. Existen decenas de supresores de tumor que limitan el crecimiento y la proliferación celular. Los dos supresores de tumores más descritos y que codifican un prototipo de la proteína RB (retinoblastoma asociados) y las proteínas de TP53, que funcionan como nodos de control central dentro de las dos claves complementarias como circuitos celulares, son los principales reguladores de la proliferación senescencia y apoptosis celular (Hanahan y Weinberg).

## **Resistir a la muerte**

El concepto de muerte celular programada por apoptosis actúa como una barrera natural contra el desarrollo del cáncer. Se basa en el esclarecimiento de los circuitos de señalización que regula las vías apoptóticas debido a que estas se activan en respuesta a diversas tensiones fisiológicas que las células de cáncer evaden durante el curso de la génesis del tumor. Una de ellas es el daño al ADN que se asocia con hiperproliferación (Hanahan y Weinberg).

## **Inducción de la angiogénesis**

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno, así como capacidad de evacuación de desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La vasculatura del tumor, generado por el proceso de la angiogénesis, responde a estas necesidades. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica el nacimiento de nuevas células endoteliales (angiogénesis) que producen nuevos vasos a partir de los ya existentes. Después de esto la morfogénesis y la vasculatura normal se convierte en gran medida en reposo.

En el adulto, participan como parte de los procesos fisiológicos tales como la curación de heridas y ciclo reproductivo femenino, es decir la angiogénesis se activa transitoriamente. En contraste, durante la progresión tumoral, un interruptor angiogénico es casi siempre activado y permanecerá encendido, causando la vasculatura y formación de nuevos vasos que ayudaran a sostener la expansión crecimientos neoplásicos (Hanahan y Weinberg).

### **Replicación que permite la inmortalidad**

En el año 2000, era ampliamente aceptado que era necesario inducir en las células de cáncer un potencial replicativo ilimitado a fin de generar tumores macroscópicos. Esta capacidad se encuentra en marcado contraste con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes de células normales en el cuerpo, que son capaces de pasar a través de un número limitado crecimiento. En raras ocasiones, las células surgen de una población en crisis y muestran un potencial replicativo ilimitado lo que da origen a la inmortalización de las células que es un rasgo característico de las células cancerosas que poseen la capacidad de proliferar en cultivo, sin evidencia de senescencia ó muerte (Hanahan y Weinberg).

### **Activación Invasión y metástasis**

Los mecanismos subyacentes a la invasión y la metástasis eran en gran parte un enigma. Estaba claro que los carcinomas que surgen de los tejidos epiteliales avanzan a grados superiores de malignidad, que se refleja en la invasión local y metástasis a distancia, las células de cáncer asociado típicamente desarrollado alteraciones en su forma, así como en su adhesión a otras células y a la matriz extracelular (ECM). La alteración mejor caracterizada de moléculas de adhesión en células tumorales es la pérdida de E-cadherina y la re-expresión permite la regresión tumoral. Por lo que E cadherina está clasificada como un supresor de tumor. . Establecieron el (Hanahan y Weinberg)

## CÁNCER

El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y puede originarse a partir de cualquier tipo de célula o tejido corporal. Los tumores pueden ser benignos o malignos. En los tumores malignos las células se vuelven atípicas, comienzan a crecer y a multiplicarse de manera rápida y desorganizada. Estas células que proliferan en un órgano determinado pueden, con el tiempo, invadir otras áreas del cuerpo, a través de la sangre y del sistema linfático, es lo que se conoce como localización secundaria o metástasis.

### Tipos de cáncer

El cáncer puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo, es así por lo que se pueden clasificar los distintos tipos de cáncer (Burgués Gasió 2005).

**Carcinoma.** Son los tipos más comunes de cáncer, se originan de las células que cubren las superficies externas e internas del cuerpo entre ellos los más frecuentes son de pulmón, mama, colon y cáncer cérvicouterino (CaCu).

**Sarcoma.** Estos tipos de cáncer se originan de células que se encuentran en los tejidos de soporte del cuerpo, como por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, tejido conectivo y músculo.

**Linfoma.** Son cánceres que se origina de en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmunológico.

**Leucemia.** Se origina de las células inmaduras de la sangre que crecen en la médula ósea y que tienen la tendencia a acumularse en grandes cantidades en el torrente sanguíneo.

**Mieloma.** Se presenta en las células plasmáticas de la médula ósea

## CÁNCER CÉRVICOUTERINO (CaCu)

El Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es una mutación celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, 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; Dueñas-Gonzalez 2010). El cuello uterino ó cérvix es la abertura del útero o matriz que a la vez se conecta con la vagina.

Diversos estudios muestran que dentro de la etiopatogenia del cáncer cérvicouterino se ha identificado el virus del papiloma humano (VPH) como el principal agente infeccioso de transmisión sexual. Existen otros factores de riesgo como son, inicio prematuro de vida sexual activa (antes de los 18 años de edad), no haberse practicado un estudio citológico como el Papanicolaou, inmunodeficiencia adquirida ó congénita, promiscuidad sexual propia ó de la pareja, uso de anticonceptivos orales por más de 10 años sin supervisión médica, tabaquismo, multiparidad, antecedentes familiares de cáncer, infecciones genitales recurrentes.

En cuanto al VPH como un factor importante en la oncogénesis del CaCu se sabe que es el agente causal de múltiples procesos patológicos de cérvix que se transmiten por contacto sexual, ha sido aislado de carcinomas epidermoides vulvares y vaginales; además, se asocia con otros tumores epidérmicos y en lesiones proliferativas de la piel y las mucosas Los Virus del Papiloma han sido aislados de más de 60 especies de animales incluyendo mamíferos, reptiles y anfibios. La mayoría de estos virus infectan las superficies epiteliales de la piel ó las mucosas y produce verrugas. Los virus del papiloma son específicos de especie y no producen infecciones cruzadas. (Garland y Smith. 2010).

En el humano utilizando hibridación molecular y análisis enzimático restrictivo, se han identificado 100 tipos de VPH, algunos tipos se asocian a lesiones de alto riesgo ya que se encuentran con mayor frecuencia en lesiones que progresan a CaCu. Algunos de los tipos de VPH de mayor importancia se muestran en la tabla 1.

Tipos de VPH	Lesión que causan
1,2,3,4,7,10,28	Verruga común
6,11,40,42,43,44,45,53,54,55,57,59,61 67,69,71,74,82	Condiloma ano genital, lesión de bajo Riesgo (CIN grado 1).
16,18,31,32,33,34,35,39,51,52,56,58,61, 66,68,70,73	Lesión ano genital de alto riesgo (NIC grado II y III); lesión laringoesofágica; cáncer pulmonar
26,27	Verruga común, deficiencia inmunitaria y transplantes renales.

**Tabla 1.** Tipos de VPH, lesiones y órgano blanco. " Tomado de Lagunas-Martínez 2009".

En más 99% de los casos de CaCu se detecta el ADN del virus del papiloma humano (VPH) en las lesiones intraepiteliales ó lesiones malignas. Algunos tipos de VPH se conocen como virus de bajo riesgo porque raramente se convierten en cáncer y ocasionan verrugas ó Condiloma. (Lagunas-Martínez 2009)

El virus del papiloma humano puede ser clasificado como de alto riesgo (HR-HPV) ó tipos de bajo riesgo (LR-HPV) sobre la base de sus asociaciones clínico genital. Los tipos VPH-HR, tales como el VPH 16 y 18 se asocian con lesiones que pueden progresar a neoplasia intraepitelial de alto grado y en última instancia, a un carcinoma, mientras que el LR-HPV, como HPV 6 y 11 se encuentran asociados principalmente con lesiones genitales benignas , que rara vez progresan a cáncer (López –Saavedra y zano-Soberón. 2006). El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer. Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer cérvicouterino (CaCu) es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300 000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500 000 casos nuevos se presentan cada año. Tan solo en el año 2002 se presentaron 493 243 y de estos, 273 505 fueron decesos (Ministerio de Salud 2004). Y según GLOBOCAN 2008 en México la incidencia más alta en tumores ginecológicos es el cáncer de mama con 13939 casos de los cuales 5217 fueron decesos y en segundo lugar el cáncer cervico uterino con 10186 de los cuales 5061 fueron decesos estos datos se encuentran referidos en la figura 2 (Ferlay J et al 2002).

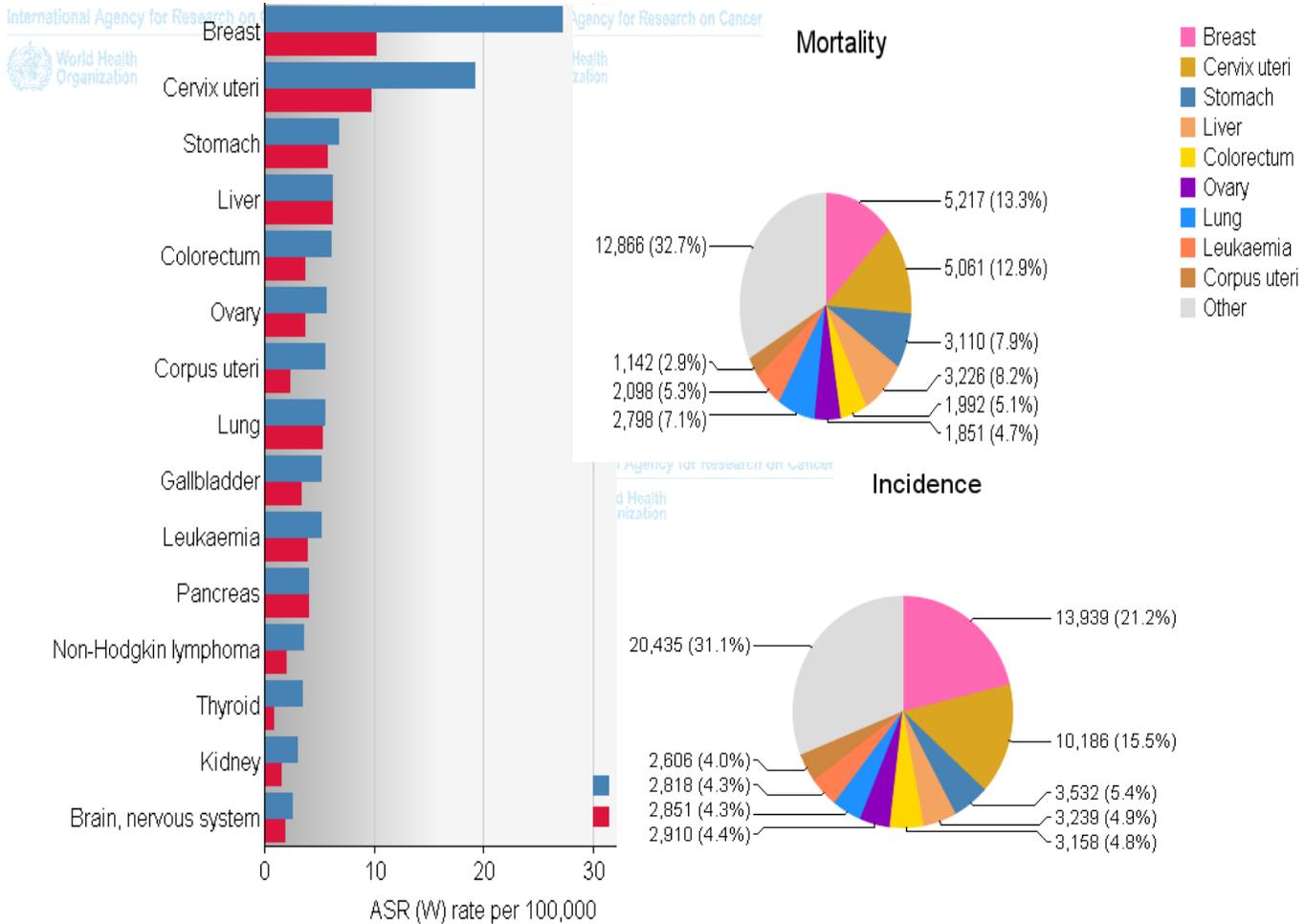


Figura 2. Tipos de cáncer con mayor Incidencia y mortalidad en México. "Tomado de GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cáncer Information", 2011

## Estadificación del cáncer cérvicouterino (CaCu) FIGO

### Estadio I

El cáncer se encuentra solamente en el cuello uterino. El estadio I se divide en estadios IA e IB.

Estadio IA: se detecta una cantidad muy pequeña de cáncer en los tejidos del cuello uterino que solo puede verse con un microscopio. El estadio IA se divide en estadios IA1 y IA2 de acuerdo con el tamaño del tumor.

En el estadio IA1, el cáncer no está a más de tres milímetros de profundidad y no mide más de siete milímetros de ancho.

En el estadio IA2, el cáncer está a más de tres milímetros de profundidad, pero no a más de cinco milímetros de profundidad, y no mide más de siete milímetros de ancho.

Estadio IB: en el estadio IB, el cáncer solo se puede ver con un microscopio y está a más de cinco milímetros de profundidad ó mide más de siete milímetros de ancho, ó se puede ver sin un microscopio. El cáncer que se puede ver sin un microscopio se divide en los estadios IB1 e IB2, de acuerdo con el tamaño del tumor.

En el estadio IB1, el cáncer se puede ver sin un microscopio y mide cuatro centímetros ó menos.

En el estadio IB2, el cáncer se puede ver sin un microscopio y mide más de cuatro centímetros (8).

## **Estadio II**

En el estadio II, el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino, pero no hasta la pared de la pelvis (tejidos que revisten la parte del cuerpo entre las caderas) ó hasta el tercio inferior de la vagina. El estadio II se divide en estadios IIA y IIB, según la distancia a la que el cáncer se diseminó.

Estadio IIA: el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino hasta los dos tercios superiores de la vagina, pero no hasta los tejidos que rodean el útero. El estadio IIA se divide en los estadios IIA1 y IIA2, de acuerdo con el tamaño del tumor.

En el estadio IIA1, el tumor se puede ver sin un microscopio y mide cuatro centímetros o menos.

En el estadio IIA2, el tumor se puede ver sin un microscopio y mide más de cuatro centímetros.

Estadio IIB: el cáncer se diseminó más allá del cuello uterino hasta los dos tercios superiores de la vagina y los tejidos que rodean el útero (Globocan 2008; FIGO 2012).

## **Estadio III**

En el estadio III, el cáncer se diseminó hasta el tercio inferior de la vagina, se puede haber diseminado hasta la pared de la pelvis, ó puede haber causado problemas en los riñones. El estadio III se divide en estadios IIIA y IIIB, según la distancia hasta la que el cáncer se diseminó.

Estadio IIIA: el cáncer se diseminó hasta el tercio inferior de la vagina, pero no hasta la pared de la pelvis. Estadio IIIB: El cáncer se diseminó hasta la pared pélvica; ó el tumor creció lo suficiente como para bloquear los uréteres (los tubos que conectan los riñones con la vejiga). Este bloqueo puede hacer que los riñones se agranden ó dejen de funcionar (8).

## **Estadio IV**

En el estadio IV, el cáncer se diseminó hasta la vejiga, el recto u otras partes del cuerpo. El estadio IV se divide en estadios IVA y IVB, según el lugar donde se encuentre el cáncer.

Estadio IVA: el cáncer se diseminó hasta órganos cercanos, como la vejiga o el recto.

Estadio IVB: el cáncer se diseminó hasta otras partes del cuerpo, como el hígado, los pulmones, los huesos ó ganglios linfáticos distantes (8).

## APOPTOSIS

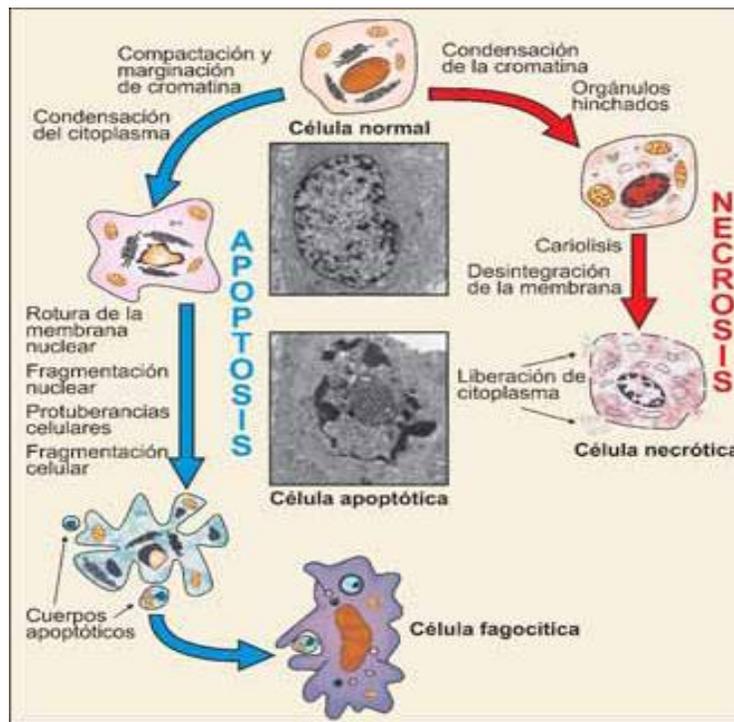
En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) ó a la inactivación de genes supresores (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo si el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular. Pero un cáncer se define no sólo por la inmortalización de las células sino también por la capacidad invasora local y a distancia (Jun-jie Liu et al 2011).

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en la fase G0 ó de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G1 (gap 1) ó de presíntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G2 (gap 2) ó de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses ó años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “arrestadas” en G0 durante años (Burgués Gasió 2005). Las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, bien para poder ser reparado, ó bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy extenso. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del ADN.

La apoptosis es la forma fisiológica de muerte celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas ó dañadas. Morfológicamente, la diferencia con la necrosis que es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo y que es originada por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica ó condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, y se deterioran las estructuras celulares, además de que se paralizan algunas funciones críticas para la vida. ( Lizarbe Iracheta 2007)

La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias. (Fernandes Alnemri et al 1994).

En la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (Burgués Gasión 2005). El volumen celular total se reduce, la célula se encoge y se hace más densa, los organelos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata, pero las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales. A continuación se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que se denominan cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos, estos procesos se encuentran descritos en la figura 3.



**Figura 3.** Esquema comparativo de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis, se observa también. En las micrografías se compara el núcleo de una célula normal (parte superior) con el de una célula en la que se ha iniciado el proceso de apoptosis (parte inferior). "Tomado de LIZARBE IRACHETA", 2007.

Al mismo tiempo se producen una serie de procesos bioquímicos que activan una serie de endonucleasas dependientes de Ca y Mg que cortan el ADN genómico por espacios internucleosomales que generan fragmentos de ADN en un rango de 180-200 pb. Por otra parte, se produce una pérdida del potencial mitocondrial, así como una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática: los residuos de fosfatidilserina que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana celular, aparecen también en la cara externa de la misma (Willis y Adams 2005).

Este hecho permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por efectores de muerte celular como las caspasas (cisteína-proteasas). Las señales apoptóticas, tanto intracelular como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La primera etapa del proceso de apoptosis es caracterizada por recibir estímulos ya sean internos ó externos a las células. La siguiente fase comprende la detección de esta señal y la transducción de la misma mediante vías que envían la señal a la maquinaria efectora de la muerte celular. La tercera fase es la fase efectora en la que están implicados las proteasas que activan la apoptosis, así como sus reguladores positivos y negativos. Y finalmente la fase en la que se produce la condensación de la cromatina y la degradación del ADN (Vogelstein y Kinzler 2004).

## **PROTEÍNAS PROAPOPTÓTICAS Y ANTIAPOPTOTICAS**

### **Familia de proteínas Bcl-2**

La familia de proteínas Bcl-2 han sido consideradas como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico. Inicialmente, Bcl-2 fue identificada como producto del oncogén bcl-2 siendo uno de los miembros de una familia de moléculas pro y antiapoptóticas (Bras et al, 2005). En humanos se conocen más de 20 miembros de esta familia. Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembranal (Vogelstein y Kinzler 2004).

Parecen tener localizaciones subcelulares diferentes ya que mientras que los miembros antiapoptóticos suelen estar como proteínas integrales en las membranas del núcleo, del retículo endoplásmico y fundamentalmente de la mitocondria, los proapoptóticos se encuentran en el citosol ó asociados con el citoesqueleto (Danial y Korsmeyer 2004). Los miembros de Bcl-2 se caracterizan por que poseen al menos uno de los dominios de homología de Bcl-2 conocidos como dominios BH llamados BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales corresponden a segmentos de  $\alpha$ -helice. Según estos criterios la familia se divide en tres subfamilias, los cuales se pueden clasificar en tres grupos: (Bras et al, 2005).

1) Miembros “anti-apoptóticos”: como su nombre indica, interfieren en la ejecución de la ruta apoptótica mediante su unión a los miembros pro-apoptóticos descritos a continuación. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bfl-1 y Bclw. Bcl-2 es la proteína que da nombre a esta familia. El gen Bcl-2 fue descrito como un proto-oncogén que se activa como resultado de una translocación cromosómica que aparece en linfomas foliculares humanos de células B, de aquí el origen del nombre de Bcl-2 (linfoma de células B). Bcl-2 se encuentra anclado en la membrana nuclear, en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana externa mitocondrial (Bortner y Cidlowski 2002). Mcl-1 se presenta en el citosol. Las proteínas Bcl-xL y Bcl-w son citosólicas y tras la señal citotóxica que induce un cambio conformacional sobre ellas, se unen fuertemente a membrana (Annan et al, 2003).

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

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

activación. Las proteínas Bad, Bik y Noxa interaccionan con Bcl-2 y Bcl-xL impidiendo de esta manera su acción como inhibidores de la apoptosis (Annan et al, 2003; Willis y Adams 2005).

## IAPs

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

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

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

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

Estas proteínas inhiben la ruta extrínseca a través de su capacidad de unirse a TRAF2 y de ubiquitinizarse proteínas, induciendo su degradación. Y sólo XIAP tendría capacidad de inhibir caspasa -3 y -7 a través de interacción directa (Verhagen et al, 2000).

## Vía intrínseca de señalización de apoptosis

La vía mitocondrial ó intrínseca es activada por estrés intracelular, como por ejemplo el iniciado por daño al ADN ó el desensamblado de microtúbulos. Por diversas vías, estos inductores llevan a la activación de un grupo de proteínas, de la familia del oncogén Bcl-2, que se translocan a la mitocondria e inhiben a miembros antiapoptóticos de la familia y activan específicamente a dos miembros proapoptóticos: Bak y Bax. Las proteínas Bax y Bak se activan y polimerizan en la membrana mitocondrial externa. Este proceso está inhibido por las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas. La polimerización de Bax y Bak induce la formación de un poro por el que saldrán proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria. Entre los factores apoptogénicos que se liberan al citosol, se incluyen el citocromo c (Wang 2001; Kurosaka et al, 2003), un componente de la cadena de transporte electrónico, HtrA2/Omi, una proteasa mitocondrial, Smac/Diablo (Vogelstein y Kinzler 2004) (Second mitochondria derived activator of caspase) (Ahsen et al 2000), AIF (Apoptosis Inducing Factor), (Susin et al, 1999) y la endonucleasa G (Parrish et al, 2001).

AIF se transloca al núcleo, donde desencadena cambios nucleares independientes de caspasas, provocando la condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN (Hengartner 2000). La endonucleasas G induce fragmentación del ADN internucleosomales, también de un modo independiente de la activación de las caspasas. Smac/Diablo activa apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis, las proteínas IAPs. HtrA2/Omi también actúa uniéndose a las proteínas IAP e inhibiendo su acción. Esta activación lleva, a la liberación de diversas proteínas apoptóticas al citosol, entre las que destacan citocromo c y Diablo. El primero forma un complejo con la proteína APAF1 y dATP que recluta a la caspasa 9. Este complejo, denominado apoptosoma, induce la activación de esta caspasa iniciadora que a su vez corta a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, cuya función final es el corte específico de una multitud de sustratos celulares que culminan con la muerte celular apoptótica representada en la figura 4 (Meléndez y Ceballos 2008).

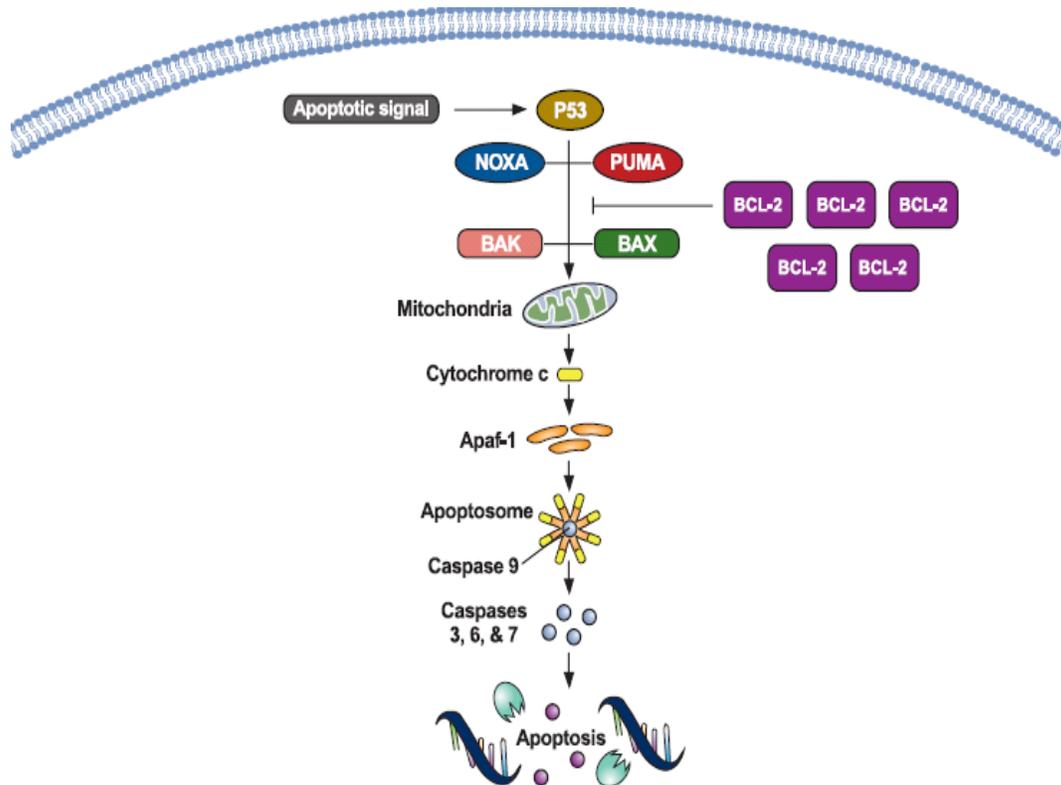


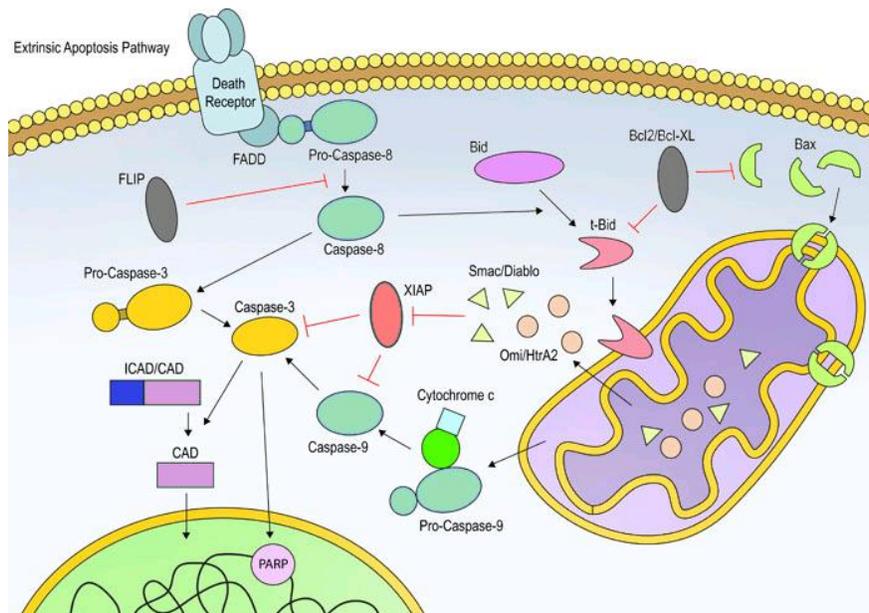
Figura 4. Vía intrínseca de señalización del proceso de apoptosis "tomado de Gentech 2011".

## Vía extrínseca ó de los receptores de muerte

Los receptores de muerte pertenecen a una superfamilia de receptores relacionados con fenómenos de proliferación, diferenciación y apoptosis denominada Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Estos receptores son proteínas integrales de membrana, la mayoría de tipo I, es decir, con un solo dominio transmembranal, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular (Strasser et al, 2000). Los receptores muerte tienen acción pleiotrópica, es decir, dependiendo del tipo celular y otras señales que la célula recibe pueden, iniciar proliferación, diferenciación ó muerte celular (Bhardwaj y Aggarwal 2003). Los miembros de la familia del TNFR son diversos en su estructura primaria pero todos poseen un dominio extracelular conservado rico en cisteínas (que es el que permite el reconocimiento selectivo del ligando (Naismith y Sprang 1998), una región transmembranal y una región intracelular conservada de unos 80 aminoácidos llamado dominio de muerte (DD). A través del DD se podrán reclutar las proteínas adaptadoras para el inicio de la señalización apoptótica (Curtin J y Cotter 2003).

La vía extrínseca ó de los receptores de muerte establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior de las célula y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: Fas-R (receptor para la proteína Fas) y el TNF-R (receptor para el factor de necrosis tumoral).

La proteína transmembranal Fas que su porción intracelular se une con un factor intermedio denominado FADD (factor asociado al dominio de muerte), Fas que participa activando las caspasas 8 y 1. Esta vía de Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con el cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en la que solo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparada para recibir el enlace exterior este proceso se encuentra representado en la figura 5. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.



**Figura 5.** Vía extrínseca del proceso de apoptosis "tomado de Gentech2011".

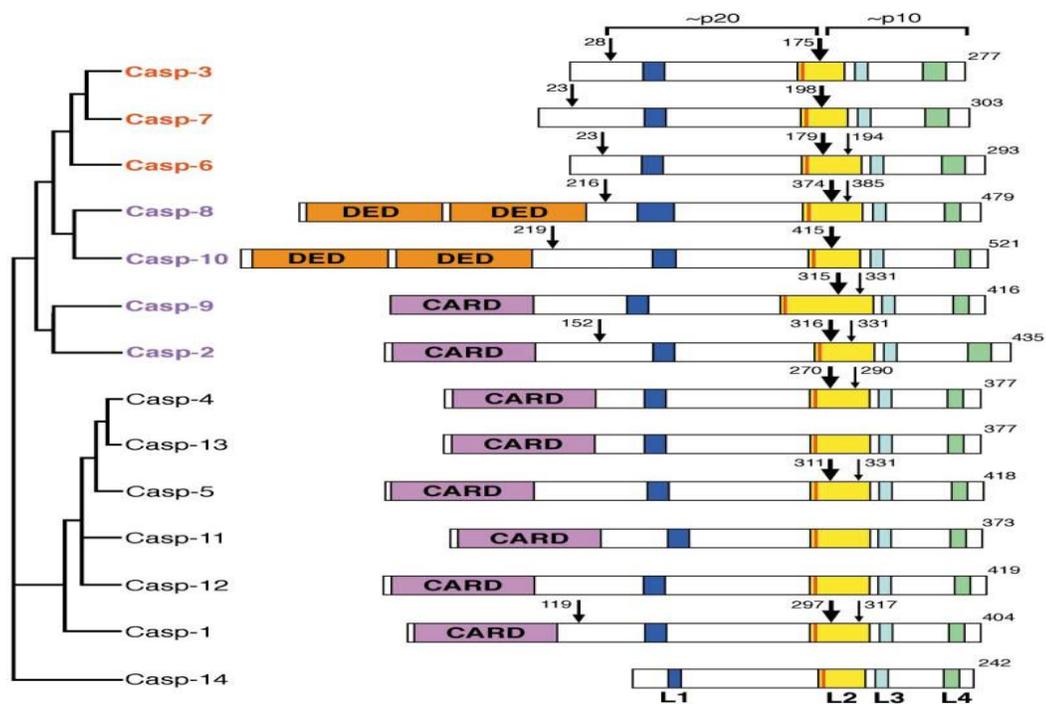
Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd (TNF receptor asociado al dominio de muerte) y Raidd (receptor del dominio de muerte asociado a interleucina) que activan a las caspasas iniciadoras de la apoptosis (Ghosh Y Baltimore 1990).

## CASPASAS

Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras como se muestra en la figura 6. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos ó mediante adaptadores/activadores (14). Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Entre éstos se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción. Las caspasas representan un nuevo paradigma de la transducción de la señal y se encuentran implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos.

Las procaspasas son una familia de cisteína-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. Las procaspasas constan de un predominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10. A la fecha las caspasas más estudiadas son la -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 y -10. Tomando en cuenta la estructura primaria, determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de Rayos X, se pueden agrupar en dos clases: pertenecen a la clase I las procaspasas que tienen un predominio N-terminal grande, como las procaspasas-1, -2, -8, -9 y -10 (Inna et al, 2005). En las procaspasas de clase II el predominio N-terminal es pequeño o carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas-3, -6, -7. Los predominios de las procaspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos. Estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico. Todas estas moléculas constan de 6 alfa hélices anfipáticas y antiparalelas las cuales están muy empaquetadas formando un centro hidrofóbico originando interacciones hidrofóbicas entre los DEDs (dominio efector de muerte) e interacciones electrostáticas entre los CARDs (dominio reclutador de caspasas). La auto activación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico. En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN (Inna et al 2005).

En el caso de la formación del DISC (complejo de iniciación de señalización de muerte), los receptores membranales para factores de muerte se caracterizan porque poseen, en el extremo intracelular, una secuencia llamada dominio de muerte (DD) la cual sirve de unión a diversas proteínas adaptadoras que finalmente causan la activación de las caspasas (Fuentes-Prior y Salvesen 2004). En todos los casos las interacciones de las procaspasas con los adaptadores que se conocen a la fecha están mediadas por dominios específicos que se repiten en los prodominios de las procaspasas, en las caspasas, en los adaptadores, en las cinasas y en los dominios asociados a los receptores de muerte. La activación de los receptores de muerte es consecuencia de la unión de su ligando, que induce la transmisión de una señal, a través del dominio transmembranal, al dominio citoplásmico del receptor.



**Figura 6.** Se puede observar la familia de las caspasas clasificados en dos grupos principales las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras o ejecutoras marcadas en púrpura y naranja respectivamente, "tomado de Yigong Shi 2002"

Este sufre un cambio conformacional que favorece su fosforilación por una de las cinasas asociada a ese receptor, que a su vez fosforila al o a los adaptadores FADD (dominio de muerte asociado a Fas), TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR) ó TRAFs (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), para activar a la procaspasas 8 y 10 y así iniciar la cascada de caspasas activas. A pesar de que las caspasas son muy similares, existen diferencias en sus mecanismos de activación que se demuestran por el tipo de adaptador. Así, las caspasas 1 y 2 son capaces de oligomerizarse en concentraciones elevadas sin la intervención de un adaptador, en cambio la caspasa-8 requiere del adaptador FADD y la caspasa-9 de APAF-1 (Yigong Shi 2002).

### **CASPASA 3**

La caspasa 3 es una de las principales ejecutoras de la apoptosis, la cual es responsable, ya sea parcial o totalmente en la ruptura proteolítica de muchas proteínas importantes, como la enzima polinuclear (ADPribosa), de la polimerasa PARP, proteína clave durante la apoptosis.

Es probablemente la mejor entendida de las caspasas de mamíferos en los términos de su especificidad y su papel en la apoptosis. Caspasa 3 también es necesaria para algunas características típicas de la apoptosis, y es indispensable para condensación de la cromatina apoptótica y la fragmentación del ADN. Caspasa 3 está ampliamente distribuida, con una alta expresión en los linajes celulares linfoides, lo que sugiere que puede ser un mediador importante de la apoptosis en el sistema inmunológico (Strasser 2000).

### **CITOCINAS**

Se denomina genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular, a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas, que sintetizan las células del sistema inmune, los productores mayoritarios de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T, ya que actúan como los principales reguladores de la respuesta inmune innata y específica, respectivamente en respuesta a los patógenos ó sus productos, ó a otras señales relacionadas.

La secreción de las citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado, en general las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia con una nueva transcripción. Pueden influir en la síntesis y la activación de otras citocinas. La acción de estas citocinas a menudo son pleiotropicas y redundantes. Inician su acción uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana. Las acciones de las citocinas pueden ser locales ó sistémicas. La mayoría de las citocinas actúan cerca del lugar donde son producidas, en una célula próxima ó bien en la misma célula que la secreta, cuando se producen en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar en la circulación y actuar a distancia del sitio de producción. Se pueden incluir como citocinas las interleucinas (que se suelen enumerar como IL-1 a IL-18), los interferones, los factores estimuladores de colonias (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), el factor de necrosis tumoral, los factores de crecimiento (NGF, EGF) y las quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1). (Sarah et al, 2010)

## **INTERLEUCINA 2 (IL-2)**

IL-2 es producida por los linfocitos T CD4+ y, en menores cantidades, por las células T CD8+. La activación de las células T por antígenos y coestimuladores estimula la transcripción del gen de la IL-2 y la síntesis y secreción de esta proteína. La producción de la IL-2 es transitoria, con una secreción máxima de 8 a 12 horas después de la activación (Fainboim 2005). IL-2 secretada es una glucoproteína de entre 14 y 17 KD que esta plegada formando una proteína globular que consta de cuatro hélices  $\alpha$ . Representa el prototipo de las citocinas de cuatro elices  $\alpha$  que interaccionan con los receptores de citocinas tipo I.

Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune, teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T, B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas). Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, linfoxina, IL-4, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II (Sarah et al, 2010).

Se ha estudiado el efecto de IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer cérvicouterino (CaCu) CALO e INBL pudiendo aclarar que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de estas líneas celulares se puede inhibir la proliferación en presencia de (100 UI/mL) de IL-2 exógena, sin embargo, en presencia de 5-10 UI/mL de IL-2 podemos inducir la proliferación de estas mismas células tumorales (Alvarado 1997; Rocha-Zavaleta et al, 2004).

Por otra parte, IL-2 es utilizada sola ó en combinación en inmunoterapia tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados, ha mostrado una modesta respuesta antitumoral, pero su aplicación vía sistémica perturba vías de regulación hematopoyética importantes y puede provocar serios efectos secundarios, por lo cual su uso es limitado. Algunas citocinas entre ellas IL-2, IL-11, el factor transformador del crecimiento (TGF beta) estimulan la proliferación, mientras que otros (IL-12, IL-18). Los interferones (IFNs) inhiben la misma en cáncer de mama. Hasta ahora, la IL-2, IFNalfa, IFNbeta y ocasionalmente IFNgamma, IL-6, IL-12 se han utilizado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado ó bien para inducir ó aumentar la sensibilidad hormonal y para estimular la inmunidad celular. Si esta inmunoterapia prolonga la supervivencia de los pacientes con cáncer de mama metastásico, IL-2 e IFNbeta también puede ser evaluado como tratamiento adyuvante de pacientes con receptores estrogénicos positivos (Carpi et al, 2000).

El melanoma maligno es una enfermedad muy letal a menos que se detecte en un estadio temprano. Un solo agente dentro de la quimioterapia es bien tolerado, pero se asocia con tasas de respuesta muy bajas. La quimioterapia en combinación con inmunoterapia puede mejorar las tasas de respuesta objetiva, pero no prolongar la supervivencia y se asocian con una mayor toxicidad. Los enfoques inmunoterapeúticos como altas dosis de interleucina 2 se asocian con respuestas duraderas en un pequeño porcentaje de los pacientes, pero no son prácticos para muchos pacientes debido a la accesibilidad y la toxicidad de la misma (Tawbi y Nimmagadda 2009, Rangel-Corona et al, 2010).

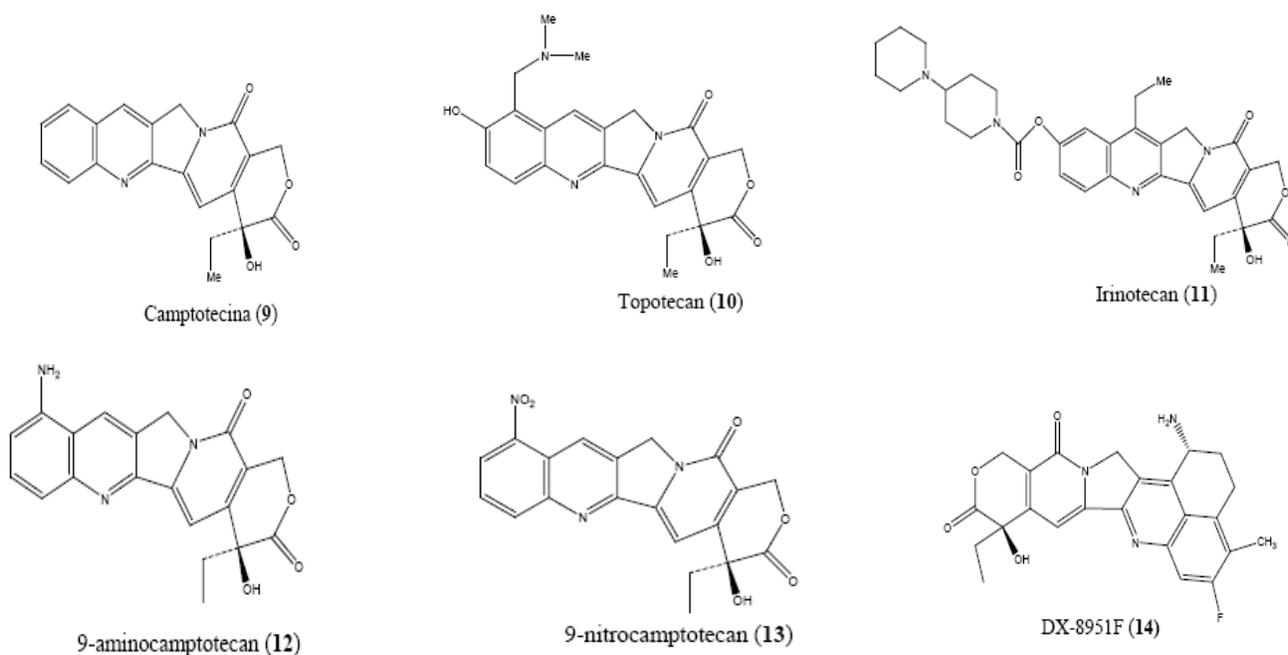
## CAMPTOTECINA

La camptotecina se aisló de *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino. Los extractos de *C. acuminata* se investigaron en la década de 1950. Como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona y fue al azar que se decidió evaluar la actividad antitumoral (Wall et al, 1996). El primer reporte de actividad antitumoral fue generado por los estudios realizados en el NCI, y el principio activo resultó ser la camptotecina (Hsiang et al, 1985). Los estudios clínicos de fase I, empleando la sal sódica de la camptotecina, se realizaron a los inicios de 1970, pero pronto fueron suspendidos debido a la severa toxicidad. En de 1985 se revivió el interés debido al novedoso mecanismo de acción que involucra a la enzima Topoisomerasa I (Topo I). A partir de estos estudios se realizaron modificaciones químicas a la camptotecina obteniendo el topotecan el cual se aprobó en los Estados Unidos de Norteamérica en 1996 para el tratamiento de cáncer de ovario (Fan et al, 1998). Otras modificaciones básicas de la camptotecina produjeron al irinotecan, clínicamente investigado como CPT-11, al 9-aminocamptotecina y 9 nitro-camptotecina (13). El uso del irinotecan se inició en 1994 en Japón y en 1996 fue aprobado en EEUU para el tratamiento del cáncer colorrectal, ovario, y pulmón (Shu 1998).

La 9-aminocamptotecina (9-AC) es un agente muy potente, pero su aplicación en la clínica se atrasó debido a los problemas de solubilidad, mismos que ya se resolvieron y actualmente la 9-AC está en fase II. Otro de los derivados de la camptotecina es el DX-8915F, el cual se encuentra en fase I en EEUU, tiene una potencia mayor que irinotecan y topotecan y también actúa sobre la topoisomerasa I. La Topo I es una enzima que tiene la capacidad de “relajar” el ADN muy enrollado durante la transcripción ó replicación.

La Topo I es un blanco muy atractivo ya que se ha encontrado que los niveles de esta enzima son más altos en los tumores malignos que en los tumores benignos ó tejidos normales (Husain et al, 1994). La camptotecina y sus análogos (CPTs) actúan al enlazarse con los aductos ADN-Topo I, lo que estabiliza el complejo divisible ADN-Topo I evitando la liberación del ADN y provocando la acumulación de complejos divisibles estabilizados.

La formación del complejo ternario entre la CPTs-Topo I-ADN provoca la inhibición de la síntesis del ADN y ARN y la exposición prolongada a CPTs conduce a un daño irreparable en el ADN y por lo tanto provoca la muerte celular por apoptosis generalmente por la activación de las caspasas (Yigong 2002). Las células en fase S son muy sensibles a las CPTs, posiblemente porque la replicación del ADN requiere la actividad de la Topo I asociada con la separación de las bandas del ADN y la conversión en la doble banda. Las estructuras químicas de la camptotecina y sus derivados se muestran en la Figura 7.



**Figura 7.** Compuestos derivados de camptotecina (9), topotecan (10), irinotecan (11), 9-aminocamptotecan (12), 9-nitrocamptotecan (13), DX-8951F (14). "tomado de Hulya Ulukan and Peter W. Swaan 2002".

## JUSTIFICACIÓN

Cada año se diagnostican 500, 000 nuevos casos de cáncer cérvicouterino (CaCu) en el mundo. En América Latina se reportan 68, 000 casos al año, las tasas más altas corresponden a Chile y México y las más bajas a Cuba, Puerto Rico y Argentina. En México, anualmente se registran 4,000 muertes. En el 2005 se reportaron 4,270 casos por cada 100,000 mujeres (Floriano-Sánchez 2010 Ministerio de Salud 2004). El grupo más afectado es el de 35 a 64 años de edad y representa la primera causa de mortalidad en tumores ginecológicos. La mayoría de las mujeres que desarrollan este cáncer tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin embargo, cada vez es más común ver mujeres, en edades de 20 y 30 años las cuales son diagnosticadas con cáncer cérvicouterino, sin embargo, es una enfermedad totalmente curable si es detectada a tiempo (Parkin et al, 1997).

Para las pacientes en las que el cáncer es detectado en estadios avanzados se intentan desarrollar tratamientos alternativos como lo es el uso de citocinas, con respecto a esto en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer se han obtenido resultados favorables in-vitro con respecto a la proliferación de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino, debido a que se encontró que a bajas concentraciones de IL-2 (10UI/mL) se estimula la proliferación celular y en altas concentraciones (100UI/mL) de la citocina induce la muerte celular, que puede llevarse a cabo por vía apoptótica en la que gran parte de este proceso esta mediado por las caspasas. Por lo ya mencionado el objetivo de este trabajo tiene como finalidad determinar si IL-2 regula la expresión de caspasa 3 en las líneas celulares de CaCu denominadas CASKi, CALO, INBL y SIHA, además de determinar la muerte celular es por la inducción de cualquier vía de apoptosis debido a la presencia caspasa 3 que es una caspasa efectora y es un indicador de este proceso.

## **HIPÓTESIS.**

Utilizando la técnica de citometría de flujo con anticuerpos específicos para caspasa 3 sabremos si las células cultivadas en presencia de IL-2 regulan la expresión de esta proteína en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino: CASKI, CALO, INBL y SIHA.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la regulación de la expresión de caspasa 3 producida por IL-2 en líneas celulares de cáncer cérvicouterino (CaCu) CASKI, CALO, INBL, SIHA.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Realizar el cultivo celular de las líneas de cáncer cérvicouterino CASKi, CALO, INBL Y SIHA en presencia de IL-2.

Evaluar la expresión de caspasa 3 por de citometría de flujo: analizar y comparar los resultados.

Comparar los resultados obtenidos en función del estadio clínico y el tipo de virus de papiloma (HPV) por el cual están infectadas estas líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKi, CALO, INBL Y SIHA.

## MÉTODO

### Material biológico

Las líneas celulares de cáncer cérvicouterino (CaCu) con las que se desarrollo este trabajo se muestran en tabla 2 y fueron obtenidas del laboratorio de oncología celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea celular	Estadio clínico	HPV
<b>CASKI</b>	carcinoma epiteloide estadio IV B	16
<b>INBL</b>	carcinoma epiteloide estadio IV B	18
<b>CALO</b>	carcinoma epiteloide estadio II B	18
<b>SIHA</b>	carcinoma escamoso estadio II B	16

**Tabla 2.** Características de las líneas celulares de CaCu (CALO, CASKI, INBL, SIHA). (Rivory 1995; Kreimer et al, 2005)

### Condiciones de cultivo y proliferación de las líneas celulares

Las líneas celulares de CaCu, CASKi, CALO, INBL y SIHA se cultivaron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> con 5mL de medio de cultivo RPMI-1640 (MICROLAB) adicionado con 10% de SFB (suero fetal bovino) (GIBCO), mantenidos en una incubadora (FORM SCIENTIFIC USA) con las siguientes condiciones, 37°C de temperatura y pH de 7.0-7.2 y en una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO<sub>2</sub>, estas células se incuban durante 2 ó 3 días aproximadamente, tiempo suficiente para que estas proliferen y se tenga la cantidad de células necesarias para la estimulación con interleucina 2 recombinante humana (IL-2) (R&D SYSTEM) y con el fármaco camptotecina.

## Cultivo en presencia de IL-2

Se partió de un millón de células para cada una de las líneas celulares de (CaCu), se evalúa la viabilidad de las líneas celulares, determinado por exclusión con azul de tripano (SIGMA), a través de una cámara de Neubauer (AMERICAN OPTICAL, USA), estas se trasladan a una caja petri con medio de cultivo RPMI-1640, en ausencia de suero fetal bovino para sincronizar nuestras células por 24hr.

El siguiente paso fue cultivar las células previamente sincronizadas para que los cultivos partan del mismo punto del ciclo celular (G1), las células en presencia ó ausencia de IL-2. Las células cultivadas en presencia de IL-2 tendrán una concentración de (100 UI/mL), durante 24 hrs. Por otra parte se cultivaron células en presencia de camptotecina que funcionó como un control positivo de esta técnica.

## Citometria de flujo

Al terminar el tiempo de estimulación se realizan 3 lavados a las células con PBS estéril y filtrado, después se fijaron las células con etanol al 70% durante 20 minutos a 37°C en incubación, se realizan tres lavados nuevamente con PBS, enseguida se incuban las células con el anticuerpo primario (Purified anti-Caspase 3) (BioLegend) durante toda la noche a 4 °C en la siguiente concentración (1:1000mL).

Nuevamente se realizan 3 lavados con PBS/TWEEN al 1.1%, el siguiente paso es incubar el anticuerpo secundario conjugado con FIT-C en una concentración (1:500ml) (SIGMA) en incubación por 45 minutos 37°C. El siguiente paso es realizar 3 lavados 2 con PBS/TWEEN 1.1% y el ultimo con PBS, finalmente se colocan las células en 500mL de PBS filtrado en una celda para obtener la lectura en el citómetro de flujo y se analizaron 10 000 eventos para cada una de las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKI, CALO, INBL Y SIHA en las diferentes condiciones de cultivo; en presencia de IL-2, camptotecina y células control (sin estímulo).

La citometria de flujo permite evaluar características físicas y químicas de células en suspensión. Entrega información sobre el tamaño celular, la granularidad ó complejidad interna, así como también la intensidad de fluorescencia relativa que poseen las células.

El principio básico de la citometría de flujo, es la interacción de una fuente de luz, específicamente un rayo laser, con células en suspensión, las cuales son canalizadas individualmente por el laser, adquiriendo la información de esta interacción. De este modo, es posible la medición de un gran número de células, en forma individual y en un periodo muy corto de tiempo mientras se desplazan en un sistema de flujo ó torrente líquido. Cada una de las células pasa por un punto donde son impactadas por un laser que emite fluorescencia a una longitud de onda dependiente a cada tipo de laser y cuya luz es desviada ó alterada de acuerdo a características propias de cada célula.

La variación de la longitud de onda producida, es captada y depurada por un complejo sistema de lentes y espejos, que concentran esta luz y la transforman en pulsos de voltaje, que son codificados e interpretados por un computador provisto del programa adecuado. Los datos obtenidos de esta manera pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran confiabilidad y exactitud.

La interacción de la célula con la luz del laser (light scattering), puede producir la desviación de esa última, en un ángulo menor a 10 grados, lo que se conoce como dispersión frontal ó FSC (forward scatter) y la desviación de la luz en más de 10 grados, pero en menos de 90, se conoce como dispersión lateral ó SSC (side scatter). Es así como FSC y SSC son parámetros intrínsecos a la célula. Si a la suspensión celular se agrega un fluorocromo que tenga afinidad por algún componente celular y que además este fluorocromo sea excitable con el rayo laser en uso, se podrá detectar un cambio en la longitud de onda de emisión del fluorocromo, esto se traducirá en formaciones de rangos canales de fluorescencia, la cual es detectada, facilitando la identificación de subgrupos específicos dentro de las grandes poblaciones celulares. Estas moléculas fluorescentes pueden estar acopladas a anticuerpos específicos en solución. Por ejemplo, la fluoresceína que es ampliamente usado tanto en microscopia de fluorescencia como en citometría de flujo y tiene una excitación máxima a 490 nm, siendo su emisión máxima a 520 nm.

## RESULTADOS

Con la finalidad de estudiar el efecto de IL-2 sobre la regulación de la expresión de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino (CaCu); CASKI, CALO, INBL y SIHA. Se realizaron cultivos por 24 h de las líneas celulares en presencia de IL-2. La evaluación de la presencia de caspasa 3 se realizó por citometría de flujo, la determinación de esta caspasa es importante ya que se trata de una de las caspasa ejecutora de la muerte por apoptosis. Asimismo, para contar con un control positivo de nuestros experimentos. Se cultivaron células de las diferentes líneas de CaCu en presencia de camptotecina, se utilizó este fármaco ya que existen numerosas publicaciones que la describen como un potente activador de apoptosis (Fernández Herrera et al, 2010 ; Liu et al, 2000). Como control negativo se cultivaron células en ausencia de IL-2. La evaluación se realizó por citometría de flujo adquiriendo 10 000 eventos en cada experimento.

### **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de cáncer cérvicouterino (CaCu) CASKI**

En la línea celular CASKI los resultados muestran que el 9520 de las células cultivadas en ausencia de IL-2 tienen una intensidad de fluorescencia (IF) de 48.30% (Figura 8a), 8510 de las células del control positivo, cultivadas con camptotecina muestran una IF de 62.50 % con respecto al control (Figura 8b). Para el caso de las células cultivadas en presencia de IL-2 observamos que el 9510 de ellas se observa una IF de 53%, muy similar a la obtenida para las células cultivadas en presencia de camptotecina (Figura 8c). En la figura en la que se observa el traslape de histogramas obtenidos para las diferentes condiciones de cultivo de las células CASKI, muestran un incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, sin embargo se aprecia un leve incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina en comparación a las células estimuladas con IL-2 (Figura 8d). En la (Figura 8e), se observa un gráfico de IF para las 3 condiciones de cultivo. Finalmente, la IF del control interno de la técnica es semejante a la del control (Figura 8f).

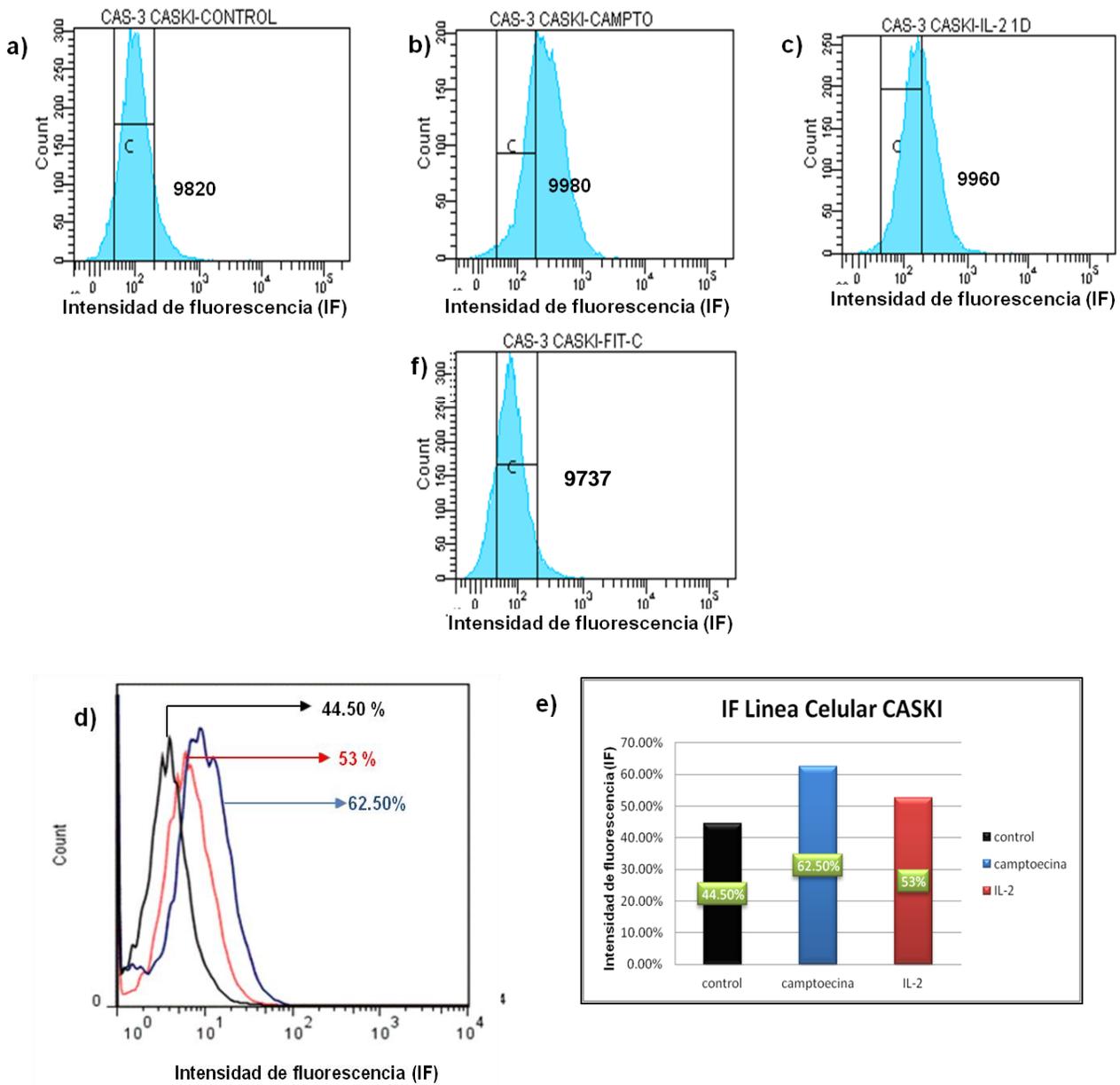


Figura 8. **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de CaCu CASKI.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): células en ausencia de IL-2; b): células cultivadas con camptotecina (control positivo); c): células cultivadas con 100 UI/ml de IL-2; d): Traslape de histogramas obtenidos para las 3 condiciones de cultivo. e) intensidad de fluorescencia en las diferentes condiciones de cultivo. Es evidente el incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina en comparación al control, sin embargo se aprecia un mayor incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina. (e): grafico de IF para las diferentes condiciones de cultivo. (f) células control de anticuerpo secundario FIT-C.

### **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de (CaCu) CALO**

Los resultados indican que 9730 de las células CALO cultivadas en ausencia de IL-2 tienen una intensidad de fluorescencia (IF) de 42.70 % (Figura 9a). Por su parte, 9410 de las células del control positivo, cultivadas con camptotecina muestran un aumento considerable de la IF a 60.90 % con respecto al control (Figura 9b). Para el caso de las células cultivadas en presencia de IL-2 observamos que el 9600 de ellas muestran una IF del 55%, muy similar a la obtenida para las células cultivadas en presencia de camptotecina (Figura 9c). Por otra parte la figura que muestra el traslape de histogramas obtenidos para las diferentes condiciones de cultivo de las células CALO, muestran el incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, además revela que estos histogramas son muy similares (Figura 9d). Se observa un grafico de IF en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 9e). Finalmente, la IF del control interno de la técnica es semejante a la del control (Figura 9f).

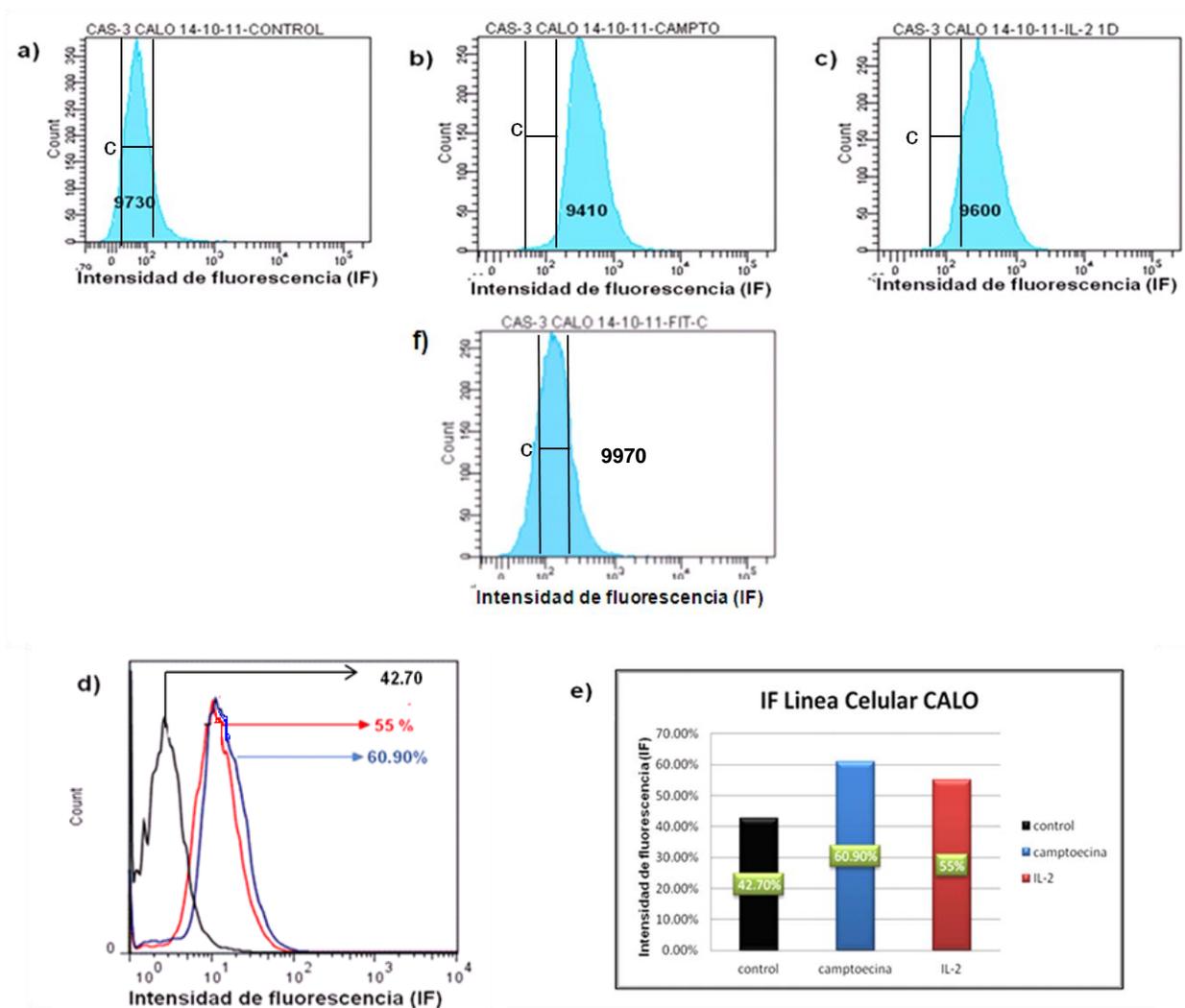


Figura 9. **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de CaCu CALO.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): células en ausencia de IL-2; b): células cultivadas con camptotecina (control positivo); c): células cultivadas con 100 UI/ml de IL-2; d): Traslape de histogramas obtenidos para las 3 condiciones de cultivo y, e): Grafico de (IF) de las diferentes condiciones de cultivo. Es evidente el incremento en la intensidad de fluorescencia para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control. (e): grafico de IF de las diferentes condiciones de cultivo. (f) células control de anticuerpo secundario FIT-C.

## Expresión de caspasa 3 en células de la línea de cáncer cérvicouterino (CaCu) INBL

En la línea celular INBL los resultados muestran que el 9820 de las células cultivadas en ausencia de IL-2 de la línea celular INBL tienen una intensidad de fluorescencia (IF) de 46.20% (Figura 10a). Por su parte, 9980 de las células del control positivo, cultivadas con camptotecina muestran un aumento de la IF a 54.70 % con respecto al control (Figura 10b). En el caso de las células cultivadas en presencia de IL-2 observamos que el 9960 de ellas se observa una IF de 53.20 %, muy similar a la obtenida para las células cultivadas en presencia de camptotecina (Figura 10c). En la figura en la cual se observa el traslape de histogramas obtenidos para las diferentes condiciones de cultivo de las células INBL, muestran un ligero incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, sin embargo destaca el incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina (Figura 10d). Se observa un gráfico de IF para las 3 condiciones de cultivo (Figura 10e). Finalmente, la IF del control interno de la técnica es semejante a la del control (Figura 10f).

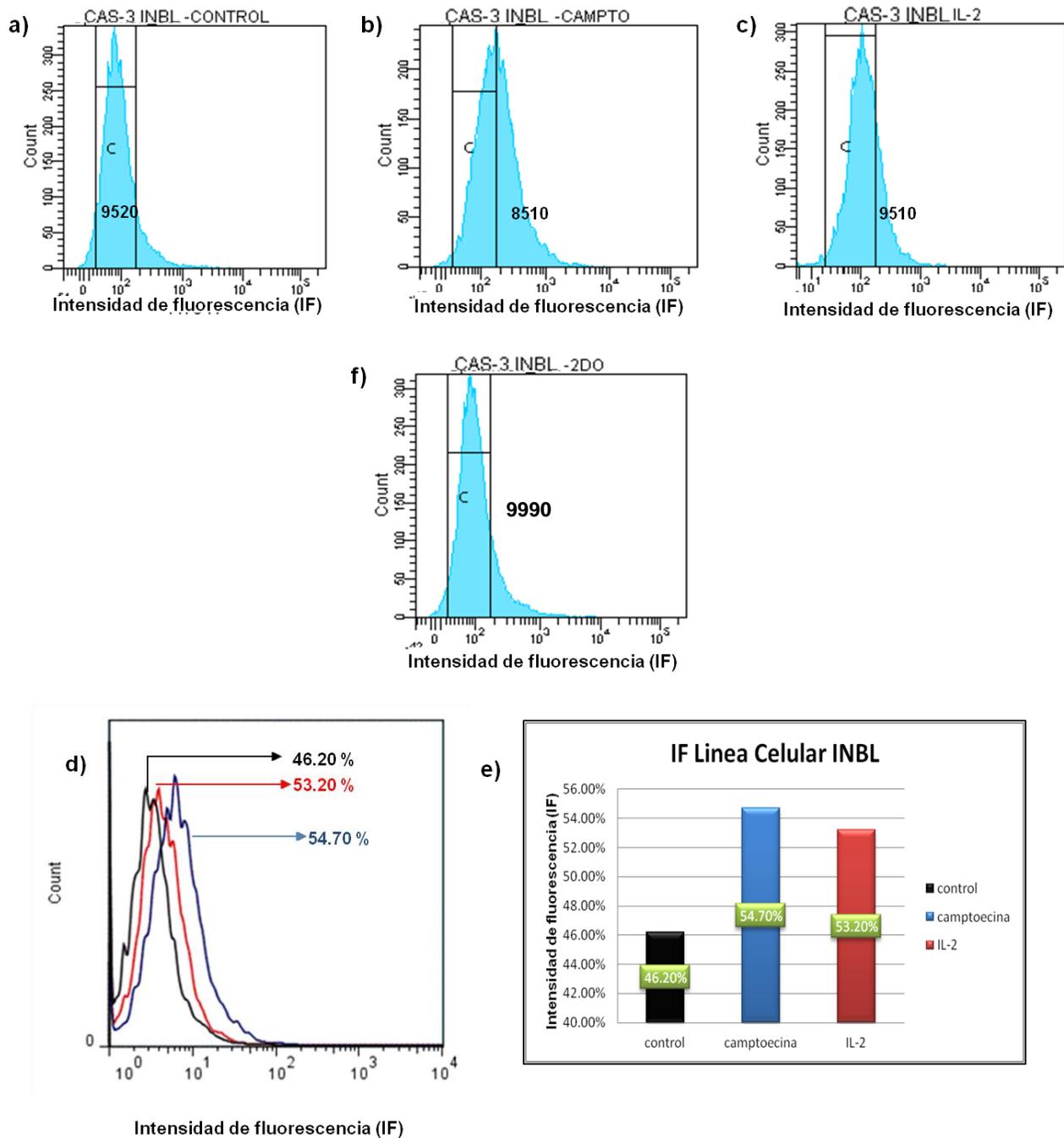


Figura 10. **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de CaCu INBL.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): células en ausencia de IL-2; b): células cultivadas con camptotecina (control positivo); c): células cultivadas con 100 UI/ml de IL-2; d): Traslape de histogramas obtenidos para las 3 condiciones de cultivo. e) intensidad de fluorescencia en las diferentes condiciones de cultivo. Es evidente el incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, sin embargo existe un destacado incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina. (e): grafico de IF en las diferentes condiciones de cultivo. (f) células control de anticuerpo secundario FIT-C.

## Expresión de caspasa 3 en células de la línea de cáncer cérvicouterino (CaCu) SIHA

Los resultados de la línea celular SIHA muestran que el 9980 de las células cultivadas en ausencia de IL-2 de la línea celular INBL tienen una intensidad de fluorescencia (IF) de 49.10% (Figura 11a). Por su parte, 9970 de las células del control positivo, cultivadas con camptotecina muestran un aumento ligero de la IF a 55.30% con respecto al control (Figura 11b). Para el caso de las células cultivadas en presencia de IL-2 observamos que el 9990 de ellas se observa una IF de 52.70%, muy similar a la obtenida para las células cultivadas en presencia de camptotecina (Figura 11c). En la figura en la que se observa el traslape de histogramas obtenidos para las diferentes condiciones de cultivo de las células SIHA, muestran un ligero incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, sin embargo destaca el incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina (Figura 11d). En la (Figura 11e), se observa un gráfico de IF para las 3 condiciones de cultivo. Finalmente, la IF del control interno de la técnica es semejante a la del control (Figura 11f).

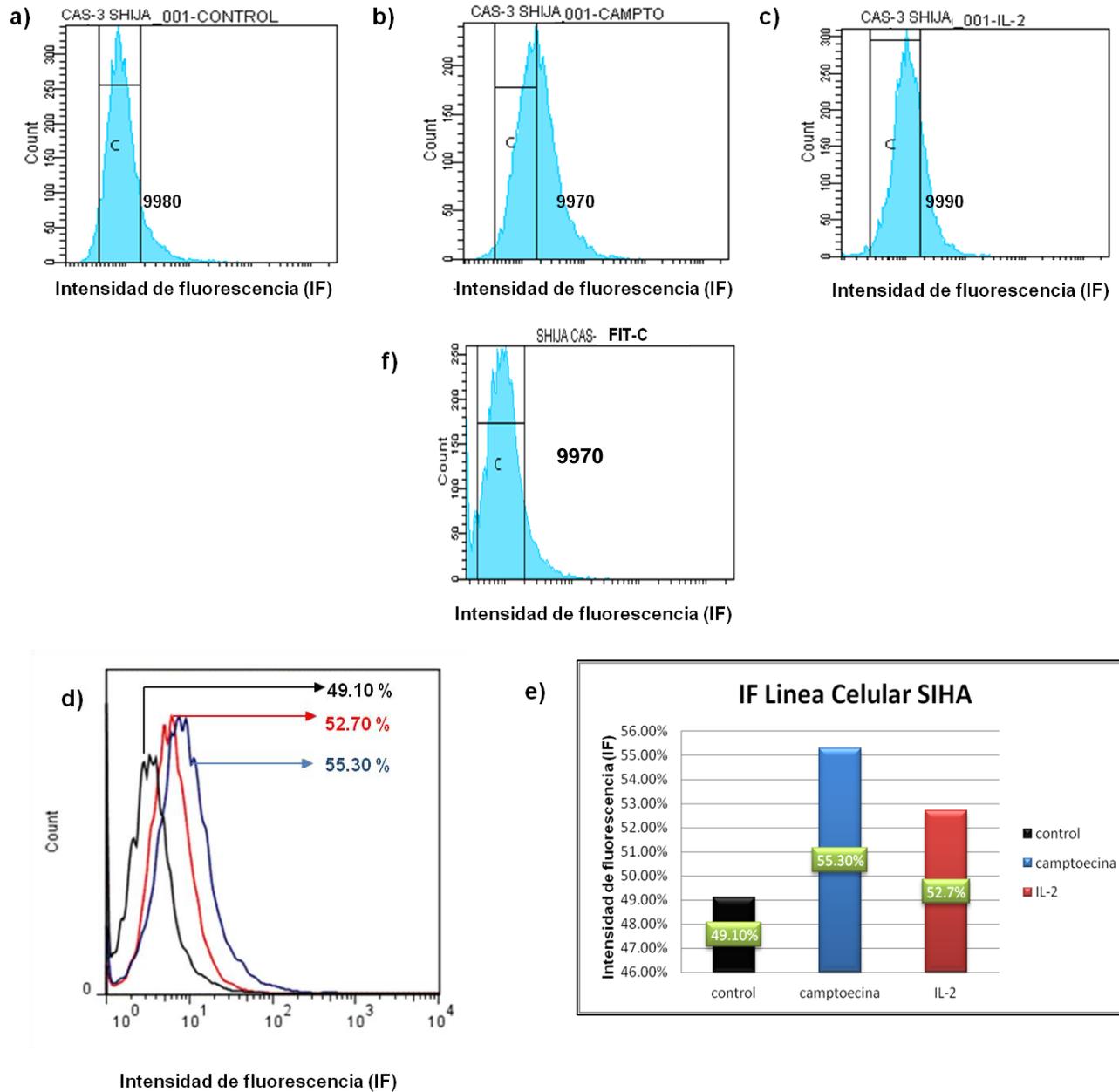


Figura 11. **Expresión de caspasa 3 en células de la línea de CaCu SIHA.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): células en ausencia de IL-2; b): células cultivadas con camptotecina (control positivo); c): células cultivadas con 100 UI/ml de IL-2; d): Traslape de histogramas obtenidos para las 3 condiciones de cultivo. e) intensidad de fluorescencia en las diferentes condiciones de cultivo. Es evidente el incremento en la IF para las células cultivadas con camptotecina e IL-2 en comparación al control, sin embargo existe un destacado incremento de la IF en las células cultivadas con camptotecina. (e): gráfico de IF en las diferentes condiciones de cultivo. (f) células control de anticuerpo secundario FIT-C.

## Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico II, CALO y SIHA

Con el propósito de determinar si la activación de caspasa 3 por IL-2 depende del estadio del tumor, se realizó la comparación de la intensidad de fluorescencia (IF) para FIT-C obtenida para las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CALO y SIHA, ambas clasificadas como estadio II. Debido a que estas provienen de un estadio clínico II que se presenta como uno de los estadios iniciales del CaCu el cual se caracteriza por presentar la localización del tumor más allá del útero y hasta en dos tercios de la vagina por lo cual es importante observar si IL-2 provoca una regulación en la expresión de caspasa 3 en células de estadio temprano.

En el caso de la IF calcula para las células de la línea CALO, cultivada en ausencia de IL-2, es de 42.70 %, mientras que en las células cultivadas en presencia de camptotecina la IF es de 60.90 % y en las células cultivadas con IL-2 es del 55 % (Figura 12a). Para las células de la línea SIHA se obtuvieron resultados similares, para las células cultivadas en ausencia de IL-2 la IF fue de 49.10 %, para las células cultivadas en presencia de camptotecina la IF es de 55.30 % y en el caso de las células cultivadas en presencia de IL-2 la IF es de 52.70 % (Figura 12b).

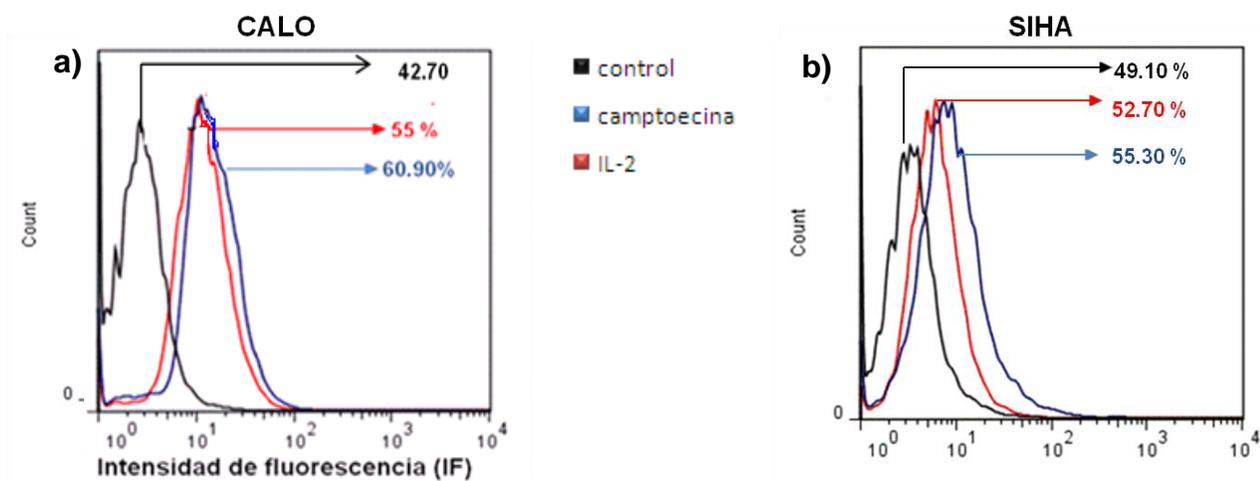


Figura 12. Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico II, CALO y SIHA. Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): traslape de histogramas de la línea celular CALO; b): traslape de histogramas en la línea celular SIHA.

## Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico IV, CASKI e INBL

Se realizó el comparativo de la IF de las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKI e INBL, con el propósito de determinar si la activación de caspasa 3 por IL-2 depende del estadio del tumor, para ello se realizó la comparación de la intensidad de fluorescencia (IF) para FIT-C obtenida para las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKI e INBL, ambas clasificadas como estadio IV de acuerdo a la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). Este estadio es el más avanzado caracterizado por la probable localización secundaria o metástasis por lo cual es importante observar si IL-2 provoca una regulación en la expresión de caspasa 3 en estas células.

La IF observada en las células de la línea CASKI cultivadas en ausencia de IL-2 es de 44.50 %, mientras que en las células cultivadas en presencia de camptotecina presentan una IF de 62.50 % y las células cultivadas con IL-2 es del 53 %, (Figura 13a). Por otra parte, en la línea celular INBL se obtuvo una IF de 46.20 % en las células cultivadas en ausencia de IL-2, las células cultivadas en presencia de camptotecina tienen una IF de 57.40 % y en el caso de las células cultivadas

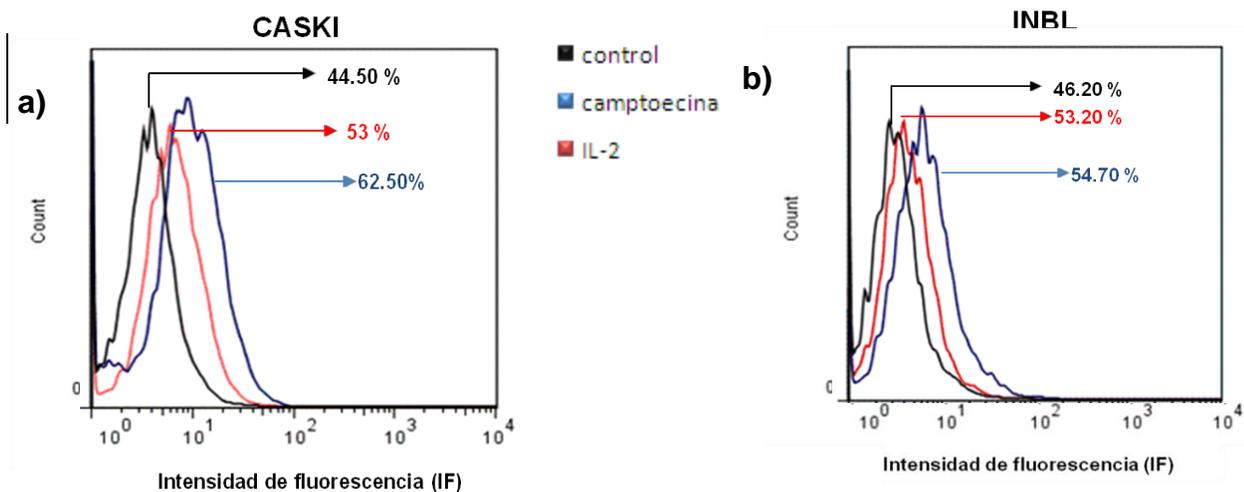


Figura 13. **Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, estadio clínico IV, CASKI e INBL.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): traslape de histogramas de la línea celular CASKI; b): traslape de histogramas en la línea celular INBL.

## Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV16+

Con el propósito de determinar si el tipo de HPV que infecta las células de las líneas de CaCu, CASKI, CALO INBL y SIHA, puede influir en la síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2 en estas células, se realizó la comparación de la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida tanto para las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CASKI y SIHA infectadas con HPV 16, como para las líneas CALO e INBL infectadas con HPV 18.

Para el caso de las células infectadas con HPV 16 no observamos diferencia entre los datos de porcentaje de IF obtenidos para los cultivos de células en ausencia y presencia de IL-2 ó para las cultivadas con camptotecina. Ya que al comparar las IF obtenidas para las líneas celulares CASKI y SIHA, de diferente estadio e infectadas con el mismo HPV, observamos un patrón de síntesis de caspasa 3 similar (Figura 14).

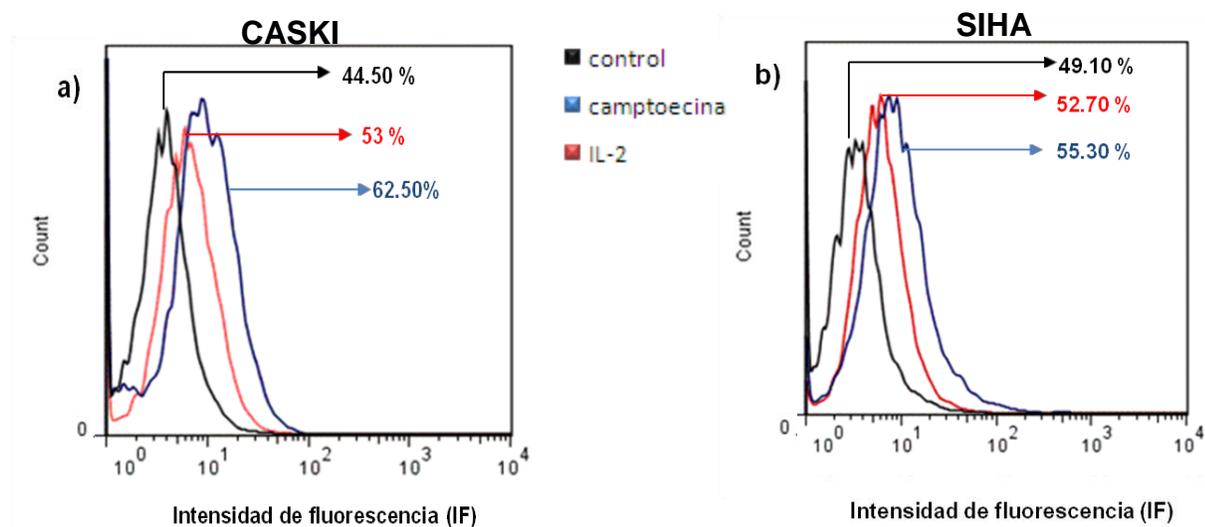


Figura 14. **Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV16+.** Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): traslape de histogramas de la línea celular CASKI; b): traslape de histogramas en la línea celular SIHA.

## Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV18+

Para las líneas celulares positivas a HPV 18 CALO e INBL, observamos que la línea CALO presenta una IF mayor que INBL cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 ó camptotecina. Ya que al comparar las IF obtenidas para las líneas celulares CALO y SIHA, estadio IIB infectadas con diferentes HPV, observamos un patrón. Ya que al comparar las IF obtenidas para las líneas celulares CALO e INBL de diferente estadio e infectadas con HPV 18, observamos un patrón de síntesis de caspasa 3 diferente siendo mayor en la línea CALO que estadio IIB a diferencia del menor patrón de síntesis para la línea INBL estadio IVB (Figura 15).

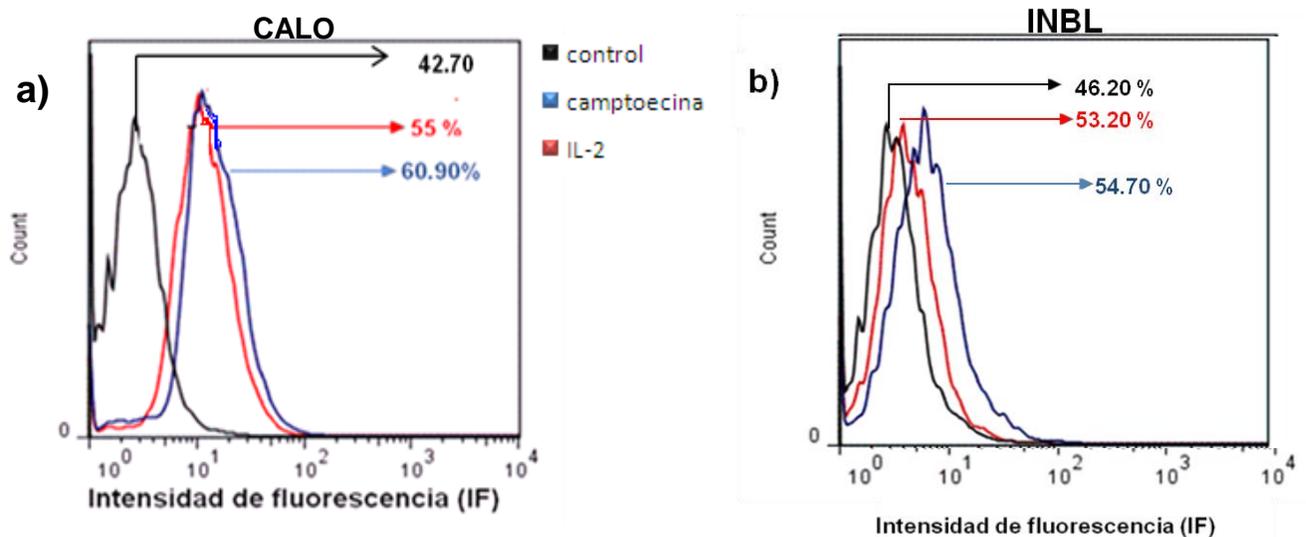


Figura 15. **Determinación de caspasa 3 en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino, HPV18+**. Se muestra la intensidad de fluorescencia a FIT-C en cultivos a 24h. a): traslape de histogramas de la línea celular CALO; b): traslape de histogramas en la línea celular INBL.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente el cáncer constituye uno de los problemas de salud pública más graves y difíciles de tratar, debido a las sucesivas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que alteran el ciclo celular, se han desarrollado alternativas terapéuticas como la inmunoterapia con citocinas como IL-2 que ha sido utilizada como terapia contra el cáncer incluyendo el carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas y carcinoma de mama (Tawbi y Nimmagadda 2009; Guang et al, 2011; García-Tuñón et al, 2004).

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina linfocitotrópica que está implicada en el crecimiento y diferenciación de linfocitos T y B, no solo mejora las funciones citolíticas de células asesinas naturales (NK), sino que también se sabe que tienen alguna función en la proliferación de varios tipos de células no linfoides. El complejo receptor de IL-2 (RIL-2) comprende tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), codificadas por genes no relacionados. El tipo de afinidad de RIL-2 a su ligando depende de que subunidad del receptor se expresa en la superficie celular, las cadenas beta y gama juntos forman el receptor de afinidad intermedia, mientras que el receptor de alta afinidad se forma con la adición de la subunidad alfa a este dímero.

Además, se ha reportado que IL-2 está presente en otros tejidos normales, incluyendo células endoteliales, epitelio intestinal y en células nerviosas. Existen referencia a cerca de que en tejidos normales como los fibroblastos y células de riñón la presencia de IL-2 es más abundante en células mitóticas que en células que se encuentran en cualquier otra fase del ciclo celular. También, se ha reportado la presencia de RIL-2 en células de tumores sólidos como cáncer de estómago, riñón, espinocelular y los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (García-Tuñón et al, 2004). El uso de secuencias anti-sentido para IL-2, en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello han demostrado que el bloqueo de la cadena beta del receptor para IL-2 (RIL-2 $\beta$ ) tienen como consecuencia la inhibición del crecimiento celular en estas células.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas de CaCu CALO e INBL, con una expresión diferencial del RIL-2 dependiente del estadio clínico del tumor.

De esta manera para tumores de estadios iniciales (estadio I y II) sólo se detecta la presencia de la cadena alfa del receptor, mientras que en estadios avanzados (III y IV) se observan las tres cadenas que conforman el RIL-2 (Alvarado et al, 1997; Rocha-Zavaleta et al, 2004).

Asimismo, hemos demostrado que 100 UI/ml de IL-2 administrada en cultivos de las líneas celulares CALO e INBL inhibe su proliferación y que esta inhibición conduce, finalmente a su muerte. En estas células se ha confirmado la fragmentación del DNA, una característica morfológica de células que mueren por apoptosis (Del Rio Ortíz 2012). Por otro lado, 10 UI/mL de IL-2 induce la proliferación de esas mismas células tumorales demostrando así, que no solo se está expresando el RIL-2 en células de CaCu, sino que además éste es funcional y que dependiendo de la concentración de IL-2 utilizada podemos tener una respuesta biológica diferencial.

Por otra parte, hemos publicado que las líneas celulares de CaCu CALO e INBL producen y secretan hasta 45 UI/mL de IL-2 que es suficiente para mantener su proliferación, en un modelo autócrino, que le puede servir como mecanismo de escape inmunológico (Rangel-Corona et al, 2010). Otro dato importante que recién publicamos es que 100UI/mL de IL-2 regula la expresión del RNA mensajero para caspasa 3 en estas líneas celulares, expresión que parece estar regulada cíclicamente (Martínez Fernández 2011). Sin embargo, estos datos no son suficientes para sugerir que caspasa 3 es sintetizada ya que la determinación de la expresión del mensajero para esta caspasa no implica su síntesis. En base a los antecedentes ya mencionados en este trabajo se determinó el efecto de 100UI/mL de IL-2 sobre la expresión de caspasa 3 en las líneas celulares CASKI, CALO, INBL, SIHA, así como el papel que juega la infección por HPV en la inducción de apoptosis por IL-2 para brindar mayor información sobre el papel que juega esta citocina en este proceso de muerte en células de CaCu.

Es interesante destacar que células de las líneas de CaCu CALO, CASKI, INBL, Y SIHA en cultivos en ausencia de IL-2, que se encuentran vivas, sin mostrar características de muerte por apoptosis, presentan niveles basales de caspasa 3. Esto indica que la enzima puede estar siendo constantemente sintetizada y que puede encontrarse su forma de precursor inactivo (zimógeno).

El cual, al recibir un estímulo apoptótico, puede ser activado por hidrólisis para convertirse en caspasa activa. Por lo que si se encuentra un mecanismo de activación de caspasa 3 podríamos regular la muerte por apoptosis de este tipo de células tumorales. La apoptosis es un mecanismo normal de muerte limpia en las células que se caracteriza, por ser la forma fisiológica de muerte celular que también interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Morfológicamente, en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (Del Rio Ortíz 2012; Yigong 2002). El volumen celular total se reduce, la célula se encoge, los organelos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata, pero las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales. A continuación se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que se denominan cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos.

Al mismo tiempo, se producen una serie de procesos bioquímicos que activan endonucleasas dependientes de Ca y Mg que cortan el ADN genómico por espacios internucleosomales que generan fragmentos de ADN en un rango de 180-200 pb. Por otra parte, se produce pérdida del potencial mitocondrial y asimetría de la membrana plasmática: los residuos de fosfatidilserina que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana celular, aparecen también en la cara externa de la misma. Este hecho permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. (Kurosaka et al, 2003)

Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la apoptosis están mediados por efectores de muerte celular como las caspasas (cisteína-proteasas). Las señales apoptóticas, tanto intracelular como extracelulares, primer etapa del proceso apoptótico, convergen para activar a las caspasas efectoras como es el caso de caspasa 3. La siguiente fase comprende la detección de esta señal y la transducción de la misma mediante vías que envían la señal a la maquinaria efectora de la muerte celular. La tercera fase es la efectora en la que están implicados las proteasas que activan la apoptosis, así como sus reguladores positivos y negativos. Y finalmente la fase en la que se produce la condensación de la cromatina y la degradación del DNA. (59)

Las señales que inducen la apoptosis son diversas entre ellas, se encuentran el daño al DNA, agentes tóxicos, estrés celular, radiaciones y factores y muerte.

Se sabe que Camptotecina, un fármaco utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, induce muerte por apoptosis. Camptotecina (CPT) y sus análogos (CPTs) actúan al enlazarse con los aductos ADN-Topo I, lo que estabiliza el complejo divisible ADN-Topo I evitando la liberación del ADN y provocando la acumulación de complejos divisibles estabilizados.

La formación del complejo ternario entre la CPTs-Topo I-ADN provoca la inhibición de la síntesis del ADN y ARN y la exposición prolongada a CPTs conduce a un daño irreparable en el ADN y por lo tanto provoca la muerte celular por la activación de las caspasas (Liu et al 2000; Wallet al, 1966; Hsiang, et al 1985, Husain et al, 1994, Fan et al 1998).

Así mismo, se ha reportado que camptotecina induce apoptosis en las células SIHA mediante la inducción de cambios de permeabilidad de la membrana mitocondrial que conducen a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, disminución de los niveles de Bcl-2, liberación del citocromo c, activación de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN (Sang et al, 2009). Por lo cual este fármaco es utilizado como control positivo para evaluar muerte por apoptosis por activación de caspasa 3.

Por esta razón, la intensidad de fluorescencia (IF) obtenidas en nuestras evaluaciones de citometría, para las cuatro líneas celulares cultivadas con camptotecina sirve como punto de comparación para la IF obtenidas para las mismas líneas celulares cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2. Es decir la IF obtenida para células cultivadas con camptotecina nos indica que las células están sintetizando caspasa 3 y si la IF para las células cultivadas con IL-2 al ser semejante a la obtenida para las células del control positivo confirma que IL-2 regula la síntesis de caspasa 3. Al comparar la IF de células cultivadas ya sea con camptotecina o IL-2 con la IF de células cultivadas en ausencia de IL-2, vemos que la presencia de caspasa 3 aumenta en un 20%. Por tanto, IL-2 muestra ser un eficiente inductor de la síntesis de caspasa 3, tanto como lo hace camptotecina siendo más evidente en la línea celular CALO. Tomando en consideración lo anterior pensamos que IL-2 puede ser utilizada como una citocina para controlar la expresión de caspasa 3 y así inducir la muerte por apoptosis en tumores de CaCu.

A pesar de que las cuatro líneas de CaCu utilizadas en este trabajo, pertenecen a dos estadio clínicos diferentes; CASKI e INBL estadio clínico IVB, y CALO y SIHA estadio clínico II, nuestros datos indican que el estadio clínico no influyen significativamente en la respuesta que las células de CaCu tienen ante IL-2 para sintetizar caspasa 3. Esta afirmación se basa en el hecho

de que los datos de IF para caspasa 3 obtenidos en CASKI e INBL son semejantes entre ellos y si los comparamos con los datos de IF para CALO y SIHA muestran niveles de síntesis de caspasa 3 muy similar entre las cuatro líneas celulares. Sin embargo, debemos destacar que la línea CALO al tener el mayor porcentaje de IF muestra ser la más eficiente en la síntesis de caspasa 3. Esta eficiencia de las células CALO para sintetizar caspasa 3, cuando son cultivadas en presencia de IL-2, pareciera no ser una consecuencia directa de su estadio, sino más bien del tipo de HPV que la infecta. Se sabe que los HPVs constituyen el único agente etiológico causante de cáncer de cuello uterino, múltiples procesos patológicos de cérvix y otras mucosas genitales, que se transmiten por contacto sexual, ha sido aislado de carcinomas epidermoides vulvares y vaginales; además, se asocia con otros tumores epidérmicos y en lesiones proliferativas de la piel y las mucosas (42).

También, se ha publicado que los tipos más frecuentes de HPV son: 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 52. Y que los cánceres inducidos por VPH con frecuencia tienen secuencias virales integradas en el ADN celular. Algunos de los genes tempranos de VPH, como E6 y E7, actúan como oncogenes promoviendo la proliferación celular y la transformación tumoral los dos tipos más importantes son VPH 16 y 18. El VPH 16 está asociado con casi el 60% de los casos de cáncer cervical, y VPH 18 por otro 10% de los casos. La acción conjunta de E7 (inhibiendo pRb) y E6 (degradando p53) produce un efecto sinérgico en la activación del ciclo celular, dando como resultado la proliferación descontrolada de las células infectadas por el virus que, asociado al efecto anti-apoptótico resultante de la inactivación de p53, es una potente combinación oncogénica.

Estos son algunos ejemplos de las alteraciones moleculares descritas, como consecuencia de la inserción del genoma del HPV en células del cérvix. Por lo que pensamos que, si las líneas de CaCu utilizadas en este trabajo también están infectadas con HPV, la presencia del virus les puede conferir una sensibilidad diferencial a IL-2, la cual dependiera del tipo de HPV que portan. En base a esto y tomando en cuenta los resultados obtenidos para la línea CALO estadios tempranos y positivas a HPV 18, que mostro la mayor síntesis de caspasa 3 en presencia de IL-2. Proponemos que células de CaCu que cumplan con las características de estadio temprano e infección con HPV 18 son mejores candidatos para ser tratadas con IL-2. Ya que el tipo de virus que las infecta parece jugar un papel regulador en la síntesis de caspasa 3 inducida por esta citocina.

Esta hipótesis de que el tipo de HPV que infecta a las células de CaCu determina su respuesta a IL-2 para inducir la síntesis de caspasa 3, se basa en el hecho de que las líneas celulares SIHA, estadio IIB y CASKI, estadio IVB infectadas con HPV 16, no mostraron una mayor eficiencia para inducir la síntesis de caspasa 3 cuando fueron cultivadas en presencia de IL-2, como lo reportado para CALO.

Estos resultados nos permiten sugerir que las cuatro líneas celulares utilizadas en este trabajo responden a la síntesis de caspasa 3 en presencia de IL-2 y que conservan intactas las vías de inducción de apoptosis y que sólo requieren de un estímulo, como IL-2 para activarse. Por otro lado, proporcionamos información importante del papel que juega el tipo de HPV en esta respuesta a IL-2. Y proponemos el uso de IL-2 como alternativa terapéutica para pacientes con CaCu en particular en tumores de estadio clínico temprano.

## CONCLUSIONES.

- ⇒ Las líneas de cáncer cérvicouterino (CaCu) CASKI, CALO, INBL, Y SIHA cultivadas en ausencia de IL-2 expresan niveles basales de caspasa 3.
- ⇒ IL-2 regula positivamente la expresión de caspasa 3 en las líneas celulares de CaCu CASKI, CALO, INBL y SIHA.
- ⇒ La línea CALO mostró la mayor síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2.
- ⇒ El estadio clínico del tumor no es determinante en la regulación de la síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2.
- ⇒ El HPV 18 regula la síntesis de caspasa 3 inducida por IL-2 en tumores de estadio clínico temprano.

## PERSPECTIVAS

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

- Determinar la regulación de caspasa 3 activa en células cultivadas en presencia de IL-2 a 100 UI/mL.
- Determinar cuál es el tipo de muerte celular que predomina en estas líneas celulares de CaCu quizá con la técnica de Anexina V.
- Analizar la expresión caspasa 3 en líneas celulares de estadios tempranos de CaCu tratadas con 100 UI/mL de IL-2, para observar el comportamiento que genera esta citocina en la síntesis y activación de caspasa 3 en células tumorales que presenten infección por HPV18
- Determinar si IL-2 en una concentración de 100 UI/mL, regula la síntesis y activación de las caspasas iniciadoras para comprender cuál es el tipo de muerte celular que detona esta citocina.

## REFERENCIAS

- Alani RM, Munger K. (1997) Human papillomaviruses and associated malignancies. *J clin oncol* 1997; 16(1):330-337
- Alfonso Dueñas-González, Lucely Cetina, Jaime Coronel and Deborah Martinez-Ban. (2010) Pharmacotherapy Options for Locally Advanced and Advanced Cervical Cancer Drugs; 70 (4): 403-432
- Alvarado, M. J. A.( 1997) Presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la Interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F
- Annan, Wilson- J, O'Reilly LA, Crawford SA, Hausmann G, Beaumont JG, Parma LP, Chen L, Lackmann M, Lithgow T, Hinds MG, Day CL, Adams JM, Huang DC (2003) Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol*; 162:877-887
- Bhardwaj A. and Aggarwal B. B. (2003) Receptor-Mediated Choreography of Life and Death. *Journal of Clinical Immunology*; 23:317-332.
- Bortner, C. D. and J. A. Cidlowski (2002). "Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell." *Cell Death Differ*; 9(12): 1307-10.
- Carpi A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. (2009) Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: an update and expectation. *Curr Cancer Drug Targets*. (8):888-903.
- Curtin J. F. and Cotter T. G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*; 15:983-992.

- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- Douglas Hanaha, Robert A. Weinberg. *Hallmarks of Cáncer: The Next Generation*. USA Cell; 144, March 4, 2011. Elsevier Inc
- Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg (2000) *The Hallmarks of Cancer* Cell, Vol. 100, 57–70, January 7.
- Fainboim Leonard. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana*. 5ª. Ed panamericana. México .p256.
- Fan, Y., Weinstein, J.N., Kohn, K.W., Shi, L. M. & Pommier, Y. (1998). Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J.Med. Chem.* 41:2216-2226.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: *GLOBOCAN* (2002). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC Press, Lyon,
- Fernandes Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri. (1994) CPP32, a Novel Human Apoptotic Protein with Homology to *Caenorhabditis elegans* Cell Death Protein Ced-3 and Mammalian Interleukin-1 $\beta$ -converting Enzyme. *E. S. J. Biol. Chem*; 269: 30761-30764.
- Floriano-Sánchez. (2010) Human papilloma-virus: Marker of response to radiotherapy/chemoradiotherapy in cervical cáncer. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44 (3): 337-46
- Ghosh S, Baltimore D. (1990) Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I Kappa B. *Nature* ; 12;344(6267):678–682.
- Globocan (2008). *GLOBOCAN* (2008). (IARC)

- Guang Tan, Xin Zhang, Hongbo Feng, Haifeng Luo, and Zhongyu Wang (2011). The Therapeutic Effect of Cytokine-Induced Killer Cells on Pancreatic Cancer Enhanced by Dendritic Cells Pulsed with K-Ras Mutant Peptide. *Clin Dev Immunol*.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407(6805): 770-6.
- Hong Ji, David. Greening, Eugene A. Kapp, Robert L. Moritz and Richard J. Simpson: (2008). Secretome-based proteomics reveals sulindacmodulated Proteins released from colon cancer cells Joint Proteomics Laboratory, Ludwig Institute for Cancer Research and the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. & Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260:14873-14878.
- Husain, I., Mohler, J.L., Seigler, H.F. & Besterman, J. M. (1994). Evaluation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 54:539-546.
- Ignacio García-Tuñón, Mónica Ricote, Antonio Ruiz, Benito Fraile, Ricardo Paniagua and Mar Royuela<sup>1</sup> (2004). Interleukin-2 and its receptor complex ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains) in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res*; 6:R1-R7 (DOI 10.1186/bcr730).
- Inna N. Lavrik, Alexander Golks, and Peter H. Krammer: (2005). Caspases pharmacological manipulation of cell death Division of Immunogenetics, Tumor Immunology Program, German Cancer Research Center, Heidelberg, German.
- Itzel Del Rio Ortíz. (2012) .Estudio de la participación de los genes Citocromo C y COX-IV en la inhibición de la proliferación de células de carcinoma de cérvix cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Biología Experimental, UNAM.

- Ivan Delgado Enciso, Daniel Cervantes García. (2008). Generación de un potente vector adenoviral oncolítico y selectivo
- J.P. Burgués Gasión, J.L. Pontones Moreno, C.D. Vera Donoso, J.F. Jiménez Cruz, M. Ozonas Moragues (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp* 2005; 29 (9): 846-859.
- Jorge Meléndez Zajgla, Gisela Ceballos Cancino (2008). Sobreviviendo a diablo: lecciones de la survivina en la apoptosis. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, Vol. XXXII.
- Jun-jie Liu, Mou Lin, Jia-ying Yu, Bo Liu, Jin-ku Bao (2011). Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters* 300; 105–114.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*; 7:1166-117
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide; a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers*; 14(2):467-475.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; 171:4672-9.
- Lagunas-Martínez, V. Madrid-Marina, P. Gariglio. (2009) Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805 (2010) 6–16
- Leticia Rocha-Zavaleta, Carlos Huitron, Julio R. Cáceres-Cortes, José A. Alvarado-Moreno, Arturo Valle-Mendiola, Isabel Soto-cruz, Benny Weiss Steider, Rosalva Rangel-Corona. (2004) Interleukin-2 (IL-2) Receptor- $\beta$  signalling is activated by c-kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling* 16:1239-1247.

- Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. (2000). Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Volume 922.
- López –Saavedra, Li zano-Soberón. (2006). *Cancerología 1 Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer*. UNAM - INCan. Subdirección de investigación básica. Instituto Nacional de Cancerología. México D.F.: 31-55
- Maria Antonia Lizarbe Iracheta (2007). *El suicidio y la muerte celular*. Real.Academia.de Ciencias .Exactas y .Física. Natural. Vol. 101, Nº. 2
- María A. Fernández Herrera, Hugo Lopez Munoz, José M. V. Hernandez Vazquez, Moisés Lopez Davila, María L. Escobar Sánchez, Luis Sánchez-Sánchez, B. Mario Pinto, Jesús Sandoval Ramírez (2010) Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgeninand hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 18 2474–2484.
- Martinez Fernandez Ana Luz (2011). *Determinación de la expresión de ARNm para caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de Cáncer Cérvico Uterino: HELA, INBL y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes tiempos* Tesis de licenciatura Unam-Fes Zaragoza
- Ministerio de Salud. (2004). *Comisión Nacional de Cáncer Cérvicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino*, Chile
- Naismith J. H. and Sprang S. R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Science*; 23:74-79.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2000) Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002; *Nat. Prod. Rep.* 17:215
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*; 17:1475-1486

- Oliver von Ahsen, Christian Renken, Guy Perkins, Ruth M. Kluck, Ella Bossy-Wetzel, and Donald D. Newmeyer (2000) Preservation of Mitochondrial Structure and Function after Bid- or Bax-mediated Cytochrome c Release; *The Journal of Cell Biology*, Volume 150, 2000
- Pablo Fuentes-Prior, Guy S. Salvesen. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J*; 384, 201–232.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J: (1997). *Cancer incidence in five continents, vol VII*. International Agency for Research on Cancer, Scientific Publications number 143. Lyon; IARC.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 5;412(6842):27, 29.
- Peter Geserick, Mike Hupe, Maryline Moulin, W. Wei-Lynn Wong, Maria Feoktistova, Beate Kellert<sup>1</sup>, Harald Gollnick, John Silke, and Martin Leverkus (2009) Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment *JCB* vol. 187 no. 7 1037-1054
- Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, del Río-Ortiz I, Nieves-Ramírez ME, Morán-Bañuelos H, González-Tenorio O, Cáceres-Cortés JR, Weiss-Steider B. (2011). Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice. *J Drug Target*. 19(2):79-85
- Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, Weiss-Steider B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*. 50(3):273-7.
- Rivory LP, Robert J (1995). Pharmacology of camptothecin and its derivatives. *Bull Cancer*. 1995 Apr;82(4):265-85

- Sang Won Ha, Yun Jeong Kim, Wonyong Kim and Chung Soo Lee. (2009) Antitumor Effects of Camptothecin Combined with Conventional Anticancer Drugs on the Cervical and Uterine Squamous CellCarcinoma Cell Line SiHa. Korean J Physiol Pharmacol Vol 13: 115–121,
- Sarah L. Pett, Anthony D. Kelleher, Sean Emery. (2010). Role of Interleukin-2 in Patients with HIV Infection. *Drugs*; 70 (9): 1115-1130.
- Shu, Y-Z. (1998). Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61:1053-1071.
- Sierra Mondragón Edith (2011). Participación de caspasa 8 y 12 en la regulación de apoptos en líneas celulares de cáncer cérvico uterino,cultivadas en presencia de il-2. Tesis de licenciatura Unam-Fes Zaragoza
- Simposio internacional sobre interferon y citocinas. (2001). Habana Cuba
- Strasser, A., L. O'Connor. (2000). "Apoptosis signaling." *Annu Rev Biochem*; 69: 217-45.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E.,Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M.(1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzanne M. Garland and Jennifer S. Smith. (2010) Human Papillomavirus Vaccines Current Status and Future Prospects*Drugs*; 70 (9): 1079-1098.
- Szewczyk, A. and L. Wojtczak (2002). "Mitochondria as a pharmacological target." *Pharmacol Rev*; 54(1): 101-27.
- Tawbi H, Nimmagadda N. (2009) Targeted therapy in melanoma. *Biologics*.2009; 3:475-84.

- Vander Heiden, M. G. and C. B. Thompson (1999). "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?" *Nat Cell Biol*;1(8): E209-16
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43–53.
- Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*; 10:789-99.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T. & Sim, G.A (1966). Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88:3888-3890.
- Wang X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*; 15: 2922-2933.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*; 292:727-730.
- Wigginton JM, Park J, Gruys ME, Young HA, Jorcyk CL, Back TC, Brunda MJ, Strieter RM, Ward J, Green JE, Wiltrou RH (2001). Complete regression of established spontaneous mammary carcinoma and the therapeutic prevention of genetically programmed neoplastic transition by IL-12/pulse IL-2: induction of local T cell infiltration, fas/fas ligand gene expression, and mammary epithelial apoptosis. *J Immunol*; 166:1156-1168.
- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*; 17:617-625
- Yigong Shi. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, Vol. 9, 459–470.