



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto de altas dosis de IL-2 sobre la fosforilación de JAK3, STAT3, STAT5 y su efecto en la proliferación de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

**DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ,  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA,  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
DRA. REBECA LÓPEZ MARURE,  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

México, D.F. abril de 2014



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

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Efecto de altas dosis de IL-2 sobre la fosforilación de JAK3, STAT3, STAT5 y su efecto en la proliferación de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ,  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA,  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
DRA. REBECA LÓPEZ MARURE,  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**México, D.F. abril de 2014**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
 Director General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de marzo de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LAGUNAS CRUZ MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **403016116** con la tesis titulada **"Efecto de altas dosis de IL-2 sobre la fosforilación de JAK3, STAT3, STAT5 y su efecto en la proliferación de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL"**, realizada bajo la dirección del **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ** :

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER  
 Vocal: M EN C LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ  
 Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
 Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
 Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cd. Universitaria, D.F., a 21 de abril de 2014.

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
 COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al programa de becas para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo.

Al proyecto de Investigación PAPIIT, DGAPA UNAM (Proyecto IN221512) por el apoyo para el desarrollo del presente proyecto.

A los miembros del Comité Tutor

DRA. ISABEL SOTO CRUZ  
DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA  
DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

A los sinodales

DR. BENNY WEISS STEIDER  
M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ  
DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabel Soto

A mis compañeros y amigos Beatriz H, Rosario G, Guadalupe F, Marcela M, Nubia C, Ricardo B, Fernanda U, Lennis O, Evelyn E, Octavio Z, Marcela V.

Al técnico laboratorista José Chavarria.



**Dedicatoria**

A mi madre, Maurilia Cruz

A mi padre, Isidro Lagunas

A mis hermanos, Isidro, Pedro, Rafael, Maurilio, Joel, Juan y Jacinto

A mi compañero de vida Arturo Valle Mendiola

## Índice

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
	<b>ABSTRAC</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	
	a) Cáncer	3
	b) Cáncer de cérvix	4
	c) Citocinas	5
	d) Interleucina 2 (IL-2)	8
	e) Proteínas con actividad de cinasa de tirosina.	13
	f) Fosforilación	14
	g) Janus cinasas (JAK)	14
	h) Transductor y activador de la señal (STAT)	16
	i) Vía de señalización JAK-STAT	17
	j) Apoptosis	20
	k) Ciclo celular	22
<b>III.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>24</b>
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>25</b>
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVO PARTICULAR</b>	<b>25</b>
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGÍA CIENTÍFICA</b>	
	• Material biológico	26
	• Tinción con cristal violeta	26
	• Lisis celular e inmunoprecipitación.	26
	• Electroforesis (SDS-PAGE) y Western-blot	27
	• Elución de anticuerpos	28
	• Determinación de apoptosis	28
	• Determinación de las fases del ciclo celular	29
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
	• Evaluación de la proliferación de las células de CaCu tratadas con IL-2	30
	• Cinética de proliferación CALO	30
	• Cinética de proliferación INBL	31
	• Fosforilación de la cinasa JAK3 en las líneas celulares CALO e INBL tratada con 100UI/ml de IL-2	31
	• Fosforilación de STAT3 en las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2	33

• Fosforilación de STAT5 en las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2 . . . . .	34
• Determinación de apoptosis en las líneas celulares CALO e INBL . . . . .	35
• Determinación de las fases del ciclo celular en la línea CALO incubada con 100UI/ml de IL-2 . . . . .	38
• Determinación de las fases del ciclo celular en la línea INBL incubada con 100UI/ml de IL-2 . . . . .	40
<b>IX. DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>42</b>
<b>X. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>46</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>47</b>

## Índice de figuras y tablas

Figura 1. Interacción ligando receptor de IL-2 . . . . .	9
Figura 2. Receptor de membrana de IL-2 . . . . .	10
Figura 3. Organización estructural de las Janus cinasa (JAK) . . . . .	15
Figura 4. Organización estructural de las STAT . . . . .	17
Figura 5. Vía de señalización JAK-STAT . . . . .	19
Figura 6. Apoptosis . . . . .	21
Figura 7. Ciclo celular . . . . .	23
Figura 8 Efecto de 100UI/ml IL-2 sobre la proliferación de células CALO . . . . .	30
Figura 9 Efecto de 100UI/ml IL-2 sobre la proliferación de células INBL . . . . .	30
Figura 10. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación de JAK3 en líneas CALO e INBL . . . . .	32
Figura 11. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación de STAT3 en líneas CALO e INBL . . . . .	33
Figura 12. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación de STAT5 en líneas CALO e INBL . . . . .	34
Figura 13. Determinación de apoptosis por la técnica de Anexina en la línea CALO . . . . .	36
Figura 14. Determinación de apoptosis por la técnica de Anexina en la línea INBL . . . . .	37
Figura 15. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre las fases del ciclo celular de la línea CALO . . . . .	39
Figura 16. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre las fases del ciclo celular de la línea INBL . . . . .	41
Tabla 1. Porcentaje de células INBL encontradas en cada fase del ciclo celular . . . . .	39
Tabla 2. Porcentaje de células INBL encontradas en cada fase del ciclo celular . . . . .	41

## I. Resumen

El cáncer cervicouterino (CaCu), es la segunda causa de muerte femenina en todo el mundo según la OMS. Es una de las principales causas de muerte por cáncer en países de bajos recursos. En México la incidencia más alta en tumores ginecológicos es el cáncer de mama y en segundo lugar el cáncer cervicouterino. Para el tratamiento del cáncer cervicouterino se han utilizado diversos medicamentos utilizados en inmunoterapia, terapia génica entre otros métodos basados en citocinas. El IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 y GM-CSF son excelentes candidatos como activadores de la respuesta inmune antitumoral y se han empleado en diversos modelos preclínicos con alta efectividad.

Investigaciones de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer FES- ZARAGOZA UNAM, han demostrado que células de cáncer cervicouterino CALO e INBL presentan el receptor funcional para IL-2, por lo que se considera un modelo biológico para dilucidar el efecto que tiene ésta interleucina sobre el cáncer de cérvix.

La IL-2 es muy importante para la activación de la vía de señalización JAK-STAT, la cual está involucrada en proliferación celular. Se sabe que el efecto de IL-2 sobre células no hematopoyéticas parece ser diferencial ya que altas concentraciones inhiben la proliferación en un 50% de líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello tanto *in vitro* como *in vivo*. Además se ha observado que el tratamiento con 100UI de IL-2 induce la activación y la proliferación de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos.

En este estudio de IL-2 se decidió tratar células de cáncer de cérvix con 100UI/ml de IL-2 para determinar su efecto sobre la proliferación celular sobre la fosforilación de las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5. Además, determinar el efecto sobre la apoptosis.

Los resultados de este trabajo muestran que la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2 es inhibida. Se observó disminución en la fosforilación de la cinasa JAK3 pero no de STAT3 y STAT5. Se determinó que la disminución en la proliferación celular no era debido a un proceso de apoptosis. El análisis de las fases del ciclo celular muestra que en ambas líneas celulares el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 induce un arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular.

En conclusión, la modulación de la fosforilación afecta la función de las proteínas JAK-STAT interviniendo en la correcta transducción y transcripción de genes involucrados en proliferación celular, esto probablemente induce el arresto del ciclo en fase G1 evitando de esta manera la proliferación de células de carcinoma de cérvix.

## Abstract

Cervical Cancer is the second cause of death in women worldwide according to WHO. It is one of the major causes of cancer death in low resource countries. In Mexico the highest incidence in gynecological tumors is breast cancer and secondly cervical cancer. Several therapies have been used for the treatment of cervical cancer, such as immunotherapy, gene therapy and some other based on cytokines. The IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 and GM-CSF are excellent candidates as activators of the antitumor immune response and they were used in various preclinical models with high effectiveness.

Research conducted at the laboratory of Cell Differentiation and Cancer Research FES- ZARAGOZA UNAM, have been demonstrated that cervical cancer cell lines CALO and INBL show a functional receptor for IL-2, so this is considered a biological model to elucidate the effect of this interleukin in cervical cancer.

It is known that the effect of IL-2 on non-hematopoietic cells appears to be differential since higher concentrations inhibit proliferation by 50% of squamous carcinoma head and neck cell lines, either *in vitro* or *in vivo*. We observed that treatment with 100 IU of IL-2 induces activation and proliferation of peripheral blood lymphocytes. We decided to treat cervical cancer cells with high concentrations of IL-2 to determine its effect on the proliferation of the cell lines CALO and INBL and upon phosphorylation of JAK3, STAT3 and STAT5 proteins.

Results from this study show that cell proliferation in cell lines CALO and INBL when treated with 100 UI/ml of IL-2 is inhibited. A decrease was observed in the phosphorylation of JAK3 kinase but not the phosphorylation of STAT3 or STAT5 of IL-2. We analysed if the inhibition of proliferation was due to an apoptotic process but our results show that this was not the case. Therefore we decided to analyze the cell cycle phases and our results show that in both cell lines the treatment with 100UI/ml of IL-2 induces an arrest of cells in the G1 phase of the cell cycle.

In conclusion, modulation of the phosphorylation affects the function of the JAK-STAT proteins intervening in the correct transduction and transcription of genes involved in cell proliferation, that induces probably cell cycle arrest in G1 phase thus preventing cell proliferation of cervical carcinoma cell lines.

## II. Introducción

### a. Cáncer

El cáncer es una enfermedad neoplásica con transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada, tiene un origen multifactorial, acumulación de mutaciones en el genoma (genética, epigenética, ambiental, etc.) que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células somáticas. Las células presentan crecimiento desordenado (tumor) y podría presentarse una colonización tisular (metástasis). Cada cáncer es una situación distinta con peculiaridades dependientes del tipo de célula donde se origina, su etiología, el grado de malignidad y otros factores (Parkin *et al.*, 1999).

El cáncer comienza en las células que constituyen los ladrillos del cuerpo. Normalmente, el cuerpo forma células nuevas a medida que se necesitan para reemplazar a las células envejecidas que mueren. Algunas veces, este proceso no resulta ser el esperado. Crecen células nuevas que no son necesarias y las células envejecidas no mueren cuando deberían. Estas células adicionales pueden formar una masa llamada tumor. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos no son cáncer, mientras que los malignos sí lo son. Las células de los tumores malignos pueden invadir los tejidos cercanos. También pueden desprenderse y diseminarse a otras partes del cuerpo. (Parkin *et al.*, 1999)

Existen más de 100 tipos de cáncer, la mayoría de éstos se nombran por su lugar de origen. La diseminación de un cáncer desde una parte del cuerpo a otra se denomina metástasis. Los síntomas y el tratamiento dependen del tipo de cáncer y de lo avanzada que esté la enfermedad. La mayoría de los tratamientos incluye cirugía, radiación y/o quimioterapia. Algunos pueden también incluir terapia hormonal, terapia biológica o trasplante de células madres (Parkin *et al.*, 1999).

El cáncer es posiblemente la enfermedad más estudiada desde diferentes puntos de vista, se ha pasado en los últimos años de un conocimiento casi nulo a gran avance en numerosos aspectos moleculares, desde los que explican la proliferación

excesiva y la pérdida de células por apoptosis hasta los mecanismos por los que el cáncer genera metástasis.

### **b. Cáncer de cérvix**

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de cérvix (CaCu) es la segunda causa de mortalidad femenina en todo el mundo, con unas 300,000 muertes al año. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo (Parkin *et al.*, 1999) y cerca de 500,000 casos nuevos se presentan cada año (Globocan, 2008). En el año 2010 en México, los principales tumores malignos que afectaron a la población femenina fueron el cáncer de mama (24.3%), el CaCu (9.7%) y el de colon (3.2%). (<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/cancer0.doc>, 2013)

Casi todos (99.8%) los casos de cáncer de cérvix se deben a la infección con virus del papiloma humano (VPH) transmitido por vía sexual. El enlace entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald Zur Hausen aunque la infección no es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (Walboomers *et al.*, 1999).

El genoma del VPH consiste de una molécula de DNA circular de doble cadena, aproximadamente de 8 Kb. Se divide en tres regiones: la región larga de control, LCR, que no contiene marco de lectura alguno; la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Monroy *et al.*, 1999).

La proteína E7 del HPV inactiva la proteína supresora Rb y la proteína E6 degrada la proteína supresora de tumor p53 vía interacción con E6AP. Esto lleva a la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Kaczkowski *et al.*, 2012).

El CaCu se ha tratado de prevenir con vacunas profilácticas. Las vacunas contra el cáncer son medicamentos que pertenecen a una clase de sustancias conocidas



como modificadores de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica trabajan al estimular o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para combatir las infecciones y enfermedades. Muchas de las vacunas preventivas, incluso las vacunas contra el VPH, estimulan la producción de anticuerpos que se adhieren a microbios específicos y bloquean su capacidad de causar infección. Las células T citotóxicas, destruyen las células anormales o infectadas al emitir sustancias químicas tóxicas o al impulsar a esas células a que se destruyan ellas mismas (Hernández *et al.*, 2006).

Los investigadores suelen añadir otros ingredientes, conocidos como adyuvantes, a las vacunas de tratamiento. Estas sustancias refuerzan las reacciones inmunitarias que han sido activadas por la exposición a antígenos o de otras formas. Las citocinas naturales o sintéticas pueden usarse como adyuvantes. Las citocinas son sustancias producidas naturalmente por los glóbulos blancos para regular y perfeccionar la respuesta inmunitaria. Algunas citocinas aumentan la actividad de las células B y de los linfocitos T citotóxicos, mientras que otras citocinas suprimen la actividad de estas células. Las citocinas que se usan con frecuencia en las vacunas de tratamiento del cáncer o que se administran junto con ellas son la interleucina 2 (IL-2), el interferón alfa (INF- $\alpha$ ) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

Las células de CaCu expresan el receptor funcional de IL-2 compuesto por las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$ , dicha IL-2 media la fosforilación de JAK3 y STAT5 influyendo en el proceso de proliferación celular (Rangel *et al.*, 2010).

### **c. Citocinas**

Las citocinas son moléculas de bajo peso molecular de  $\pm 30$  kD secretadas durante la sinapsis inmunitaria, son los mensajeros efectores entre ambas células de la sinapsis. Intervienen en la regulación de la respuesta inmune y de los procesos inflamatorios, se sintetizan a partir de un estímulo, su acción es rápida y corta en el tiempo, y funcionan en el momento justo para producir una respuesta precisa (Hulme *et al.*, 2012).

La función general de las citocinas es regular la respuesta inmune modulando su duración e intensidad y regular la hematopoyesis en el sentido de número de células del sistema inmune y de la sangre presentes en cada momento (Hulme *et al.*, 2012).

Las citocinas se secretan de forma transitoria y actúan sobre receptores específicos que se expresan en las diferentes estirpes celulares produciendo respuestas diferentes. Una sola citocina puede actuar en una cascada de transducción de señales activando la síntesis de otras citocinas.

Estas moléculas cuentan con características que les permiten ejercer su acción biológica:

**Pleiotropismo.** Una misma citocina puede tener varias dianas y por tanto ejercer una distinta respuesta dependiendo de la diana sobre la que actúe.

**Redundancia.** Distintas citocinas pueden producir el mismo efecto.

**Sinergismo.** Distintas citocinas actuando simultáneamente pueden potenciar mutuamente su acción

**Antagonismo.** Una citocina puede inhibir la síntesis o bloquear el efecto de otra. (Feldmann, 2008; Manzoor, 2008).

Las células sintetizan una citocina y expresan el receptor para esa misma citocina permitiendo su autorregulación, este efecto se conoce como autócrino. El efecto parácrino involucra células vecinas donde la citocina actúa a distancias cortas. Estos efectos si bien son propios de las citocinas, no es exclusivo de éstas (Feghali, 1997).

Las citocinas se unen a receptores que muestran a menudo elevada afinidad por sus ligandos con constantes de disociación entre  $10^{-10}$  y  $10^{-12}$ . La expresión de muchos receptores de citocinas está regulada por señales específicas, la mayor parte de las respuestas celulares a citocinas precisan ARNm nuevo y la síntesis proteica, para muchas células blanco las citocinas actúan como reguladores de la división celular, o sea, como factores de proliferación (Katsutoshi, 2002; Feghali, 1997).

Existen familias de citocinas según sus características estructurales:

- Familia de interferón
- Familia del TNF
- Familia de la IL-1
- Familia de los factores de crecimiento
- Familia de las quimiocinas
- Familia de receptores hematopoyéticos

**Familia de receptores hematopoyéticos.** Están relacionados con procesos hematopoyéticos, el más conocido es el receptor de la EPO.

El receptor prototipo es el receptor de IL-2, que es una molécula esencial para dirigir la inmunidad celular. Está formado por tres cadenas:  $\alpha$  [CD25],  $\beta$  [CD122] y  $\gamma$  [CD132].

Según el grado de activación del linfocito T, podemos encontrar tres formas del receptor de IL-2:

- Receptor de alta afinidad  $\rightarrow$  Cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$
- Receptor de afinidad intermedia  $\rightarrow$  Cadenas  $\beta$  y  $\gamma$
- Receptor de baja afinidad  $\rightarrow$  Cadena  $\gamma$

En condiciones normales los leucocitos tienen el receptor de afinidad intermedia para IL-2 (formado únicamente por cadena  $\beta$  y  $\gamma$ ).

Cuando al linfocito reconoce al antígeno se conforma el receptor de alta afinidad de IL-2 en la presencia de la cadena  $\alpha$  (CD25), por lo que ante cantidades picomolares de IL-2 produce una reacción. Las subunidades del receptor presentan diferentes constantes de disociación (Kd). Así la cadena  $\alpha$ (p55), tiene una Kd de  $10^{-8}$  M, la cadena  $\beta$ (p75), una Kd de  $10^{-9}$  M, y la cadena  $\gamma$  (p64), una Kd de  $10^{-10}$ . El complejo formado por la asociación de las tres cadenas tiene una Kd de  $10^{-11}$  M. Por su afinidad la IL-2 las cadenas dan origen a tres tipos de receptor como se mencionó previamente.

Los receptores de interleucina comparten estructuralmente la cadena gamma ( $\gamma$ ) por lo que ésta es llamada cadena  $\gamma$  común, la cual forma parte de numerosos receptores de citocinas. Algunos receptores tienen más cadenas comunes además

de la  $\gamma$ , por lo que pueden unirse varias citocinas al mismo receptor, de forma inespecífica y baja afinidad, ya que para que exista afinidad media o alta deben estar presentes al menos dos cadenas o subunidades del receptor (Lindemann *et al.*, 2003)

Las interleucinas son proteínas solubles de bajo peso molecular que promueven activación, crecimiento, diferenciación, reparación, inflamación y regulación de la inmunidad celular. Estas moléculas efectoras son producidas transitoriamente y controlan localmente la amplitud y duración de la respuesta (Hernández- Alvarado, 2001).

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

La citocina IL-2 es una proteína de 14-17 kDa codificada por un solo gen que contiene 3662 bases con 3 intrones en el cromosoma 4 humano. Es producida por células T CD4<sup>+</sup> y en menor cantidad por células T CD8<sup>+</sup> (Anderson-Sorenson, 1994).

Esta proteína puede actuar en las mismas células que la producen (autócrina) o actuar en linfocitos T periféricos incluyendo a células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (parácrino). Durante la respuesta inmune la IL-2 no circula en sangre sino que actúa a distancia. (Valle, 2001).

El receptor de alta afinidad para IL-2 es un complejo proteico formado por tres subunidades o cadenas,  $\alpha$  (p55),  $\beta$  (p75) y  $\gamma$  (p64) (Ching *et al.*, 2001) las cuales se expresan unidas no covalentemente en la superficie de linfocitos T, B, NK, macrófagos y monocitos (Théze *et al.*, 1996). Se ha detectado la presencia del receptor en células normales no hematopoyéticas como queratinocitos, oligodendrocitos, células intestinales, de origen nervioso, endoteliales de cordón umbilical, fibroblastos de médula ósea, fibroblastos embrionarios humanos y células pituitarias (Théze *et al.*, 1996) (Figura 1).

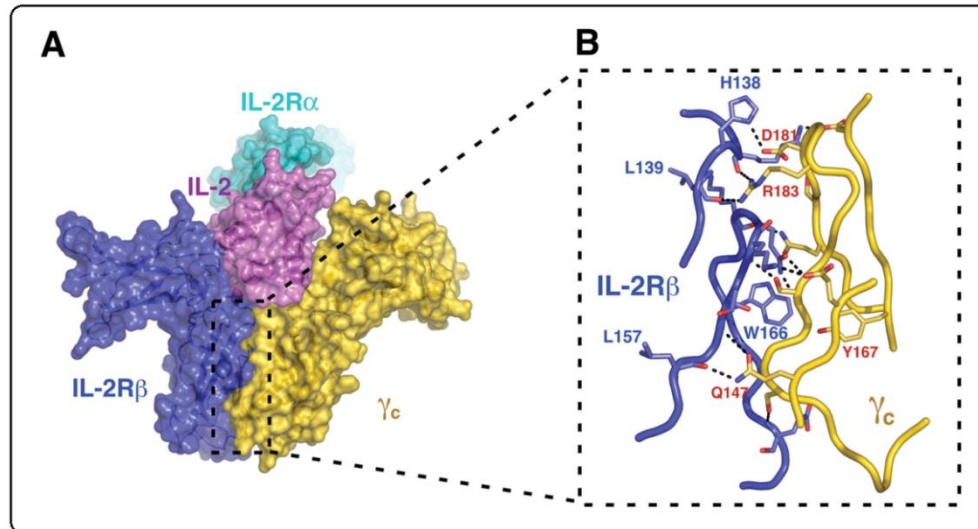


Figura 1. Interacción ligando receptor de IL-2. (A) Representación del complejo cuaternario muestra IL-2R alfa, beta, gamma. (B) Puentes de hidrógeno, interacciones entre IL-2RBeta y gamma mostrando los amino ácidos con los que están interactuando H138 (Histidina 138), L139, 157 (Leucina 139, 157), D181 (Aspártico 181), R 183 (Arginina 183), W166 (Triftofano 166), Y167 (Tirosina 167), Q147 (ácido glutámico) tomada de Wuang *et al.*, 2005.

Si la cadena  $\alpha$  se une sola a la IL-2 la afinidad es baja; el IL-2R $\beta$ , el IL-2R $\gamma$  no se unen solos a la IL-2; sin embargo, la combinación de  $\beta$  y  $\gamma$  se une a la IL-2 con afinidad intermedia y transmiten la señal en ausencia de la subunidad  $\alpha$ . Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , pero no la subunidad  $\alpha$ , pertenecen a la familia de receptores clase I y son indispensables para la señalización (Cosman *et al.*, 1990).

La cadena  $\alpha$  descrita originalmente como el antígeno Tac es una glicoproteína de 55kDa (p55), su expresión es inducida en células T activadas con mitógeno o antígeno. Está compuesta de 251 aminoácidos (aa), así como un péptido señal de 21 aa de longitud. La estructura primaria del IL-2R $\alpha$  no muestra una secuencia homóloga importante con otras moléculas de receptores conocidos y no pertenecen a la familia de receptores clase I de citocinas (Taniguchi, 1993).

La cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 (IL-2R $\beta$ ) (p75) es una proteína transmembranal que consiste de 551 aa. La proteína presenta una secuencia señal seguida de 525 residuos de aminoácidos que forman parte de la proteína madura de IL-2R $\beta$  (Hatakeyama *et al.*, 1993).

La cadena  $\gamma$  del IL-2R es la forma madura de la cadena (p64), consiste de 347 residuos de aa con una secuencia típica que lo incluye en la familia de receptores de clase I (Taniguchi, 1993). IL-2R  $\gamma$  está involucrado en la formación de los receptores de IL-2 de afinidad alta e intermedia (Figura 2).

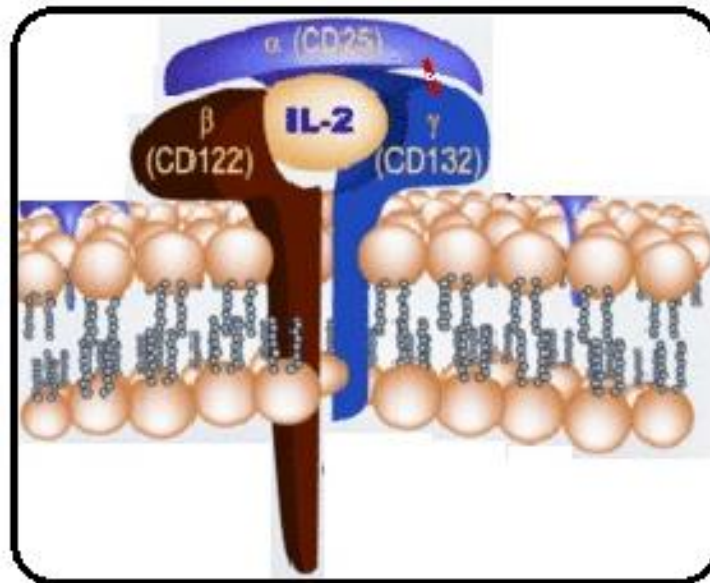


Figura 2. Receptor de membrana de IL- 2. Las subunidades que lo conforman:  $\alpha$  (CD25),  $\beta$ (CD122) y  $\gamma$ (CD132). Tomada y modificada de [http://www.sec.gov/Archives/edgar/containers/fix330/1441848/000110465910005539/a10-3358\\_1ex99d1.htm](http://www.sec.gov/Archives/edgar/containers/fix330/1441848/000110465910005539/a10-3358_1ex99d1.htm)

La proteína IL-2 madura contiene 3 residuos de cisteína, dos de los cuales forman una unión disulfuro que es requerida para la actividad biológica (Mizel, 1989).

La heterogeneidad en el tamaño de la proteína madura se debe a los sitios de glicosilación variables en el polipéptido de aproximadamente 130 aa. Normalmente la IL-2 es transcrita, sintetizada y secretada por células T únicamente bajo la activación de antígenos. La síntesis de la misma es usualmente transitoria con un pico de secreción que ocurre después de su activación (Abbas *et al.*, 1996).

En humanos la IL-2 se empezó a aplicar en 1982 a partir de una purificación parcial del cultivo de linfocitos humanos normales estimulados, y posteriormente del material de un tumor humano de células T. En 1983 la IL-2 comenzó a utilizarse de manera pura. Los ensayos clínicos con la IL-2 recombinante comenzaron en 1984 (Quan *et al.*, 1994).

En el humano las concentraciones fisiológicas de IL-2 en suero van de 7.5 a 8 UI/ml de IL-2 (González et al., 2007). La IL-2 es una citocina que es sintetizada tanto por células normales (7.5-8 UI/ml encontrado en suero) (González *et al.*, 2007), como por células tumorales (40-50 UI/ml, CALO e INBL) (Rangel *et al.*, 2010). La IL-2 se ha utilizado como tratamiento contra diversos tipos de cáncer (cabeza, cuello, entre otros).

La IL-2 es ampliamente utilizada en la inmunoterapia de tumores sólidos, dada su capacidad de activar algunos sistemas citotóxicos antitumorales del huésped (Gutiérrez, 1997). Es fundamental para la activación y modulación de la respuesta inmunitaria, es la principal citocina responsable de la progresión de linfocitos T de la fase G1 a la S del ciclo celular (Anderson -Sorenson, 1994).

La IL-2 juega un papel importante en la regulación de la proliferación de linfocitos (Luxemburgo *et al.*, 1998), modula *in vitro* e *in vivo* diversas funciones en células del sistema inmune, es producida por linfocitos normales de sangre periférica, favorece la proliferación de células B y la producción de anticuerpos, regula el crecimiento y actividad de células citotóxicas, aumenta la producción de interferón gamma, modula la expresión del receptor de IL-2 y regula la actividad tumoral (Hulme *et al.*, 2012).

La IL-2 tiene capacidad antiviral, presenta un papel importante en el rechazo de injertos y debido a que es considerada un potente activador de células inmunocompetentes, ha sido empleada durante los últimos años en importantes protocolos de tratamientos clínicos, con el propósito de estimular y mantener la actividad de células citotóxicas en enfermedades malignas, particularmente en carcinoma renal y melanoma maligno (Rosenberg, 1989), en donde se han obtenido resultados interesantes de rechazo tumoral (Smith, 1988).

La IL-2 ejerce su función mediante la unión a su receptor presente en estas células. Se ha reportado que otros tipos de células normales como fibroblastos de pulmón y células pancreáticas poseen receptores para IL-2 funcionales; sin embargo, poco se sabe acerca de su función (Plaisance *et al.*, 1993).

También se ha encontrado que células tumorales de mama, pulmón e hígado, entre otras, poseen receptores funcionales para esta citocina. En estudios realizados en el laboratorio de Oncología Celular, de la Unidad De Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de FES Zaragoza se ha determinado la expresión diferencial del receptor para IL-2 en líneas celulares provenientes de CaCu en diferentes estadios, siendo más abundante en aquellas de estadio IV metastásico (Rangel *et al.*, 1998).

La unión de la IL-2 con su receptor induce activación de dos miembros de la familia de proteínas de tirosina cinasa JAK1 y JAK3. La expresión de JAK3 es esencial para la inducción de genes ciclina involucrados en la transición de G1 a S del ciclo celular (Hodaka, 2007).

La activación del receptor de IL-2 induce una cascada de señalización que no es bien conocida en el caso de los tumores sólidos (Rocha *et al.*, 2004)

En las células tumorales se ha observado una abundante expresión de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-2R (Yasumura, 1994). Por su parte, la cadena  $\gamma$  del IL-2R ha sido detectada en un 50% de líneas celulares de melanoma y en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello, gástrico y renal; de igual forma se detectaron en células epiteliales intestinales (Dignass and Podoswky 1996).

Usando anticuerpos específicos contra las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-2R se ha demostrado que en tumores malignos humanos de diversas histogénesis, las células neoplásicas, pero no el tejido normal adyacente, expresan la IL-2R $\beta$ ; sin embargo, no se detectó la presencia de IL-2R $\alpha$  en dichas células. Por otra parte, además de la expresión de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del IL-2R en células tumorales, también se ha detectado la presencia intracelular de IL-2 en tumores de pulmón, mama, colorrectal y melanoma, lo cual indica que dichos receptores son funcionales, ya que permiten la internalización de citocinas (McMillan, 1995).

La interleucina 2 (IL-2) ha sido usada para activar linfocitos citotóxicos que atacan células tumorales *in vivo* e *in vitro* (Rangel *et al.*, 2010).

La localización de las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  del IL-2R en las células tumorales de carcinoma de mama, pulmón, colorrectal y melanoma sugiere que estas células son



capaces por un lado de producir IL-2, y por el otro la IL-2 endógena puede unirse al IL-2R $\beta$  expresado en la superficie de las células tumorales. Así mismo, se ha observado que al adicionar un anticuerpo específico que bloquea la cadena  $\beta$  del IL-2R en estas células se observa una inhibición de la proliferación. Por esta razón se sugiere que la expresión de la cadena  $\beta$  parece ser necesaria para el crecimiento celular del tumor y que la IL-2 endógena puede estar involucrada en la regulación del crecimiento tumoral, ya que se ha demostrado que esta IL-2 es biológicamente activa (Alieche *et al.*, 1993; Mc Millan, *et al* 1995).

Con el descubrimiento de que las células tumorales no linfoides humanas son capaces de producir citocinas, existe la posibilidad de una estimulación autócrina del crecimiento celular del tumor, lo cual conduce a mantener en el microambiente tumoral las condiciones adecuadas para continuar con esta proliferación (Wu *et al.*, 1993).

#### **e. Proteínas con actividad de cinasa de tirosina**

Las proteínas cinasas de tirosina (PTK) constituyen una clase de enzimas que catalizan la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato, principalmente del ATP (Flockhart, 1984) y en algunos casos del GTP, al grupo fenólico de la tirosina presente en ciertas proteínas. Aunque la fosforilación en residuos de tirosina constituye menos de un 0.01% del total de la fosforilación intracelular (Soto *et al.*, 1999), el descubrimiento de que el producto del gen transformante del virus del sarcoma de Rous era una proteína cinasa que fosforila residuos de tirosina, supuso un gran impulso para el estudio de estas enzimas. Desde entonces una gran variedad de PTKs han sido identificadas como oncogenes (Hunter *et al.*, 1998). Estas enzimas son importantes mediadores de transducción de señal desde el exterior al interior de la célula, además de efectores intracelulares para algunos receptores de hormonas de crecimiento (Veillette *et al.*, 1989). De los más de 90 genes codificadores para PTKs que existen en el genoma humano, 58 codifican para

receptores con actividad PTK (PTK-receptor) clasificadas en 20 subfamilias y 32 codifican para PTK citosólicas clasificadas en 10 subfamilias (Hoessli *et al.*, 2000).

#### **f. Fosforilación**

La fosforilación es el tipo de modificación post-traducciona l más frecuente en las células eucarióticas. Se caracteriza por ser reversible y específica de residuo, participando en el control de numerosos procesos fisiológicos. Las actividades proteicas generalmente reguladas por fosforilación son: plegamiento estructural correcto; incremento o inhibición de la actividad enzimática; sitio de unión para el ensamblaje de otras proteínas; sitio de reconocimiento para otra modificación posterior y cambios en la localización subcelular (Preisinger *et al.*, 2008).

Las proteínas encargadas de realizar este proceso son las proteínas-cinasas, existiendo más de 500 en humanos, lo cual supone el 2% de nuestro genoma (Manning *et al.*, 2002). El número estimado de sitios de fosforilación en el proteoma de mamíferos sería del orden de  $10^5$ , y se supone que entre un 30-50% de las proteínas podrían ser fosforiladas en algún momento. La fosforilación ocurre más frecuentemente en residuos de serina y treonina que en los de tirosina, con un radio aproximado de 1800:200:1 para pSer/pThr/pTyr (Kalume *et al.*, 2003).

#### **g. Janus cinasa (JAK)**

Las proteínas Janus cinasas (JAK) son componentes cruciales de diversas vías de señalización involucradas en supervivencia celular, proliferación, diferenciación y apoptosis.

Su función puede integrar componentes de diferentes cascadas de señalización. La fosforilación de los receptores de factores de transcripción y de citocinas puede ser la función principal atribuida a las cinasas JAK, considerando que este es un primer punto de regulación de activación río abajo en la cascada de señalización (Rane y Reddy, 2000).

Varios eventos pueden observarse después de la activación de las JAK, incluyendo: el reclutamiento y la activación de STAT, el reclutamiento y activación de la vía Shc-Grb2-Sos-Ras-Raf1-MAPK, llevando a la transcripción de los genes tempranos (c-fos, c-jun); y la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRSs), seguido por el reclutamiento y activación de la PI-3K (Notarangelo *et al.*, 2001).

Los dominios estructurales que caracterizan a la familia de las JAK se conocen como dominios de homología JAK (JH), estos dominios van de JH1 a JH7. (Figura.3) (Rane y Reddy, 2000).

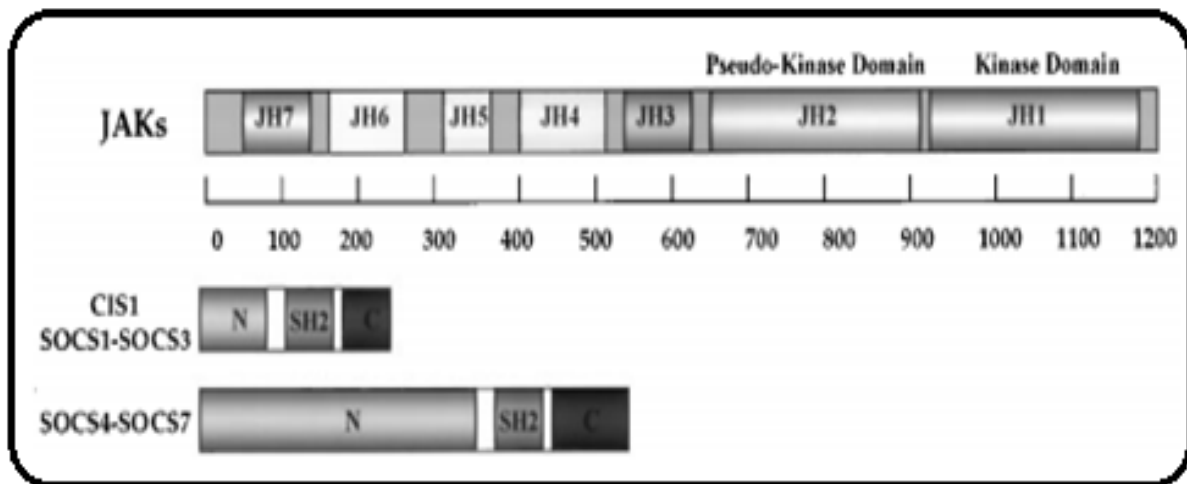


Figura 3. Organización estructural de las Janus cinasa (JAK). JH1 presente en el carboxilo terminal es el dominio catalítico para la actividad enzimática por constar con tirosinas conservadas; el pseudodominio cinasa JH2 es un dominio estructuralmente similar a una tirosina cinasa y esencial para una actividad normal cinasa, sin embargo, carece de actividad enzimática. Los dominios JH3-JH4 comparten homología con SrcS y del JH5 al JH7 comparten homología con los dominios FERM. Se muestran también las estructuras reguladoras CIS y SOCS. Tomada de Rane y Reddy, 2000.

Numerosos estudios muestran que las cinasas JAK están involucradas en señalización activada por interleucinas como IL2, IL4, IL7, IL9 e IL15. La cinasa JAK3 transmite señales al ser activada por IL2, IL4, IL7 e IL19. La activación de las JAK puede ser constitutiva o por la presencia de un ligando. Al fosforilarse los sitios de fosfotirosina presentes en el receptor pueden servir como sitios de unión para el dominio SH2 de moléculas de señalización como STAT, Src-cinasas, proteínas fosfatasas u adaptadores de proteínas de señalización como Shc, Grb2 y Cbl (Rane y Reddy, 2000).

Las JAK tienen diferentes sustratos incluyendo los receptores a los que se une. Las STAT se encuentran entre las proteínas mejor caracterizadas que funcionan como sustrato de las cinasas JAK.

#### **h. Traductor y activador de la señal de transducción (STAT)**

Al menos siete STAT han sido identificadas en los mamíferos, dentro del rango de 90 a 115kDa (Figura. 4).

Las STAT comparten algunos dominios con alta homología. Se han demostrado dos papeles funcionales para el dominio SH2. Primero este dominio es requerido para la fosforilación de Tirosinas (Tyr) de las STATs en respuesta a la estimulación con citocinas; además, estos dominios median la activación específica de las STATs en respuesta a la estimulación. La segunda función de los dominios SH2 es la formación de dímeros (Shuai, 1999). Para formar los dímeros, el dominio Src de homología 2 (SH2) de un monómero se une a una fosfotirosina opuesta de otra STAT o de alguna molécula; esta tirosina en las STAT, la cual se encuentra cerca de C-terminal está altamente conservada, y es fosforilada en respuesta a los ligandos (Kiu-Nicholson, 2012; Lin-Leonard, 2000).

Las STAT juegan un papel importante en las vías de transducción de señal asociadas con varias citocinas, neuroquinas incluyendo las interleucinas, los interferones, la eritropoyetina, la prolactina, la hormona del crecimiento, la oncostatina M (OSM) y el factor neutróficociliar (CNTF).

Los factores de transcripción STAT3 y STAT5 existe en 2 isoformas: STAT3A y STAT3B; STAT5A y STAT5B. Las dos proteínas presentan homología (Rane y Reddy, 2000).

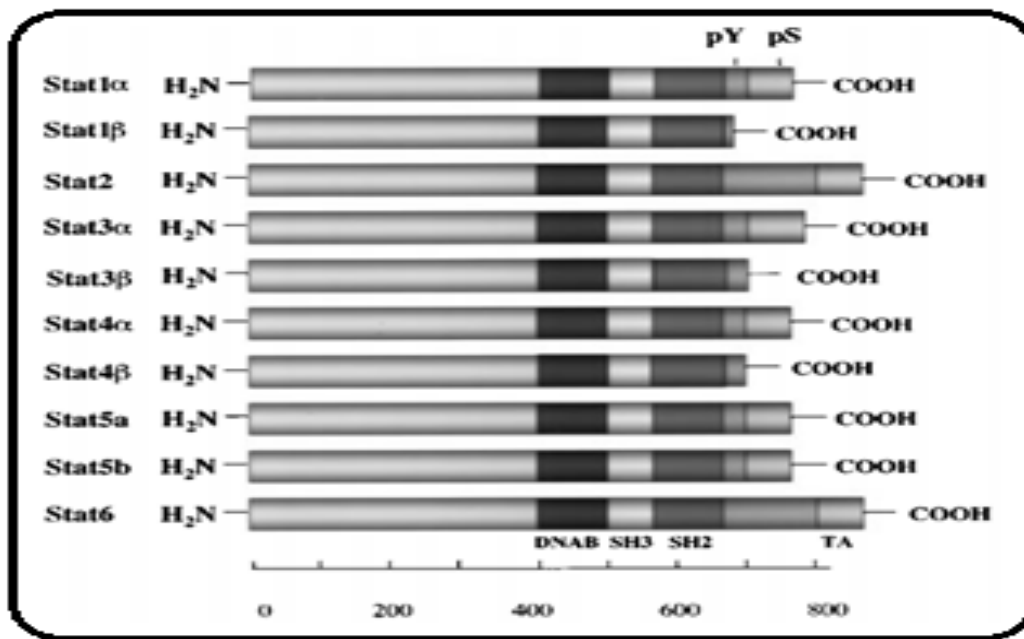


Figura 4. Organización estructural de las STAT. Familia conformada por STAT1, STAT2, STAT3, STAT4 y STAT6. Los factores de transcripción STAT3 y STAT5 existe en 2 isoformas: STAT3A y STAT3B; STAT5A y STAT5B. Tomada de Rane y Reddy, 2000.

La región amino terminal de las STAT está bien conservada y parece ser indispensable en su función, ya que con pequeñas deleciones en esta región se elimina la capacidad de STAT para ser fosforilada (Rane y Reddy, 2000).

### i. Vía de señalización JAK-STAT

Hasta hace pocos años se ha descrito una vía de señalización, que inicia en el citoplasma y que rápidamente se trasloca al núcleo para activar la transcripción de genes.

Los eventos de fosforilación de tirosina son esenciales para el inicio de esta vía de señalización.

La vía JAK-STAT fue originalmente descubierta a través del estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón. Entretanto se han encontrado un gran número de citocinas, hormonas y factores de crecimiento que activan a las proteínas JAK y STAT. Las proteínas JAK son la única clase de proteínas con actividad de tirosina cinasa que se asocian con receptores de

citocinas. En la unión del ligando las cinasas JAK activan a los miembros de la familia de las STAT (Heim, 1999).

El primer paso en el proceso de señalización a través de citocinas, es la inducción por ligando de la homo o heterodimerización de los componentes de los receptores, cuyas regiones citoplasmáticas están acopladas con moléculas de señalización (Cosman *et al.*, 1990). El siguiente paso, es la transfosforilación y activación de las proteínas JAK asociadas al receptor, una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2) de las STAT, así como para otras moléculas, tales como la proteína adaptadora Shc (Cacalano *et al.*, 1999).

STAT3 y STAT5 fosforiladas forman homodímeros y se translocan al núcleo para servir como factores de transcripción que activan genes que promueven la supervivencia e inhiben la apoptosis, como Bcl-xl, p27, p21, ciclina D1, etcétera (Geddis *et al.*, 2002).

La fuerza cinética y especificidad de la vía JAK-STAT está modulada a muchos niveles por distintas proteínas, la clave de la regulación incluye proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) y las proteínas inhibidoras de la activación de STAT (PIAS), así como varias proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs) (Shuai y Liu, 2003).

La modulación de la vía JAK-STAT, por modificaciones de proteínas y el cross-talk entre diferentes JAK-STAT y otras vías de señalización celular proporcionan diferentes niveles de regulación que pueden ser muy importantes para la vía (Shuai y Liu, 2003).

El proceso de señalización a través de las citocinas es la inducción por ligando ya sea homo o heterodimerización de los componentes de los receptores cuyas regiones citoplasmáticas están acopladas con moléculas de señalización (Taniguchi, 1993). Posterior a esto se lleva a cabo la transfosforilación y activación de las JAK asociadas al receptor, una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src (SH2) de las STAT, así como para otras moléculas, tales como la proteína adaptadora Shc (Taniguchi, 1993).

Las STAT son reclutadas por el receptor fosforilado, para que a su vez sean fosforiladas por las JAK. Las proteínas STAT después de ser fosforiladas, se dimerizan, se translocan al núcleo, y estimulan la expresión de los genes inducibles por citocinas. (Valle y Soto, 2005). Figura 5.

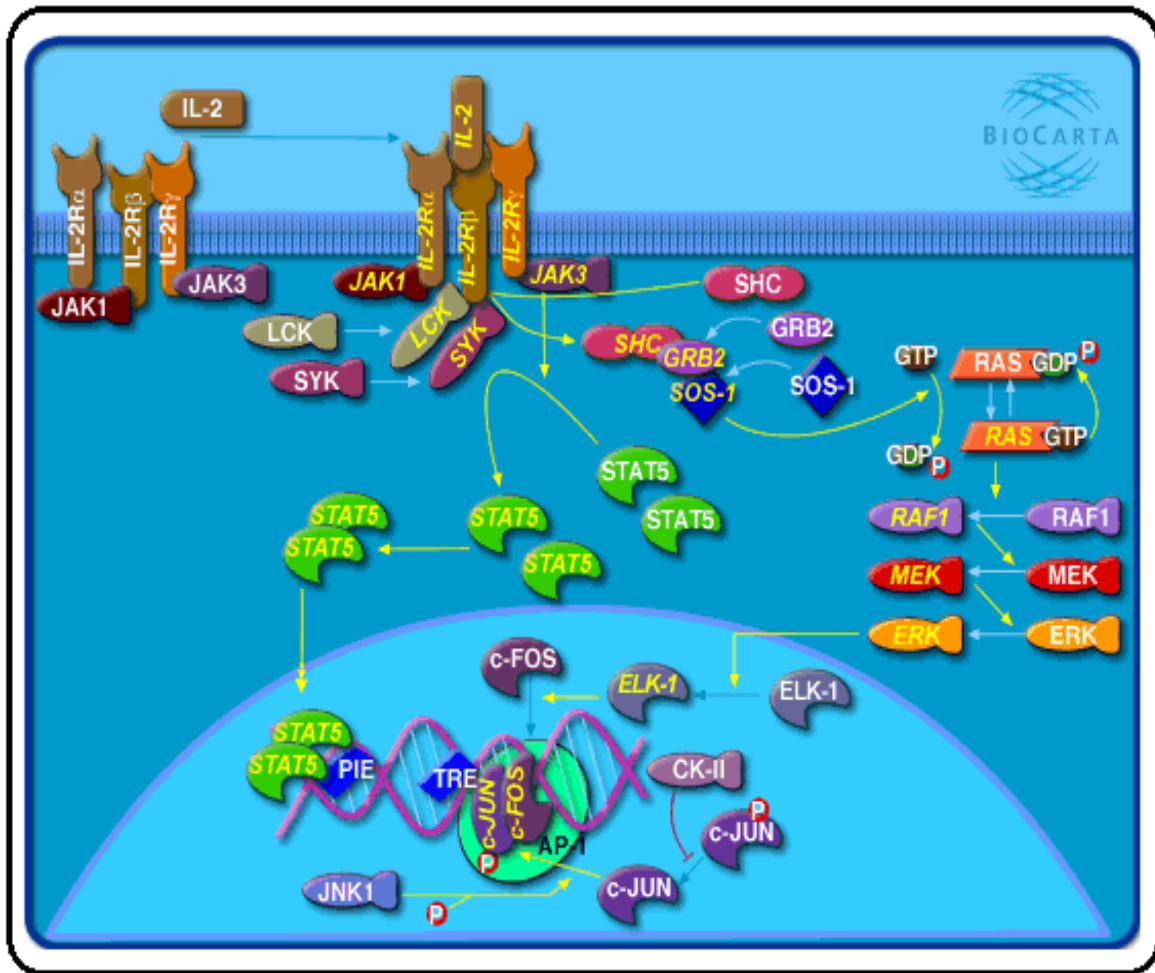


Figura 5. Vía de señalización JAK-STAT. Cuando el ligando activador de la vía se une con su receptor, las cinasas se transfosforilan y fosforilan la parte citoplasmática del receptor, esta transfosforilación recluta la maquinaria de transcripción, en este caso las proteínas citoplasmáticas STAT, éstas proteínas son fosforiladas por las cinasas, dimerizan, migran a núcleo y se ensamblan en el DNA permitiendo la transcripción de genes involucrados en proliferación celular. de Tomada de <http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>

## j. Apoptosis

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo.

La apoptosis es la muerte celular que se acompaña de cambios morfológicos como reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (cariorexis), con escasa o nula modificación ultraestructural de los organelos citoplasmáticos, formación de cuerpos apoptóticos y integridad de la membrana plasmática hasta que el proceso finaliza. Cambios bioquímicos: proceso activo dependiente de ATP, síntesis de macromoléculas, transcripción de genes *de novo*, fragmentación específica del DNA y pre-lítica del DNA. Proceso fisiológico: muerte de células individuales, muerte inducida por estímulos fisiológicos o patológicos y sin respuesta inflamatoria (Wlodkowic *et al*, 2011).

La apoptosis es un proceso altamente selectivo, es importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La desregulación de este proceso puede conducir a estados patológicos que involucran enfermedades con excesiva acumulación celular o con excesiva pérdida celular (Rojas *et al.*, 2009).

Las dos vías apoptóticas comúnmente descritas son la intrínseca (mitocondrial) y la extrínseca (o del receptor de muerte) (Taylor *et al*, 2008). (Figura. 6).



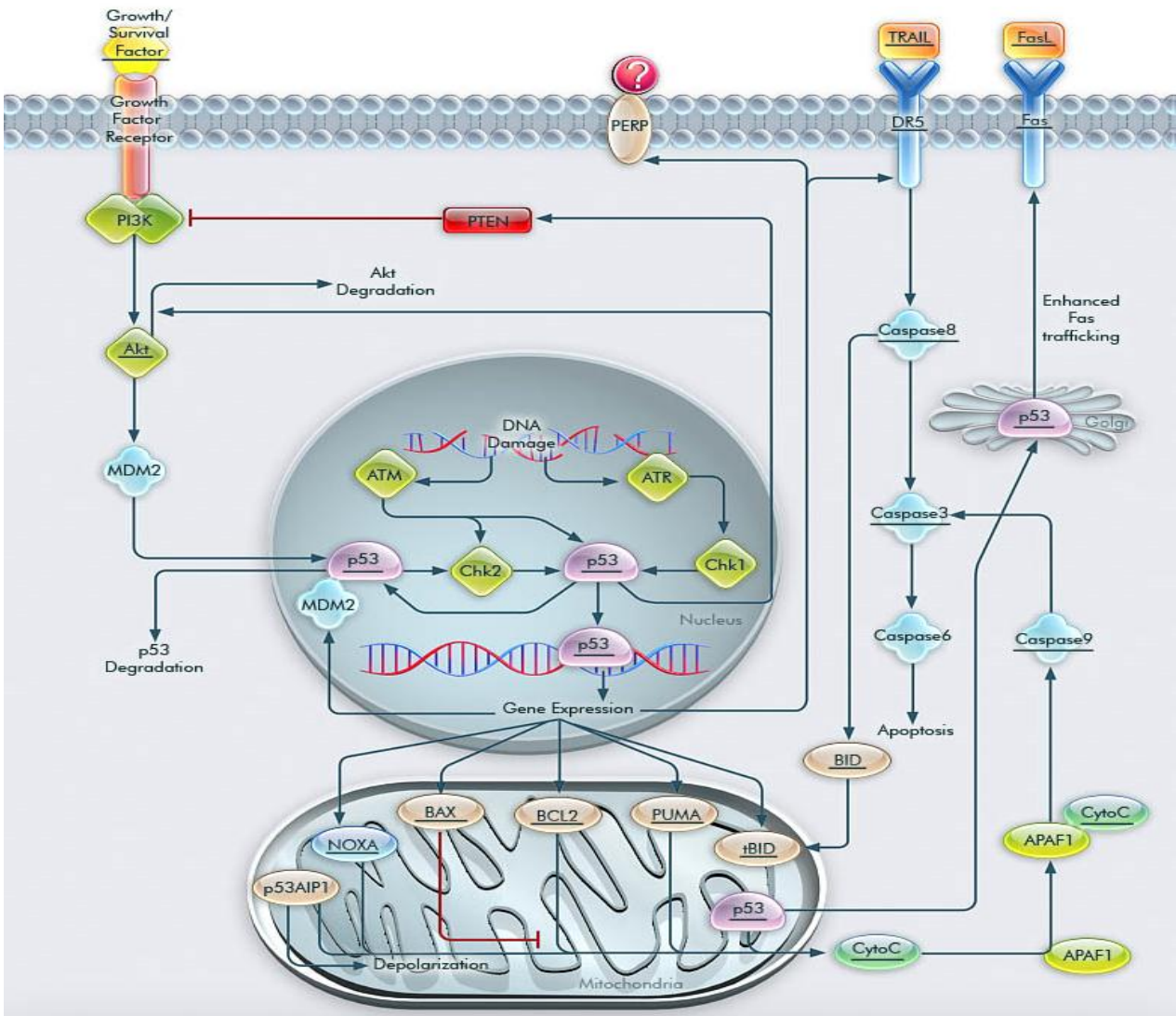


Figura 6. Apoptosis. La vía extrínseca de la apoptosis involucra interacciones mediadas por receptores transmembranas. (FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR1) que activan la cascada de caspasas. La vía intrínseca de la apoptosis puede ser desencadenada por daño en el ADN o estrés celular. Esto activa la expresión del gen supresor de tumores p53. Algunos genes participantes del el proceso proapoptótico son como Bax y Bik, los antiapoptótico como Bcl-2 y Bcl-XL. Tomada de <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/p53-mediated-apoptosis-pathway.htm>

Las proteínas STAT median citocinas y factores de crecimiento que inducen señales que culminan en varias respuestas biológicas, incluyendo proliferación y diferenciación. Estudios indican que las STAT están estrechamente relacionadas con el proceso apoptótico. Dependiendo del ligando y del tipo de célula las STAT pueden mediar señales anti y pro apoptóticas. Las STAT3 y STAT5 han sido implicadas en promover supervivencia celular. Recientes estudios demuestran que la regulación de la apoptosis por las STAT es muy importante debido a la activación

transcripcional de genes que codifican para proteínas que desencadenan el proceso de muerte celular. Por ejemplo BCL-xL, caspasas, Fas y TRAIL (Lessene *et al.*, 2008), así como proteínas que regulan progresión del ciclo celular como: p21waf1, p53, p16kip, Rb, las ciclinas D, ciclina E entre otras (Taylor *et al.*, 2008)

Es destacable que las proteínas STAT pueden regular apoptosis a través de un mecanismo no transcripcional inhibiendo la proteína apoptótica NF-kappaB.

Considerando que la desregulación de las STAT en células tumorales es común, es posible que los mecanismos subyacentes a la regulación de la supervivencia celular, puedan representar estrategias exitosas para usar las proteínas STAT como blanco en la terapia contra el cáncer (Wlodkowic *et al.*, 2011)

#### **k. Ciclo celular**

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas. Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico. La alta incidencia de cáncer como una función de la longevidad celular sugiere que múltiples alteraciones génicas se requieren para el proceso de tumorigénesis. Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica, y por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), los cuales determinan el orden de los eventos en dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN (Peralta *et al.*, 1997)

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios complejos enzimáticos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas y los complejos que se forman entre ambas. Las formas activas de los complejos CDK-ciclina están constituidos de dos proteínas (una cinasa y una ciclina). Las cinasas son enzimas que realizan la fosforilación de proteínas y este evento es de gran importancia para la regulación del ciclo celular (Malumbres-Barbacid, 2009). (Figura. 7).

Los complejos CDK-ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. La dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDK-ciclina, entre otros muchos sucesos. Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige (Malumbres-Barbacid, 2009).

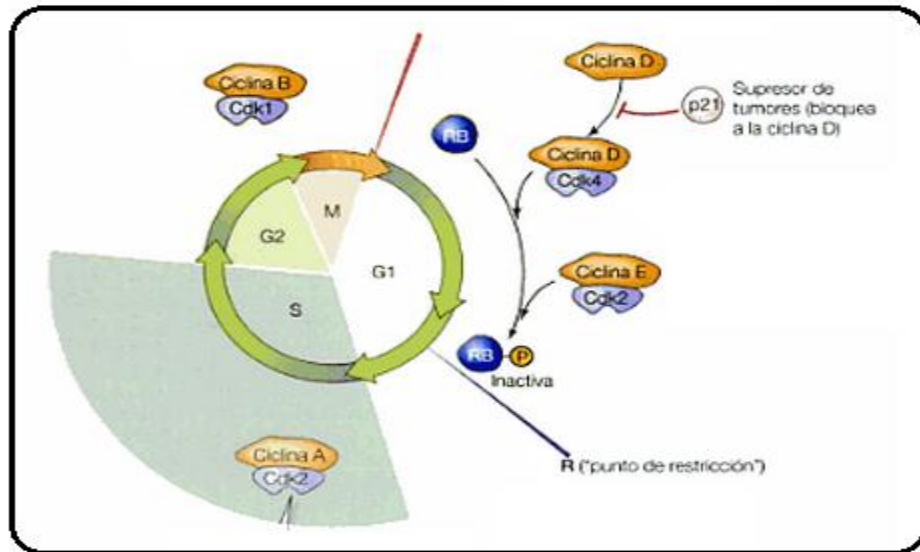


Figura 7. Ciclo celular. El ciclo celular es un conjunto ordenado de fases ( $G_1$ -S- $G_2$  y M) que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. El ciclo está regulado por la presencia de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Tomada y modificada de Purbes 2009.

### III. Planteamiento del problema

En el año 2010 en México, el CaCu ocupó el segundo lugar de los principales tumores malignos que afectaron a la población femenina.

En los últimos años se han realizado investigaciones que han permitido el avance en el conocimiento de la etiología, diagnóstico y tratamiento del CaCu. En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las líneas celulares derivadas de CaCu de pacientes mexicanas CALO e INBL expresan el receptor funcional para IL-2, una vez activado este receptor participa en la activación de la vía JAK-STAT (involucrada en proliferación celular). Se ha reportado que con el tratamiento de 100UI/ml de IL-2 se activan más del 50% de linfocitos de sangre periférica *in vitro*, se inhibe la proliferación de células de CaCu (CALO e INBL) tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, se desconoce el papel que juega la IL-2 en el CaCu así como su vía de señalización, por ello es importante establecer el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre células de cáncer de cérvix y dilucidar su papel sobre la proliferación celular y la fosforilación de las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5.

#### **IV. Hipótesis**

Si se trataran células de cáncer de cérvix con 100UI/ml de IL-2 se podría inhibir la fosforilación de las cinasas JAK3 y por tanto inactivar los factores de transcripción STAT3 y STAT5 lo que provocaría disminución de la proliferación y activación de vías apoptóticas permitiendo así la muerte de las células tumorales.

#### **V. Objetivo General**

Analizar el efecto de 100UI/ml sobre la proliferación celular y la vía de señalización JAK-STAT en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

#### **VI. Objetivos Particulares**

1. Determinar el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre:
  - La proliferación de las líneas celulares CALO e INBL.
  - La fosforilación de las cinasa JAK 3 y de los factores de transcripción STAT3 y STAT5 en las líneas celulares CALO e INBL.
2. Determinar si el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 induce apoptosis de las líneas celulares CALO e INBL

## VII. Metodología científica

**Material biológico:** Las líneas celulares CALO (HPV 18, deriva de un carcinoma escamoso invasor del cérvix estadio IIB) e INBL (HPV 18, deriva de un carcinoma escamoso invasor estadio IVB) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal de bovino. Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>, 37° C y humedad saturante.

### Tinción con cristal violeta

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células de cáncer de cérvix CALO e INBL, en placas de 24 pozos (NUN, Dinamarca), se incubaron por 24 horas a 37° C con RPMI-1640 (Microlab, México) al 0.5% de suero fetal bovino (SFB; invitrogen, USA), transcurrido este tiempo se cambió el medio por medio fresco al 5% y se trataron con 100U de IL-2 por 24, 48, 72 y 96 horas. Una vez transcurrido el tiempo se desechó el medio, las células fueron fijadas con glutaraldehído (SIGMA, USA) al 1.1%. Posteriormente fueron teñidas con cristal violeta (SIGMA, USA) al 0.1%, el cual se incorporó a los ácidos nucleicos, finalmente se agregó ácido acético ( al 10% y se leyó en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 750nm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y en 3 ensayos diferentes.

### Lisis celular e inmunoprecipitación

Se sembraron  $2 \times 10^6$  células por caja, se incubaron toda la noche a 37° C con RPMI-1640 al 0.5% de SFB, transcurrido este tiempo se reemplazó el medio con 1ml de medio RPMI-1640 libre de suero y se incubaron por 15 minutos. Pasado este tiempo se estimularon las células de cada línea con 100 UI/ml de IL-2 (R&D Systems), por 1, 10 y 30 minutos para determinar el tiempo en que se presenta la máxima activación de las proteínas. Se lisaron las células con buffer de lisis en presencia de inhibidores de proteasas (1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 140 mM

NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1% aprotinina, 1  $\mu$ M leupeptina, 1  $\mu$ M pepstatina y 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>).

Se obtuvieron lisados celulares y se incubaron con esferas de agarosa conjugadas con proteína A (Invitrogen, USA) previamente acopladas al anticuerpo (Santa Cruz, USA) específico para las proteínas de interés, durante tres horas a 4° C con agitación constante. Las esferas se lavaron con buffer de lisis 2 veces y se agregaron 25  $\mu$ l de buffer de Laemmli reductor a cada tubo, se hirvieron por 5 min y se guardaron a -20° C.

### **Electroforesis (SDS-PAGE) y Western blot**

La electroforesis SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (Sigma, USA) (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS (Sigma, USA), y las concentraciones de acrilamida (Invitrogen, USA) usadas fueron 12.5% y 10% p/v). Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma, USA) y tetrametileno-diamina (TEMED; Sigma USA) para el gel separador ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. El buffer de corrida (pH 8.3) contenía 0.025 M Tris, 0.192 M glicina (Invitrogen, USA). Se utilizaron marcadores de peso (Gibco, USA) en el rango de 200 a 16 kDa.

La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85V por 2 horas en una cámara vertical (ATTO, Japón).

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (Biorad, USA) según el método de Kyhse- Andersen (Valle, 2001) en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 125 mA durante 1.5 horas utilizando para este fin buffer de transferencia. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloqueó con albúmina bovina al 1% (p/v) en buffer TBS durante toda la noche a 4°C.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina (1:2000) durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo

de la incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween por 5 minutos cada uno y se reveló utilizando quimioluminiscencia (Pierce, USA).

### **Elución de anticuerpos**

Esta técnica se utiliza para probar anticuerpos diferentes sobre una misma membrana, en este caso se utilizó para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas en tirosina.

- Lavar la membrana 1 vez con TBS
- Incubar con buffer de elución durante 1 hora a 70-80°C
- Lavar 1 vez con TBS-Tween por 15min. con agitación constante.
- Lavar 3 veces con TBS-Tween por 5 min. cada una
- Bloquear toda la noche con BSA 3%

Una vez hecho esto se puede probar otro anticuerpo sobre la membrana, los anticuerpos probados fueron anti-JAK 3, STAT3 y STAT5, la dilución de estos anticuerpos fue de 1:1000, se incubaron por 2 horas, se lavaron las membranas con TBS-Tween 5 veces 5min/cu. Estas membranas se incubaron con un anticuerpo secundario antiratón conjugado con HRP, a una dilución de 1:6000 en TBS-Tween-BSA 1% por 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las membranas 5 veces con TBS-Tween por 5min/cu. El revelado se hizo por quimioluminiscencia. Se realizaron 3 ensayos independientes.

### **Determinación de apoptosis**

Se utilizaron células sin teñir para determinar y ubicar la población celular en el citómetro, células con 200µl etanol al 96° por 20 minutos para inducir necrosis, células con 15µl campotecina (10mg/ml) por 48 horas para inducir apoptosis, células sin tratamiento para observar el comportamiento de muerte celular en condiciones normales y finalmente células tratadas con 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Se utilizaron  $1 \times 10^5$  células para cada condición experimental.

La detección de apoptosis se realizó mediante la tinción con Annexina-V, usando el kit PE Annexin-V apoptosis Detection Kit de (BD Pharmingen, USA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Se cultivaron las células durante 48hr adicionando los



compuestos de prueba, se despegaron las células y se tiñeron con PE Annexin V Apoptosis Detection Kit, siguiendo el protocolo del fabricante.

El porcentaje de células apoptóticas se midió usando un citómetro FACSAria II de BD. Los datos se analizaron utilizando el software Flowing software 2.5.0.

Se realizaron 3 ensayos independientes.

### **Determinación de las fases del ciclo celular**

La determinación del ciclo celular se realizó mediante la técnica de incorporación de yoduro de propidio (Sigma, USA), la cual consiste en sembrar  $1 \times 10^6$  células durante 48 horas adicionando los compuestos de prueba; las células se fijan usando etanol (JT Baker, USA) al 70% por 12 hrs y luego se elimina el RNA incubando con RNAsa (Sigma, USA) durante una hora a 37°C. Las células se incuban por 10 min con 3µL de yoduro de propidio (50mg/mL). Las fases del ciclo se determinaron usando un citómetro FACSAria II de BD, USA. Los datos se analizaron en el programa Flowing Software versión 2.5.1.

Se cultivaron células deprivadas de SFB, para sincronizar las fases del ciclo celular, células cultivadas con 10% de SFB sin tratamiento y células con 10% de SFB con tratamiento (100UI/ml de IL-2). Se realizaron 3 ensayos independientes.

## VIII. Resultados

### **Evaluación de la proliferación de las células de CaCu tratadas con IL-2.**

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las células de carcinoma de cérvix expresan el receptor para IL-2 funcional, mediante el cual se activa la vía JAK-STAT (Rangel *et al.*, 2010; Soto., *et al* 1999). También se ha demostrado la presencia de las cinasas JAK1 y JAK3, así como de los factores reguladores de la transcripción de la familia STAT (STAT1, STAT3 y STAT5) (Valle, 2001).

En este trabajo se analizó el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la proliferación de las células CALO e INBL y la fosforilación de las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5.

Para determinar el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la proliferación de CALO e INBL se realizaron ensayos de cinética de proliferación utilizando cristal violeta, por 24, 48, 72 y 96 horas. El ensayo se leyó en un lector de placas y se obtuvieron valores de D.O (nm).

**Cinética de proliferación de CALO.** El tratamiento de células CALO con 100UI/ml de IL-2 inhibe la proliferación a partir de las 24 horas en comparación con células sin tratamiento (Figura 8).

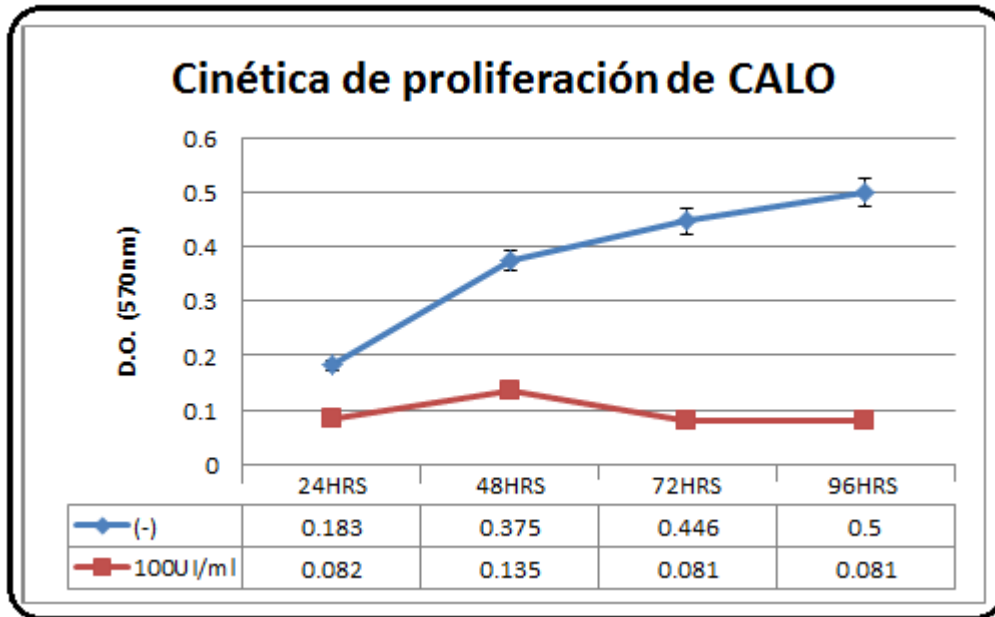


Figura 8. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la proliferación de células CALO por 24, 48, 72 y 96 horas. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

**Cinética de proliferación de INBL.** El tratamiento de células INBL con 100UI/ml de IL-2 inhibe la proliferación a partir de las 48 horas en comparación con células sin tratamiento (Figura 9).

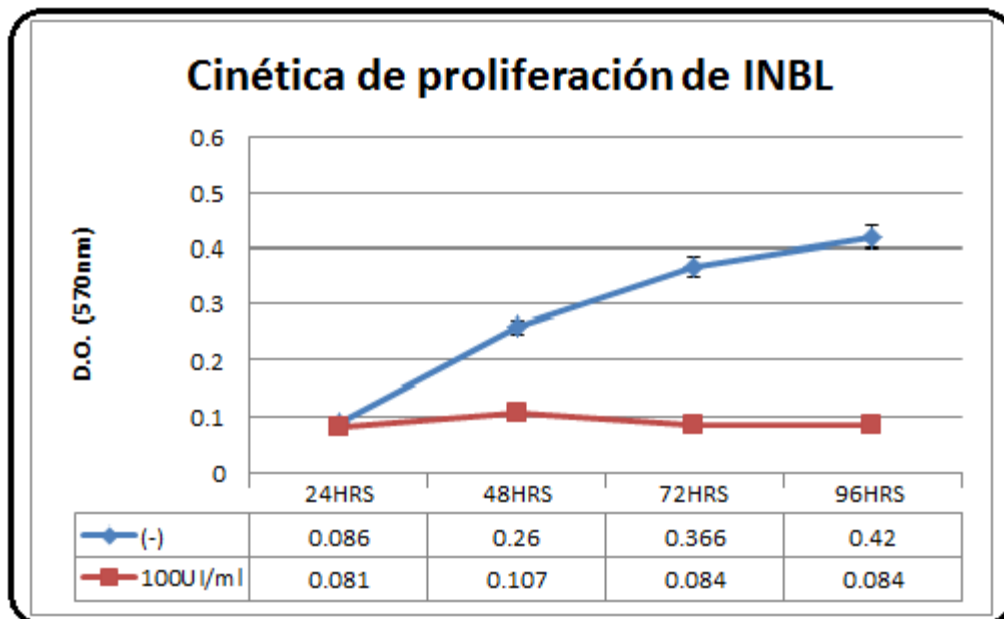


Fig. 9. Efecto de 100 UI/ml sobre la proliferación de células INBL por 24, 48, 72 y 96 hrs. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

**Fosforilación de la cinasa JAK3 en las líneas celulares CALO e INBL tratada con 100UI/ml de IL-2.** Se ha demostrado que la proliferación de las células de cáncer de cérvix CALO e INBL está relacionada con la fosforilación en tirosina de las proteínas involucradas en la vía de señalización JAK-STAT en respuesta a 10UI/ml de IL-2.

Para analizar el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre el patrón de fosforilación de la cinasa JAK3 se incubaron las células CALO e INBL en presencia de IL-2 por 1, 10 y 30 minutos.

Las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas mediante SDS-PAGE e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, posteriormente fueron analizadas mediante inmunoblot.

Las células sin tratamiento representan la fosforilación basal de las proteínas (control negativo). En ambas líneas celulares se observa fosforilación constitutiva sin tratamiento por lo que el control negativo representa el 100% de la fosforilación.

Tanto en las células CALO como en las células INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2 se observa mayor inhibición de la fosforilación a los 30 minutos de tratamiento en comparación con el control negativo, siendo más evidente en la línea celular INBL (Figura 10).

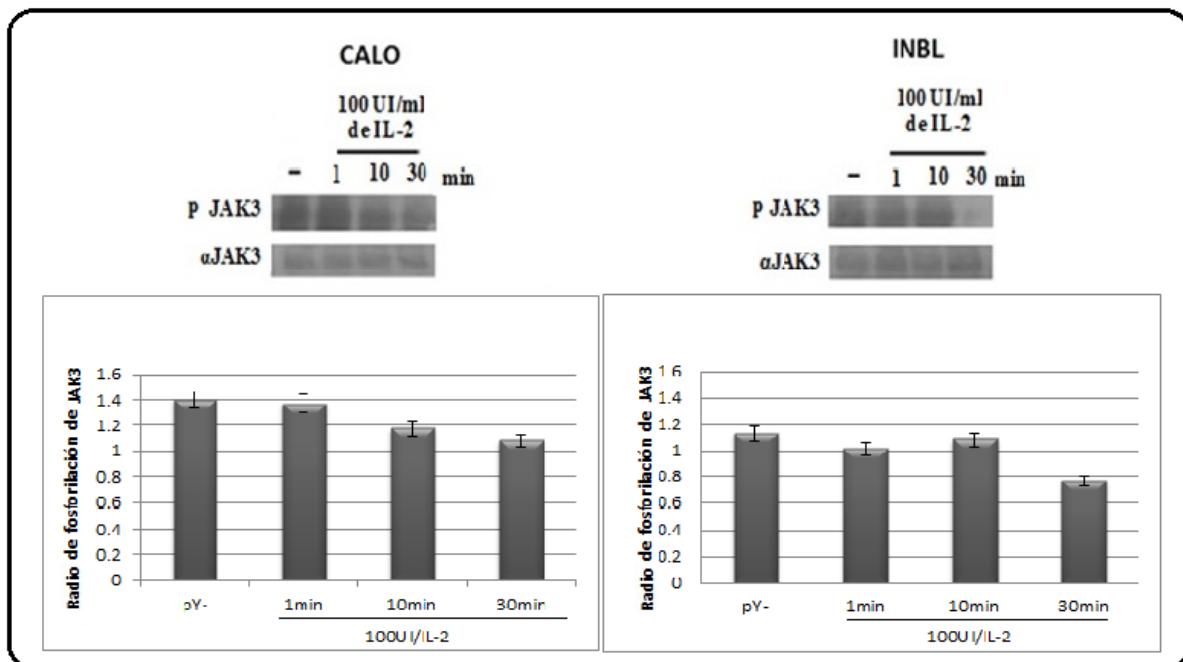


Figura 10. Efecto de 100 UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación de la cinasa JAK3 en las líneas CALO e INBL. El tratamiento se realizó con 100UI/ml de IL-2 durante diferentes periodos de tiempo. La cinasa JAK3 fue inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo anti-JAK3. El revelado se hizo en primer lugar con anti-pY. Para comprobar la presencia de JAK3, se eluyeron los anticuerpos, y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-JAK3. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico para obtener el radio de fosforilación y se obtuvo el porcentaje para cada caso. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

Para corroborar la identidad de la proteína JAK3 se utilizaron anticuerpos específicos anti-cinasa JAK3. Se eluyeron los anticuerpos anti-pY y las membranas se incubaron con anticuerpo específico anti-JAK3. Los resultados muestran que las proteínas reconocidas por el anticuerpo específico anti-JAK3 coinciden con las bandas reconocidas en el inmunoblot anti-pY, confirmando que se trata de JAK3 (125 KDa) (Figura 10).

Las proteínas STAT son fosforiladas por las cinasas JAK (Valle *et al.*, 2014), por lo tanto analizamos la fosforilación de STAT3 y STAT5, ya que activadas son capaces de inducir la activación de los genes encargados de la proliferación (c-myc, c-jun y c-fos) y de los genes antiapoptóticos (bcl-2, bcl-xL, bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) (Wlodkowic *et al.*, 2011)

Para analizar el patrón de fosforilación en tirosinas presentes en STAT3 y STAT5 se trataron las células CALO e INBL con 100UI/ml de IL-2 por 1, 10 y 30 minutos. Se

obtuvo el lisado celular, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot con anticuerpos anti-fosfotirosina (anti-pY), observándose proteínas fosforiladas en un rango de peso molecular correspondiente a las proteínas STAT (95kDa). Las bandas obtenidas tras el revelado fueron sometidas a un análisis densitométrico para obtener el radio de fosforilación con respecto al control.

**Fosforilación de STAT3 en las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2.** En ambas líneas celulares se observa fosforilación constitutiva de las proteínas STAT en células sin tratamiento.

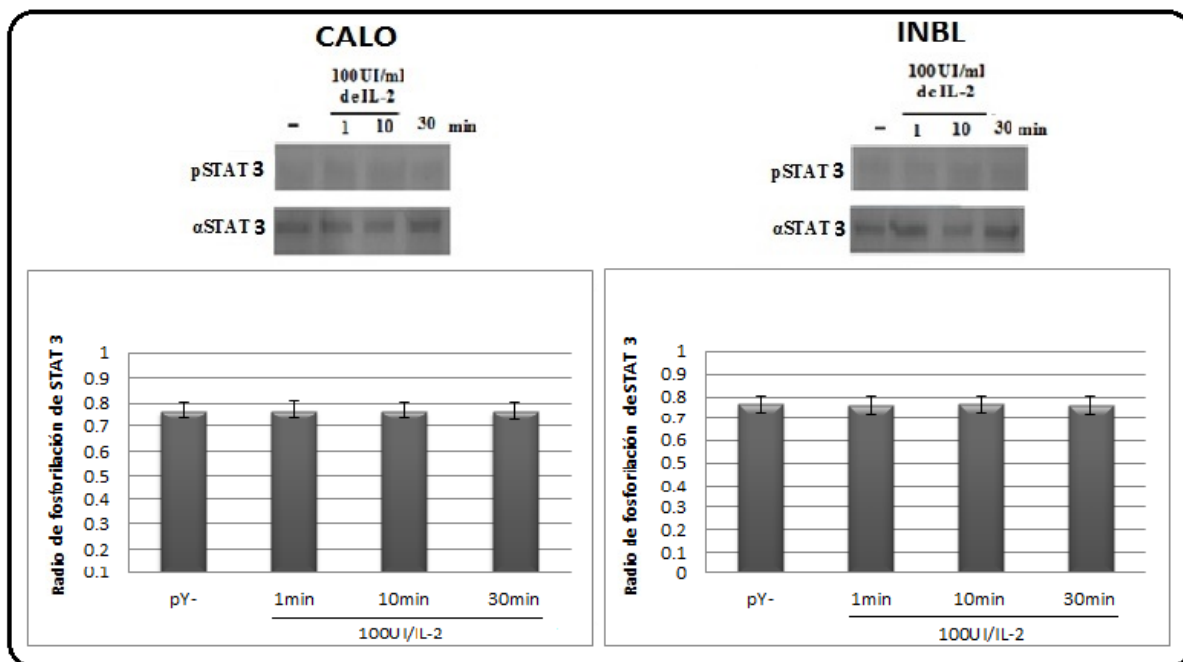


Figura 11. Efecto de 100 UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación del factor de transcripción STAT3 en las líneas CALO e INBL. La estimulación se realizó con 100UI/ml de IL-2 durante diferentes periodos de tiempo. La STAT3 fue inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo anti-STAT3. El revelado se hizo en primer lugar con anti-pY. Para comprobar la presencia de STAT3, se eluyeron los anticuerpos, y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-STAT3. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico para obtener el radio de fosforilación y se obtuvo el porcentaje para cada caso. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

Los resultados obtenidos al incubar las líneas celulares CALO e INBL con 100UI/ml de IL-2 muestran que no tiene efecto sobre la fosforilación del factor de transcripción STAT3 (Figura 11).

**Fosforilación de STAT5 en las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2.** Las células se trataron con 100UI/ml de IL-2 por 1,10 y 30 minutos para analizar su efecto sobre la fosforilación del factor de transcripción STAT5. En ambas líneas celulares se observa fosforilación constitutiva.

La inhibición de la fosforilación en células CALO tratadas con 100UI/ml de IL-2 se observó al minuto de tratamiento con respecto al control. Por el contrario, en las células INBL se observa a los 30 minutos de tratamiento.

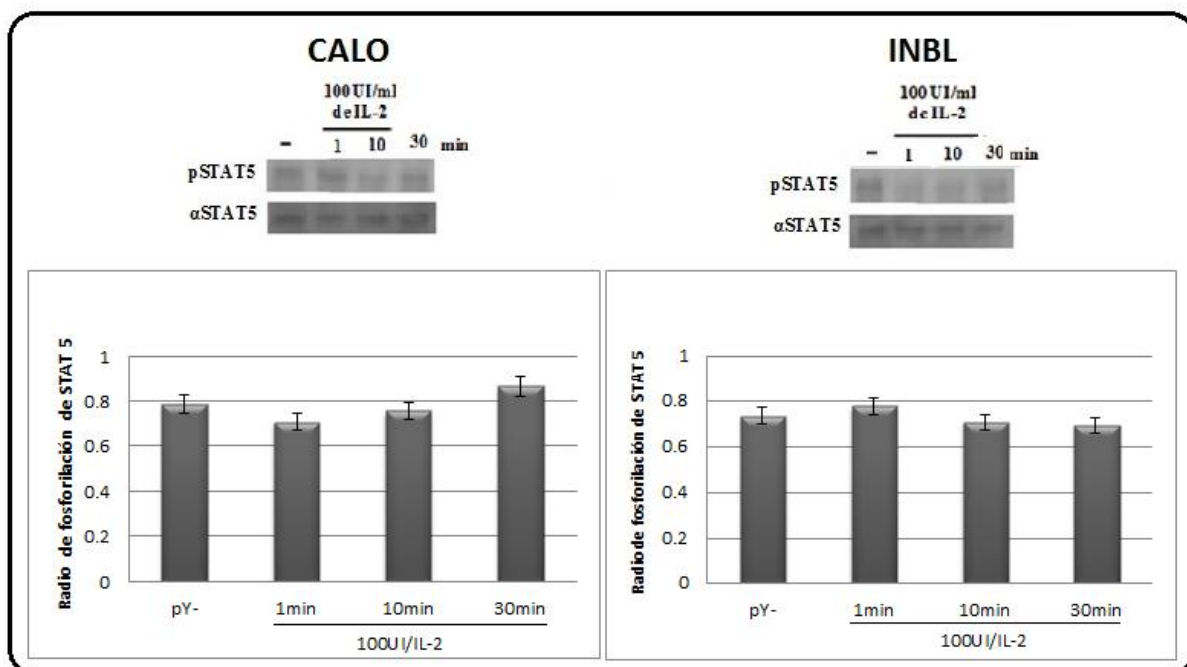


Figura 12. Efecto de 100 UI/ml de IL-2 sobre la fosforilación del factor de transcripción STAT5 en las líneas CALO e INBL. La estimulación se realizó con 100UI/ml de IL-2 durante diferentes periodos de tiempo. La STAT5 fue inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo anti-STAT5. El revelado se hizo en primer lugar con anti-pY. Para comprobar la presencia de STAT5, se eluyeron los anticuerpos, y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-STAT5. Posteriormente se realizó el análisis densitométrico para obtener el radio de fosforilación y se obtuvo el porcentaje para cada caso. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

### **Determinación de apoptosis en las líneas celulares CALO e INBL.**

Debido a que observamos que hubo disminución en la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL con el tratamiento de 100UI/ml de IL-2 analizamos si la inhibición de la proliferación se debía a un proceso apoptótico.

Para los ensayos de determinación de apoptosis se utilizaron células tratadas con un agente inductor de apoptosis (camptotecina) como control positivo, células sin tratamiento y células tratadas con 100UI/ml de IL-2. Las lecturas fueron obtenidas por citometría de flujo. Se leyeron 10, 000 eventos en total (100%).

Para la obtención de estos resultados se tomaron en cuenta los controles correspondientes (descritos en material y métodos) para ser comparados con células tratadas con 100UI/ml de IL-2. En ambas líneas se observó bajo porcentaje de apoptosis. Para las células CALO, se observó 51.78% de células en apoptosis en el control positivo y 13.35% de células en apoptosis en las células tratadas con 100UI/ml de IL-2 (Figura 13). En el caso de INBL, para el control positivo de apoptosis se observó 52.72% de células en apoptosis y en las células tratadas con IL-2 se observó un 10.25% de células en apoptosis. Los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo 48 horas después del tratamiento con IL-2 (Figura 14).



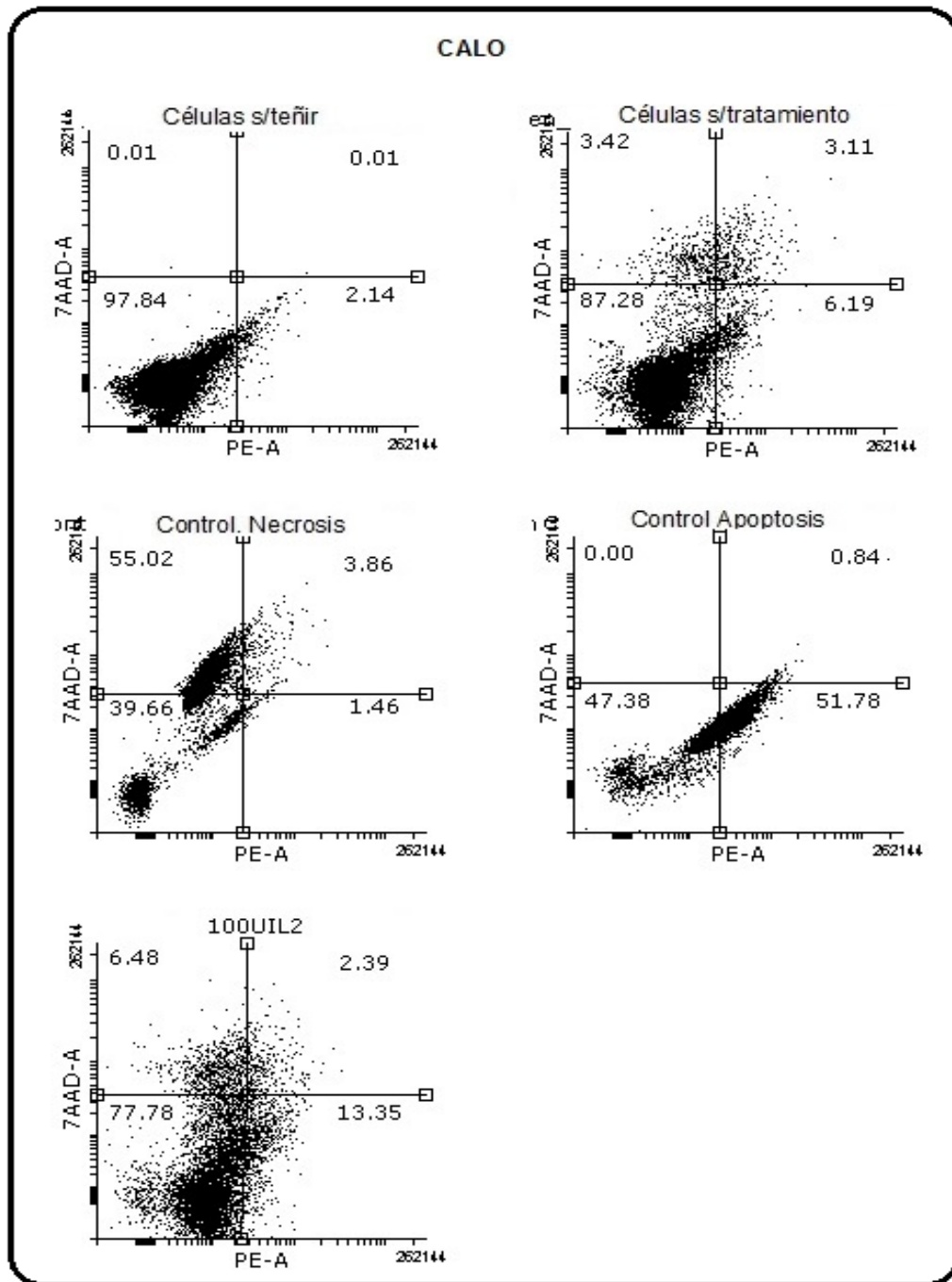


Figura 13. Determinación de apoptosis por la técnica de Anexina V. Línea celular CALO tratadas con 100UI/ml de IL-2. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en tres experimentos independientes.

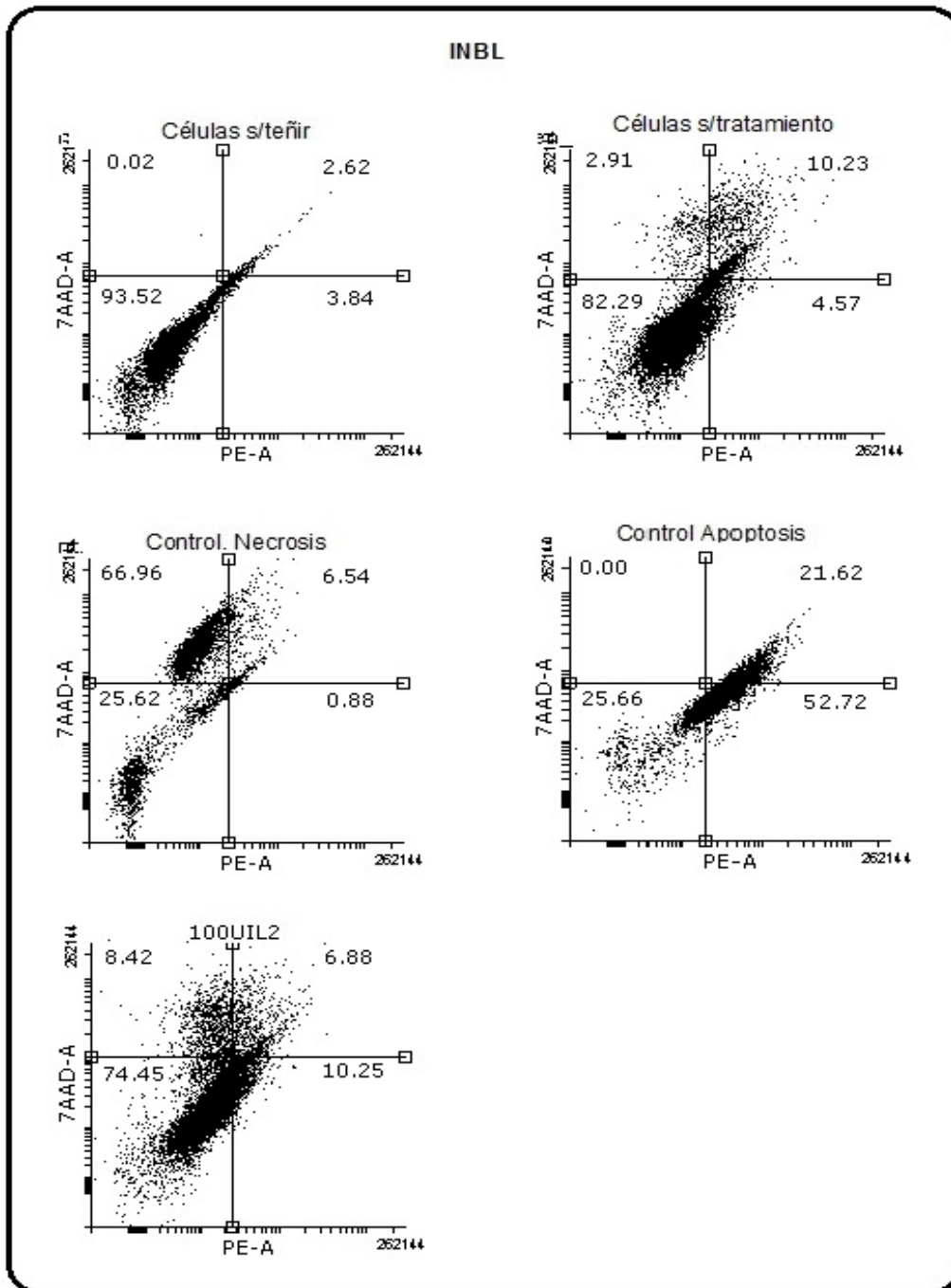


Fig. 14. Determinación de apoptosis por la técnica de Anexina V. Línea celular INBL tratada con 100UI/ml de IL-2. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en tres experimentos independientes.

Debido a que la disminución en la proliferación celular no se explica completamente por el bajo porcentaje de apoptosis encontrado, consideramos que la clave de la inhibición celular podría deberse al efecto que tienen 100UI/ml de IL-2 sobre las fases del ciclo celular de CALO e INBL.

Para cuantificar el porcentaje de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular de CALO e INBL se utilizaron células deprivadas de suero para observar la disminución de la proliferación celular, células sin tratamiento y células tratadas con 100UI/ml de IL-2. Los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo 48 horas después del tratamiento con IL-2.

**Determinación de las fases del ciclo celular en la línea CALO incubada con 100UI/ml de IL-2.** Las células con tratamiento de 100UI/ml de IL-2 presentan mayor porcentaje de células en la fase G1 (71.07%) y menor porcentaje de células en la fase S (19.72%) comparado con las células deprivadas (G1 68.56% y S 23.88%) y con las células sin tratamiento (G1 58.75% y S 33.49%). El porcentaje de células en G2/M es similar en las tres condiciones (Tabla 1 y Figura 14). Estos resultados sugieren que el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 arresta las células en la fase G1 del ciclo celular de las células CALO.

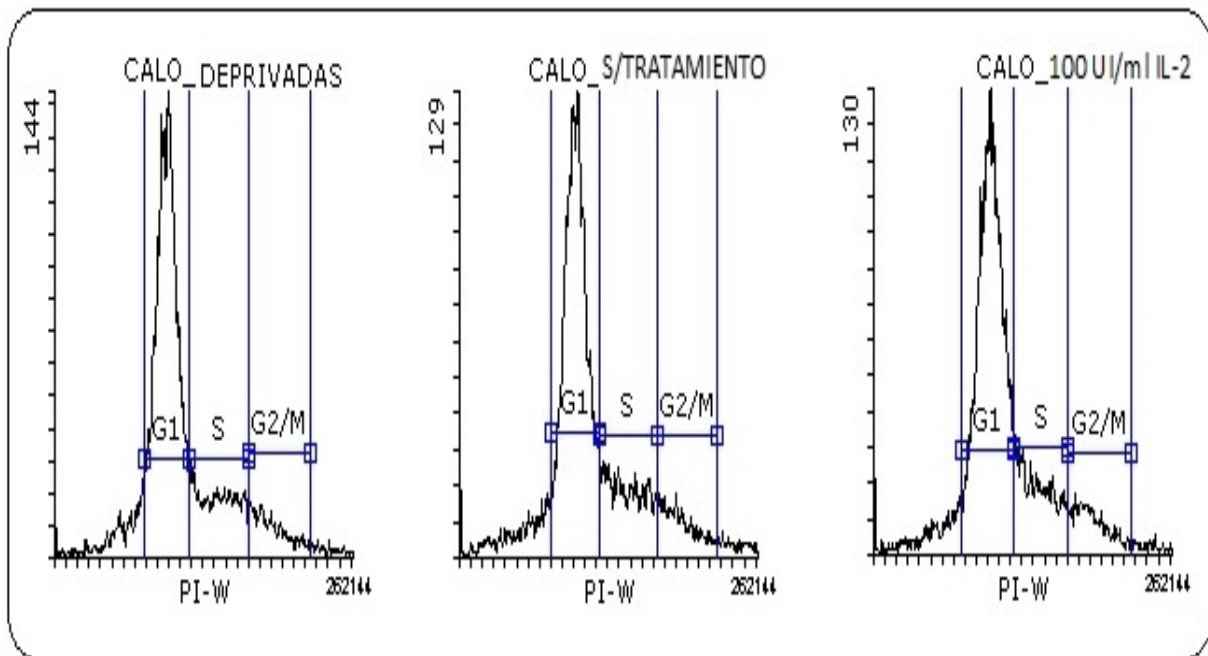


Figura 15. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre las fases del ciclo celular de la línea CALO. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células CALO y se cultivaron por 48 horas. Se usó un control de arresto celular (células deprivadas), células sin tratamiento en presencia de 10% de SFB y células con tratamiento en presencia de 10% de SFB. Se leyeron 10, 000 eventos para cada condición en el citómetro FACS ARIA II. Se llevaron a cabo en tres experimentos independientes.

Tabla 1. Porcentaje de células CALO encontradas en cada fase del ciclo celular.

Grupos	SUB G1	G1	S	G2/M
DEPRIVADAS	0.01%	68.56%	23.88%	7.55%
S/TRATAMIENTO	0.01%	58.75%	33.49%	7.74%
100 UI/ml IL-2	0.01%	71.07%	19.72%	9.19%

El ciclo celular fue determinado mediante el análisis por citometría de flujo. Se muestra la proporción de las fases G1, S, G2/M y células fuera de ciclo. Los datos mostrados corresponden a un ensayo representativo. Los experimentos fueron hechos por triplicado y se realizaron tres ensayos independientes.

**Determinación de las fases del ciclo celular en la línea INBL incubada con 100UI/ml de IL-2.** Las células con tratamiento de 100UI/ml de IL-2 presentan mayor porcentaje de células en la fase G1 (74.78%) y menor porcentaje de células en la fase S (21.50%) comparado con las células deprivadas (G1 69.67% y S 25.70%) y con las células sin tratamiento (G1 60.68% y S 32.20%). El porcentaje en G2/M en las células con tratamiento de 100UI/ml de IL-2 es el menor (3.71%), seguido de las células deprivadas (4.62%), el mayor porcentaje se observó en las células sin tratamiento (7.10%). (Tabla 2 y Figura 16). Estos resultados nos sugieren que el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 arresta las células en la fase G1 del ciclo celular de las células INBL.

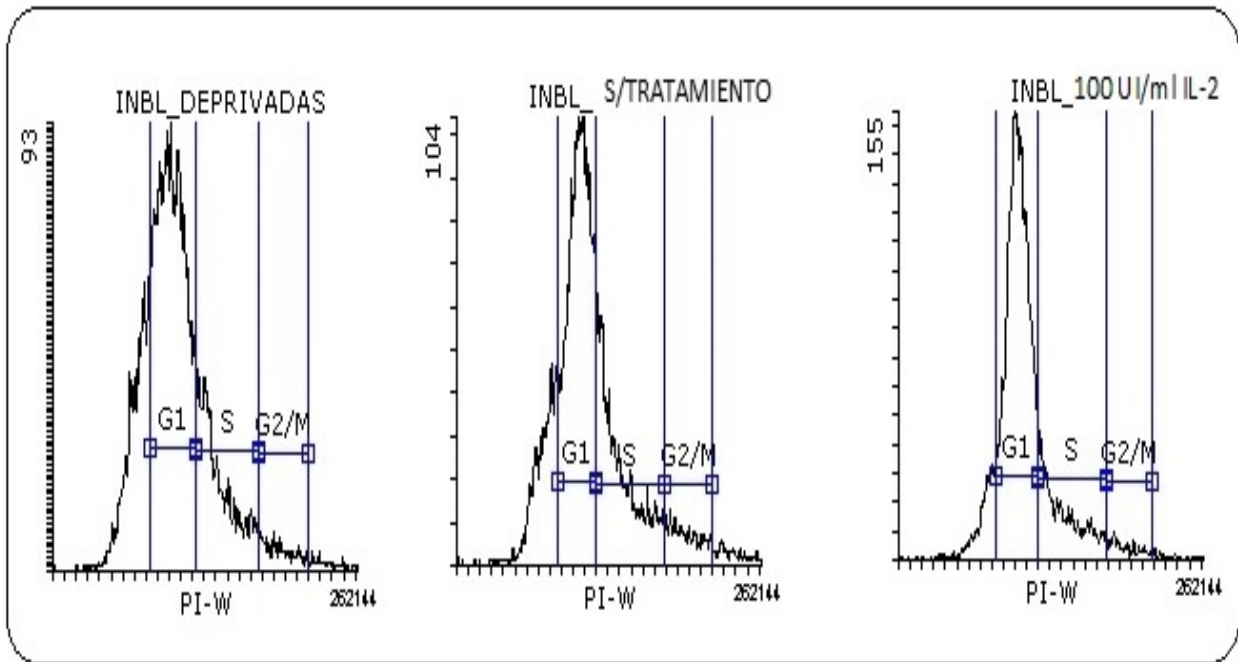


Figura 16. Efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre las fases del ciclo celular de la línea CALO. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células CALO y se cultivaron por 48 horas. Se usó un control de arresto celular (células deprivadas), células sin tratamiento en presencia de 10% de SFB y células con tratamiento en presencia de 10% de SFB. Se leyeron 10, 000 eventos para cada condición en el citómetro FACS ARIA II. Se llevaron a cabo en tres experimentos independientes.

Tabla 2. Porcentaje de células INBL encontradas en cada fase del ciclo celular.

Grupos	SUB G1	G1	S	G2/M
Deprivadas	0.01%	69.67%	25.70%	4.62%
S/Tratamiento	0.01%	60.68%	32.20%	7.10%
100UI/ml IL-2	0.01%	74.78%	21.50%	3.71%

El ciclo celular fue determinado mediante el análisis por citometría de flujo. Se muestra la proporción de las fases G1, S, G2/M y células fuera de ciclo. Los datos mostrados corresponden a un ensayo representativo. Los experimentos fueron hechos por triplicado y se realizaron tres ensayos independientes.

## IX. Discusión

La interleucina 2 (IL-2) ha sido utilizada como tratamiento para el melanoma metastásico, cáncer de riñón, de cabeza, de cuello y de esófago; también es una citocina capaz de activar los linfocitos del sistema inmune. Desde hace 20 años se han llevado a cabo estudios con IL-2, la cual se clasifica como un "modificador de la respuesta biológica", que modula la respuesta del organismo frente a las células cancerosas.

Aunque la IL-2 es utilizada en tratamientos contra diferentes tipos de cáncer, poco se sabe de su efecto sobre las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, las cuales se establecieron a partir de biopsias de pacientes mexicanas. En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las líneas celulares derivadas de carcinoma de cérvix CALO e INBL expresan el receptor para IL-2 y este es funcional ya que responden al tratamiento exógeno de IL-2 influyendo sobre la proliferación de dichas células (Rangel *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 1999). Se sabe que la IL-2 participa en la activación de la vía JAK-STAT la cual está involucrada en apoptosis y proliferación celular (Nagy *et al.*, 2013; Jonsthorpe *et al.*, 1995; Gilmour *et al.*, 1995).

Se han llevado a cabo diversas investigaciones considerando a la IL-2 como tratamiento potencial para diversos tipos de tumores considerando altas dosis para tratar melanoma avanzado (McDermott *et al.*, 2007) y el cáncer de cérvix en un modelo murino, en este caso utilizando células de CALO e INBL. (Rangel *et al.*, 1998)

Debido a lo mencionado anteriormente, en este trabajo se propuso analizar el efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la proliferación de las células de cáncer de cérvix y sobre la fosforilación de las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5.

Las líneas CALO e INBL fueron tratadas con 100UI/ml de IL-2, se evaluó el efecto sobre la proliferación celular mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Los resultados muestran que se inhibe la proliferación en la línea celular CALO a partir de las 24 horas y de la línea celular INBL a partir de las 48 horas, lo cual concuerda

con estudios previos donde mencionan que se inhibe la proliferación de las células CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2 por 96 horas (Alvarado, 1997).

Una de las ventajas al usar IL-2, además de ser usada contra tumores malignos, es que los linfocitos (*in vitro*) son activados con 100UI/ml de IL-2 (Valle, 2001, 2014) y una vez activados pueden atacar células tumorales (Abbas, 1996), por lo que se decidió usar esta concentración para los experimentos.

Datos publicados han demostrado que una de las características de la IL-2 es que activa cascadas de señalización (Gaffen, 2001) involucradas en el proceso de proliferación celular, tal como la vía JAK-STAT. En la vía JAK-STAT destaca la importancia de la formación del complejo ligando-receptor de IL-2, el cual permite la activación de cinasas (JAK) y factores de transcripción (STAT) (Kiu-Nicholson, 2012). Se ha demostrado que las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5 están presentes en las células CALO e INBL (Valle, 2001, 2014; Rocha *et al.*, 2004). Para determinar si la IL-2 modula la fosforilación de las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5 se trataron las células CALO e INBL con 100UI/ml de IL-2, se observó que las proteínas JAK3, STAT3 y STAT5 se encuentran fosforiladas constitutivamente, lo cual se puede deber a la producción endógena de IL-2 por parte de la célula tumoral (Rangel *et al.*, 2010). Esto concuerda con los reportes de que la activación constitutiva de proteínas involucradas en proliferación celular se asocia a transformación celular y oncogénesis, tanto en neoplasias hematológicas como epiteliales. Por ejemplo, linfocitos T obtenidos de sangre periférica no presentan fosforilación constitutiva de las proteínas JAK-STAT en ausencia de IL-2 (Jonsthor, 1995; Valle, 2001, 2014), sin embargo, en células CALO e INBL se presenta fosforilación constitutiva de JAK3, STAT5 y STAT3.

El presente estudio también demuestra que una vez que se llevó a cabo el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 se observó disminución de la fosforilación de la proteína JAK3 en ambas líneas celulares al minuto 30. Consistente con esto se ha reportado que la desfosforilación de las cinasas JAK está estrechamente relacionada con la inactivación de factores de transcripción involucrados en inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular y reducción tumoral (Nagy *et al.*, 2013). La disminución de la fosforilación de JAK3 observada en este trabajo podría



deberse a la activación de proteínas fosfatasa (PTP), las cuales pudieron haberse activado por el tratamiento con 100UI/ml de IL-2.

Se ha reportado que las JAK son requeridas para una óptima activación de la cascada de la cinasa Src, la vía Ras-MAPK, la vía PI3K-AKT y la señalización por STAT, posterior a la interacción del receptor citocina / interferon con su ligando. La alteración de la actividad de JAK puede llevar a la desregulación de una o más de las vías de señalización, y esto afectar la respuesta celular normal y desencadenar un estado de enfermedad (Rane y Reddy, 2000).

En este estudio se pudo observar que los factores de transcripción STAT3 y STAT5 están fosforilados constitutivamente en las líneas celulares CALO e INBL.

Al incubar las células con 100UI/ml de IL-2 no se observó una disminución completa de la fosforilación en las proteínas STAT3 y STAT5, lo cual sugiere que la proteína JAK3 no es la única molécula que fosforila a las STAT3 y STAT5, esto es que otra molécula puede estar involucrada en la activación de los factores de transcripción. Se ha reportado que las proteínas STAT3 y STAT5 son activadas por diferentes cinasas, por ejemplo, JAK1, JAK2 y EGFR (Ren *et al.*, 2013), por la presencia de otros receptores como HER activado constitutivamente (Soto *et al.*, 2003) o por diferentes citocinas secretadas por las mismas células (Johnson *et al.*, 1995).

Considerando nuestros resultados de proliferación, se llevaron a cabo ensayos para determinar si la inhibición de la proliferación en las células CALO e INBL incubadas con 100UI/ml de IL-2 se debía a la activación de la apoptosis. Utilizando la técnica de Anexina V, se incubaron las mismas líneas celulares en presencia de 100UI/ml de IL-2 por 48 horas.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con IL-2 induce 13.35% en CALO y 10.25% en INBL de apoptosis a las 48 horas en las células CALO e INBL. Este hecho se puede explicar con base en la poca o nula inhibición de la fosforilación de las proteínas STAT3 y STAT5. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Stephanou-Latchman en el 2003, estos investigadores inhibieron la fosforilación de la proteína STAT1 y observaron la activación de genes proapoptóticos en las células tumorales en ratón. Esto nos permite dilucidar que para activar las vías

apoptóticas la desfosforilación de los factores de transcripción (STAT) es importante.

Por otro lado, podemos mencionar que los ensayos de apoptosis se realizaron sólo hasta 48 horas, por lo que es necesario realizar ensayos aumentando el tiempo de exposición (72 y 96 horas) para determinar si se presenta mayor porcentaje de células en apoptosis. Además, cabe mencionar que estos resultados no son concluyentes ya que se necesita utilizar otra técnica para determinación de apoptosis, podría ser determinación de caspasa activa o el ensayo túnel, lo cual nos permitiría tener resultados concluyentes.

Cuando analizamos el proceso de apoptosis, observamos que el mayor porcentaje correspondía a las células vivas, estos datos nos llevaron a preguntarnos ¿cómo era posible observar inhibición de la proliferación sin observar alto porcentaje de muerte celular vía apoptótica o necrótica? La respuesta se encontró al analizar el efecto que tiene la IL-2 sobre el ciclo celular. En ciertos tipos de cáncer, por ejemplo el pancreático, se ha observado que la inhibición de la vía JAK-STAT disminuye la proliferación y la metástasis al modificar la acción de la ciclina D1 (Macha *et al*, 2013). En cáncer de colón, cáncer de mama y leucemia se ha observado que la desfosforilación de STAT5 inhibe el crecimiento celular del tumor (Xiaoyu *et al*, 2013).

Esta información nos abrió un nuevo panorama para dilucidar el efecto que tiene la IL-2 sobre las células de cáncer de cérvix, tomando en cuenta su efecto sobre la regulación del ciclo celular de estas líneas.

Para determinar las fases del ciclo celular de las líneas CALO e INBL, se utilizó la técnica de marcaje por Ioduro de propidio y se observó que en ambas líneas se presentó arresto del ciclo celular en la fase G1. Se ha reportado que una vez observado arresto celular en la fase G1 en la línea celular Hela (CaCu) el siguiente paso es la apoptosis celular, por lo que sería conveniente analizar el ciclo celular a 72 y 96 horas para dilucidar el comportamiento de las células CALO e INBL (Chen-Yang, 2013).

Desde hace unos años los factores de transcripción STAT3 y STAT5 son un blanco clínico debido a su función reguladora de genes como, p53, p21, ciclina D1, Bcl-XL y la survivina, los cuales están involucrados en regulación del ciclo celular (Deng et al., 2013; Hong-Laimins, 2013)

Se sabe que la IL-2 tiene efecto antiproliferativo (Alvarado 2007), es un coadyuvante usado para tratar cáncer de pulmón, de piel y melanoma, se ha observado que con el tratamiento de IL-2 se pueden superar diversos tipos de mecanismos de escape inmunológico, en particular sobre las células de cáncer de cérvix se ha observado disminución del tamaño tumoral (Rangel *et al* 2010).

Considerando los datos obtenidos durante esta investigación, tenemos un acercamiento al comportamiento de las células de cáncer de cérvix a nivel de vías de señalización celular, lo cual sugiere a JAK3 como un posible blanco para inhibir la proliferación de células de tumores de cérvix. Esto representa una esperanza para luchar contra un severo problema de salud pública en México.

## **IX. Conclusiones**

La IL-2 a una concentración de 100 UI/ml inhibió la proliferación, no inhibió la fosforilación de la cinasa JAK3 ni de las proteínas STAT3 y STAT5, indujo bajos porcentajes de células en apoptosis, e indujo arresto en la fase G1 del ciclo celular en las líneas celulares CALO e INBL.

## X. Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (1996). *Inmunología celular y molecular*. 6ta edición. Elsevier Saunders. México. 87p.
- Alieche A, Plaisance S, Han DS, Rubistein E, Mingari C, Bellomo R, Jasmin CA. (1993). Human melanoma cell line M14 secretes functional interleukin 2. *Oncogene*. **8(7)**:1971-1976.
- Alvarado MA, 1997. Presencia de la cadena alfa y beta del receptor para IL-2 en células de carcinoma de cérvix y el efecto proliferador inducido por IL-2 en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de licenciatura. México, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 101 p.
- Anderson PM and MA Sorenson. (1994). Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clinic-Pharmacokinetics*. **27(1)**:19-31.
- Cacalano NA, Migone TS, Bazan F, Hanson EP, Chen M, Candotti F, O'Shea JJ, Johnston JA. (1999). Autosomal SCID by a pointmutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3-receptorinteraction domain. *EMBO*. **18(6)**:1549-1558.
- Cheng C and Yang RL. (2013). A phthalide derivative isolated from endophytic fungi *Pestalotiopsis photiniae* induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in human HeLa cells. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*. **46(8)**:643-649.
- Ching SB, Ming HS, Nerng HH, Chun LH, Cheng HS and Hwa LR (2001). A novel Role of Metalloproteinase in Cancer – mediated immunosuppression. *Cancer Research*. **61(1)**:237-242.
- Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG and March CJ. (1990). A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochemical Sciences*. **15(7)**:265-270.
- Deng L, Lu Y, Zhao X, Sun Y, Shi Y, Fan H, Liu C, Zhou J, Nie Y, Wu K, Fan D and Guo X. (2013). Ran GTPase protein promotes human pancreatic cancer proliferation by deregulating the expression of Survivin and cell cycle

proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 440(2):322-329.

- Dignass AU and Podolsky. (1996). Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. *Cell Research*. **225**(2): 422-429.
- Feghali CA, Wright TM. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation *Frontiers in Bioscience*. **2**(1):12-26.
- Feldmann M. (2008). Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *Journal of Clinical Investigation*. **118** (11):3533-3536.
- Flockhart DA, Freist W, Hoppe J, Lincoln TM and Corbin JD. (1984). ATP analog specificity of cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase, and phosphorylase kinase. *Biochemistry*. **140**(2):289-295
- Gaffen SL. (2001). Cytokine. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Elsevier*. **14**(2):63-77.
- Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K. (2002). Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Reviews*. **13**(1):61-73.
- Gilmour KC, Pine R, and Reich NC. (1995). Interleukin 2 activates STAT5 transcription factor (mammary gland factor) and specific gene expression in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academic. Science*. **92**(23):10772-10776.
- González RM, Ruiz MA, Gómez Y, Vilasmil R, Vilasmil AJ, Arteaga VM, Quintero TM. (2007). Niveles séricos de interleucina 2 antes y después de la donación de sangre. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. **23**(2): Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892007000200006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892007000200006&lng=es)
- Gutierrez PY. (1997). Actividad antitumoral de la interleucina-2 recombinante libre y atrapada en liposomas en un modelo de linfoma subcutaneomurino. Tesis de maestría. México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas División de Estudios de Posgrado. 18 p.
- Hatakeyama M., Kono T, Kobayashi N, Kawahara A, Levin SD, Perimutter RM, Taniguchi T. (1993). Interaction of the IL-2 receptor with the src-family

- kinase p56. Identification of novel intermolar association. *Science*. **252**(5012):1523-1528.
- Heim MH. (1999). The Jak-STAT pathway: cytokines signaling from the receptor to the nucleus. *Journal of Receptor Signal Transduction Research*. **19**(1-4):75-120.
  - Hernández MJ, Monroy GA, Mora GML. (2006) Respuesta inmune contra la cápside del virus del papiloma humano: base para el desarrollo de vacunas contra el cáncer cervical uterino. *Revista Vertientes*. **9**(1-2):3-11.
  - Hernández UMA and Alvarado NA. (2001). Interleucinas e inmunidad innata. *Revista Biomedica*. **12**(1):272-280.
  - Hodaka F (2007). Cell type-specific roles of Jak3 in IL-2-induced proliferative signal transduction. *Elsevier*. **354**(3):825-829.
  - Hoessli DC, Ilangumaran S, Soltermann A, Robinson PJ, Borisch B, Nasir-Ud-Din. (2000). Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconjugate*. **17**(3 -4):191-7.
  - Hong S and Laimins LA. (2013). The JAK-STAT Transcriptional Regulator, STAT-5, Activates the ATM DNA Damage Pathway to Induce HPV 31 Genome Amplification upon Epithelial Differentiation. *PLoS Pathog*. **9**(4): e1003295.
  - <http://epidemiologiamolecular.com/citocinas/>
  - <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/p53-mediated-apoptosis-pathway.htm>
  - [http://www.sec.gov/Archives/edgar/containers/fix330/1441848/000110465910005539/a10-3358\\_1ex99d1.htm](http://www.sec.gov/Archives/edgar/containers/fix330/1441848/000110465910005539/a10-3358_1ex99d1.htm)
  - <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
  - <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
  - <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/cancer0.doc>
  - Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA and Brusko TM. (2012). Central Role for Interleukin-2 in Type 1 Diabetes. *American diabetes association*. **61**(1): 14-22.

- Hunter T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philosophical Transaction the Royal Society Biological Science*. **353**(1368):583-605.
- Jonsthon JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplani D, Shibuyai K, Ortaldo JR, Gupta S, Chen YQ, Giri JD and O'SHEA JJ. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proceeding National Academic Science*. **92**(19):8705-8709.
- Kalume DE, Molina H. and Pandey A. (2003). Tackling the phosphoproteome: tools and strategies. *Current Opinion in Chemical Biology* 7(1):64-69.
- Kaczkowski B, Rossing M, Andersen DK, Dreher A, Morevati M, Visser MA, Winther O, Nielsen FC and Norrild B. (2012). Integrative analyses reveal novel strategies in HPV11, -16 and -45 early infection. *Scientific reports*. **2**(515):1-8.
- Katsutoshi O, Warren JL. (2002) Cytokine and Cytokine Receptor Pleiotropy and Redundancy. *Journal of biological chemistry*. **277**(33):29355–29358,
- Kirito K, Fox N, Kaushansky K. (2003). Thrombopoietin stimulates expression of HoxB4: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stemcells. *Blood*. **102**(9):3172-3178.
- Kiu H. and Nicholson SE. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *National Institute of Health*. **30**(2): 88–106.
- Lin J.X and Leonard WJ. (2000). The role of the STAT5a and STAT5b insignaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* **19**(21): 2566-2576.
- Lessene G, Czabotar PE, and Colman PM. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature*. **7**(1):989-1000.
- Lindemann MJ, Benczik M, and GaffenAnti SL. (2003). Apoptotic signaling by the Interleukin-2 receptor reveals a function for cytoplasmic tyrosine residues within the common  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) receptor subunit. *Journal of biological chemistry* **278** (12):10239-10249.

- Macha MA, Rachagani S, Gupta S, Pai P, Ponnusamy MP, Batra B, Jain M. (2013). Guggulsterone decreases proliferation and metastatic behavior of pancreatic cancer cells by modulating JAK/STAT and Src/FAK signaling. *Cancer Letters*. **341**(2):166–177
- Malumbres M and Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature*.**9**(3):153-167.
- Manzoor MK. (2008). Immunopharmacology. Primera edición. Editorial Espringer USA. 61 pp.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*. **298**(5600):1912-1934.
- Mavers M, Ruderman EM and Perlman H. (2009). Intracellular Signal Pathways: Potential for *Therapies*. *National Institute of Health*. **11**(5): 378–385.
- McDermott DF, Atkins MB.(2007). More Support for the Judicious Use of High-Dose Interleukin-2 in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. **25**(25):3791-3793.
- McMillan DN, Kernohan NM, Flett ME, Heys SD, Deehan DJ, Swell HF, Walter F and Eremin O. (1995). Interleukin 2 receptor expresión and interleukin and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells *in situ* and *in vitro* : evidence for direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *International journal of cancer*. **60**(6):776-772.
- Mizel SB (1989). The interleukins. *FASEB*. **3**(12): 2379-2388.
- Monroy AG, Ortiz NVF, Mora GML, Flores BF, Diaz QA, Isibasi AA, Trejo BC, Chacón SR, Hernández MJ, Granados AJ, de Leo C, Weiss SB (1999). Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection *Immunology Letters*. **67**(3):167–177.
- Nagy ZS, Ross JA, Rodriguez G, Balint LB, Szeles L, Nagy Laszlo, Kirken RA. (2013). Genome Wide Mapping Reveals PDE4B as an IL-2 Induced STAT5 Target Gene in Activated Human PBMCs and Lymphoid Cancer Cells. *PLoS ONE*. **8**(2): e57326



- Notarangelo LD, Mella P, Jones A, de Saint Basile G, Savoldi G and, Granston T. (2001). Mutations in severe combined immune deficiency (SCID) due to JAK3 deficiency. *Human Mutation*. **18**(4):255–263.
- Parkin DM, Pisani P and Ferlay J. (1999). Global cancer statistics .CA: *Cancer Journal Clinicians*. **49**(1):33-64.
- Peralta ZO, Behena RM, Díaz BCE and Madrid MV. (1997). Regulation of the cell cycle and the development of cancer: therapeutic prospects. *Salud pública Mexicana*. **39**(5):451-62.
- Plaisance S, Rubinstein E, Alileche A, Benoit P, Jasmin C, Azzarone B. (1993). The IL-2 receptor present on human embryonic fibroblasts is functional in the absence of P64/IL-2R gamma chain. *International immunology*. **5**(8):843-8
- Preisinger C, von Kriegsheim A, Matallanas D and Kolch W. (2008). Proteomics and phosphoproteomics for the mapping of cellular signalling networks. *Proteomics*. **8**(21):4402-4415.
- Quan WD, Dean GE, Lieskovsky G, Mitchell MS and Kempf RA. (1994). Phase II study of low dose cyclophosphamida and intravenous interleukin-2 in metastasic renal cancer. *Investigational New Drugs*. **12**(1):35-9.
- Rane SG and Reddy EP. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Nature*. **19**(49):5662-5679.
- Rangel CR, Corona OT, Soto CI, López LA, Pablo AT, Torres GCF and Weiss SB. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Science direct*. **50**(3):273-277.
- Rangel R, Rodríguez L, Flores G, Gomez C, Soto CI, Mendoza JF and Weiss SB. (1998). Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors*. **1**(3):1239-1243.
- Rocha ZL, Huitron C, Cacéres CJR, Alvarado MJA, Valle MA, Soto CI, Weiss SB and Rangel CR. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta-gamma 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 Signaling*. **16**(11):1239-1247.

- Rojas M, Salmen S and Berrueta L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista médica de extensión portuguesa*. **4**(3):92-106.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan WM, Seipp CA and White DE. (1989). Experience with the use of high-dose of interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annals of Surgery*. **210**(4):474-484.
- Shuai K. (1999). The STAT family of protein in cytokine signaling. *Progress in Biophysics and molecular Biology*. **71**(3-4):405-422.
- Shuai K and Liu Bin. (2003). Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nature*. **3**(11):900-911.
- Smith KA. (1988). Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science*. **240**(4856):1169-1176.
- Soto CMI, Cáceres Cortés, Mendoza RJF y Weiss SB. (1999). Las citocinas en la Hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares. Primera edición. Editoriales Programa Universitario de Investigación en Salud y Plaza y Valdez. México. 279p.
- Soto CI. (2003). Transducción de Señales y Cáncer. *Vertientes*. **6**(1):45-50.
- Stephanou A, Latchman DS. (2003). STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. **84**(6):239-244.
- Taniguchi T, Minami Y. (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cellular*. **73**(1):5-8.
- Taylor RC, Cullen SP and Martin SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*. **9**(3):231-241.
- Théze J, Alzari PM and Bertoglio J. (1996). Interleukin 2 and its receptor: recent advances and new immunological function. *Immunology Today*. **17**(10):481-486.
- Veillette A, Zúñiga-Pflücker JC, Bolen JB, Kruisbeek AM. (1989). Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces

activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. *Journal of Experimental Medicine*. **170**(5):1671-80.

- Valle MA. (2001). Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL en comparación con linfocitos normales. Tesis de licenciatura. México, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 63 p.
- Valle MA y Soto CI. (2005). Vía JAK-STAT: Una visión general. *Vertientes* **8**(1-2): 14-25.
- Valle MA, Weiss SB and Soto CI. (2014). IL-2 enhances Cervical Cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Investigation*. In press doi:10.3109/07357907.2014.883526:1-11.
- Walboomers JMM, Jacobs MV and Manos MM. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathology Journal*. **189**(1):12-19.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, and Darzynkiewicz Z. (2011). Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods Cell Biology*. **103**(1):55–98.
- Wu S, Boyer CM, Whitaker RS and Berchuck A. (1993). Tumor necrosis factor alfa as an autocrin ovarian cancer: monokine induction of tumor cell factor alfaexpretion. *Cancer research*. **53**(8): 1939-1949.
- Wuang X, Riquet M and García KC. (2005). Structure of the Quaternary Complex of Interleukin-2 with Its $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma_c$  Receptors. *Science*. **310** (5751): 1159-1163.
- Xiaoyu H, Pranabananda D, Tsurumia A, Lib J, Wang J, Landa H and Lia WX. (2013). Unphosphorylated STAT5A stabilizes heterochromatin and suppresses tumor growth. *Proceeding of the National Academy of Science*. **110**(25): 10213–10218.
- Yasumura S, Lin WC, Weidmann E and Hebda P. (1994). Expresión of interleukin 2 receptor on human carcinoma cell link and tumor growth inhibition by interleukin 2. *International journal of cancer*. **59**(2): 225-236.

