UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE SURVIVINA EN EL EFECTO PROTECTOR DE LA ERITROPOYETINA CONTRA LA MUERTE POR CISPLATINO EN CÁNCER CERVICAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. LILIANA GUADALUPE CORTÉS BALLINAS

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad de México. Abril, 2016

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este trabajo constituye la culminación de mis estudios de Maestría en el programa de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas otorgada (CVU - 626746, Número de apoyo - 392732).

El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnología (PAPIIT) (Clave IN209613) y CONACyT (Ciencia Básica – Clave 152492).

Agradezco a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto.

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más por tumores de mama y CaCu.	3
Figura 2. Representación de los efectos celulares por administración de cisplatino	6
Figura 3. Estructura de cisplatino y mecanismo de unión a ADN	7
Figura 4. Modelo molecular de la eritropoyetina	9
Figura 5. Estructura homodimérica de survivina.	10
Figura 6. Modificaciones de CDK1.	12
Figura 7. Expresión de survivina en cáncer cervical.	13
Figura 8. Activación de STAT3 por eritropoyetina.	15
Figura 9. Expresión de STAT3 y su fosforilación en diferentes grados de cáncer cervical.	16
Figura 10. Efecto protector de la Epo sobre la muerte inducida por cisplatino en células HeLa.	24
Figura 11. Activación de STAT3 en función del tiempo de exposición a Epo en células HeLa.	25
Figura 12. Modificaciones en survivina total y fosforilada como respuesta a Epo en células HeLa.	26
Figura 13. Modificaciones en CDK1 total y fosforilada como respuesta a Epo en células HeLa.	28
Figura 14. Representación de los hallazgos realizados en células HeLa como respuesta a Epo.	37

Contenido

I. RESUMEN 1

II. INTRODUCCIÓN 3

A. Cáncer cervicouterino. 3

B. Cisplatino 5

C. Eritropoyetina. 8

D. Survivina 10

E. STAT3 14

III. JUSTIFICACIÓN 17

IV. HIPÓTESIS 18

V. OBJETIVOS 19

VI. MATERIALES Y MÉTODOS 20

A. Línea celular. 20

B. Determinación de CI_{50} 20

C. Ensayo MTT. 20

D. Ensayo de protección con Epo. 21

E. Extracción de proteínas. 21

F. Western Blot. 22

G. Análisis estadístico de datos. 23

VII. RESULTADOS 24

A. La eritropoyetina protege a las células HeLa contra la muerte inducida por cisplatino 24

B. La eritropoyetina induce la activación transitoria de STAT3. 25

C. La eritropoyetina induce la expresión y fosforilación de survivina. 26

D. La eritropoyetina induce la activación de CDK1. 28

VIII. DISCUSIÓN 30

IX. CONCLUSIONES 38

X. PERSPECTIVAS 39

XI. REFERENCIAS 40

I. RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la tercera causa de muerte por neoplasias en mujeres mexicanas. El cisplatino es el fármaco más utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer. Uno de los padecimientos colaterales que causa el cisplatino es la anemia, la cual es tratada con eritropoyetina (Epo). La Epo es una hormona que ha sido clínicamente asociada a la quimioresistencia en diversos tipos de tumores.

Particularmente en nuestro laboratorio se demostró que la eritropoyetina protege a las células de CaCu contra la muerte por cisplatino, por lo que el objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de regulación de dicho fenómeno en la línea celular de cáncer cervical HeLa.

Mediante ensayos de Western blot se demostró que, como consecuencia de la estimulación con Epo, hay un aumento en la activación del factor de transcripción STAT3, el cual se ha asociado con procesos de adquisición de quimioresistencia. Uno de los genes blanco de STAT3 es el de survivina. En nuestro modelo se observó que la administración de eritropoyetina indujo un aumento en los niveles de survivina, así como un incremento en sus formas fosforiladas en los residuos Thr34 y Thr117, involucradas en la inhibición de la apoptosis y la progresión de la mitosis respectivamente y ambas detectables desde el primer minuto de la estimulación con Epo.

Finalmente se analizaron las modificaciones inducidas en CDK1, cinasa reguladora del ciclo celular y responsable de la fosforilación de survivina en la Thr34. Es de destacarse que la forma completamente activa de la cinasa tiene un máximo durante los 3-5 minutos posteriores al estímulo, coincidiendo con survivina en su forma fosforilada en Thr34 que tienen su máximo en 3-10 minutos. Por otra parte también se detecta un aumento en los niveles de la fosforilación en Thr117 de survivina desde el primer minuto de estimulación con Epo y de manera periódica con máximos en 1 y 30 minutos.

Nuestras observaciones sugieren fuertemente que la citoprotección contra cisplatino inducida por eritropoyetina es mediada a través del aumento de la expresión de survivina, regulado por STAT3, y un incremento en su activación por acción de CDK1.

II. INTRODUCCIÓN

A. Cáncer cervicouterino.

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la tercera causa de muerte por neoplasias malignas en la mujer en México y América latina (Globocan, 2012). Hasta 2013 el CaCu fue el responsable del 12.6% de mortalidad en mujeres mexicanas por tumores malignos (INEGI, 2015), siendo las más afectadas aquellas entre 40 a 49 años de edad (INEGI, 2013. Figura 1).

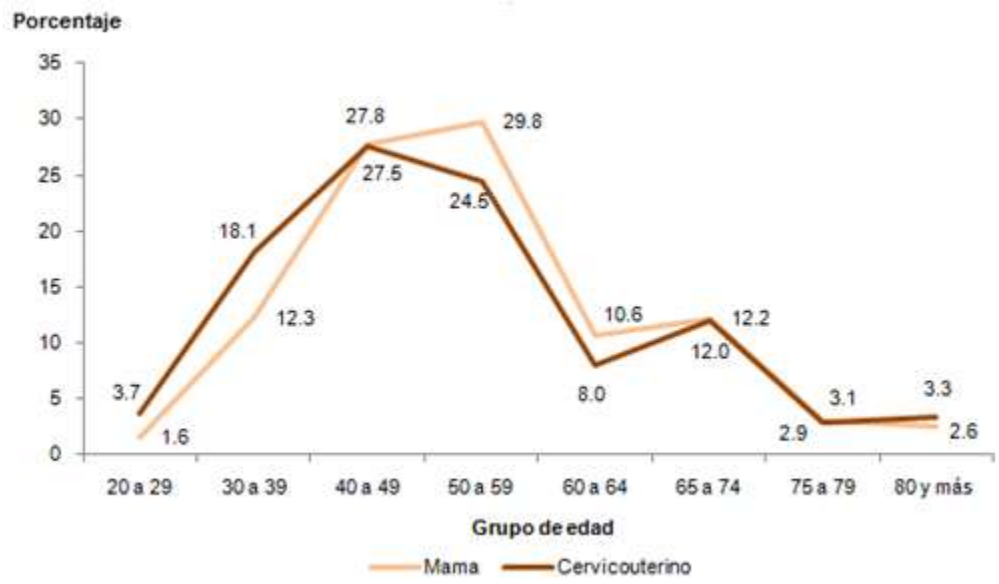

Figura 1. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más por tumores de mama y CaCu. Seleccionados según grupo de edad (INEGI 2013).

Este padecimiento se ha asociado a diversos factores como tabaquismo o el uso de anticonceptivos, y se sabe que el agente etiológico responsable por el 99.7% de los casos es el virus del papiloma humano (VPH) (Walboomers et al, 1999). Actualmente se han identificado más de 200 tipos de VPH de los cuales solamente 2 son responsables del 70% de las infecciones, VPH18 y VPH16; este último contribuye con aproximadamente el 50% de los casos (Smith et al, 2007).

Investigaciones recientes respaldan la teoría sobre el proceso de infección que establece que el virus debe entrar a través de lesiones en el epitelio estratificado hasta la membrana basal epitelial en donde existen células madre, que por su longevidad son capaces de mantener al virus de manera indefinida. Una vez dentro de éstas, el virus replica su genoma (entre 50 y 200 copias por célula), permaneciendo de manera latente y clínicamente imperceptible (Doorbar et al, 2015).

Se considera una infección activa una vez que el genoma que se encontraba de modo latente se ha replicado a un mayor número de copias por célula e inicia la síntesis de proteínas víricas. Las primeras proteínas sintetizadas, E6 y E7, se encargan de la alteración de ciclo celular e inmortalización de las células hospederas, manteniendo una producción continua del resto de proteínas necesarias para la formación de nuevos virus capaces de seguir infectando el tejido (Muñoz et al, 2006).

Aunque la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y se pueden resolver a través de la respuesta inmune, se estima que entre el 10-30% de éstas consigan desarrollo maligno. El factor determinante es la persistencia de la infección, el tiempo que puede tomar en resolverse va desde 4 meses para los tipos de bajo riesgo, hasta año y medio para VPH 16 y 18. De no resolverse la infección ésta puede derivar en lesiones cervicales pre-cancerígenas y eventualmente en cáncer (Stanley, 2010).

La evolución del proceso carcinogénico se determina citológicamente y es complementado con la valoración de la expresión de las proteínas víricas E6 y E7, las cuales se presentan en niveles mínimos en etapas tempranas pero en procesos avanzados se encuentran abundantemente por lo que se usan como marcadores (Gurumurthy et al, 2013).

De acuerdo con el estadio clínico del CaCu existen diferentes tratamientos que van desde el monitoreo constante y la eliminación de zonas con potencial carcinogénico hasta histerectomías radicales. Para etapas avanzadas de la enfermedad se

considera necesaria la complementación con quimioterapias y radioterapias que tienen por objetivo disminuir el riesgo de reincidencia o metástasis.

Las radioterapias pueden ser intracavitarias, localizadas o generales, dependiendo del avance de la enfermedad, mientras que las quimioterapias pueden incluir uno o dos fármacos, siendo los más utilizados para CaCu cisplatino, paclitaxel y carbotaxol (Guías diagnosticas 2013, Cáncer Cervicouterino).

B. Cisplatino

Los quimiofármacos representan el tratamiento de elección contra el cáncer debido a que su administración conjunta con radiación ha demostrado disminuir el volumen tumoral, favoreciendo la respuesta del paciente (Green et al, 2005).

Se probó la eficacia del cisplatino contra tumores sólidos desde 1978 (Hill et al, 1982) y posteriormente se convirtió en el fármaco de elección contra el CaCu al demostrar que cuando se utiliza en combinación con radioterapia u otros fármacos existen mayores posibilidades de supervivencia al cáncer en comparación con los tratamientos sin cisplatino (Long et al, 2011).

Este metalofármaco presenta diversos efectos según el blanco celular al que se una y la dosis que se administre, pudiendo provocar desde apoptosis hasta necrosis. El mecanismo de acción al que se le atribuyen la mayoría de sus efectos es la formación de aductos con el ADN nuclear impidiendo la transcripción y replicación del ADN, lo cual, al no poder ser reparado por la célula promueve la activación de factores pro-apoptóticos; adicionalmente, provoca daño en otros orgánulos como mitocondrias y retículo endoplásmatico (Fig. 2) (Sancho-Martínez et al, 2012).

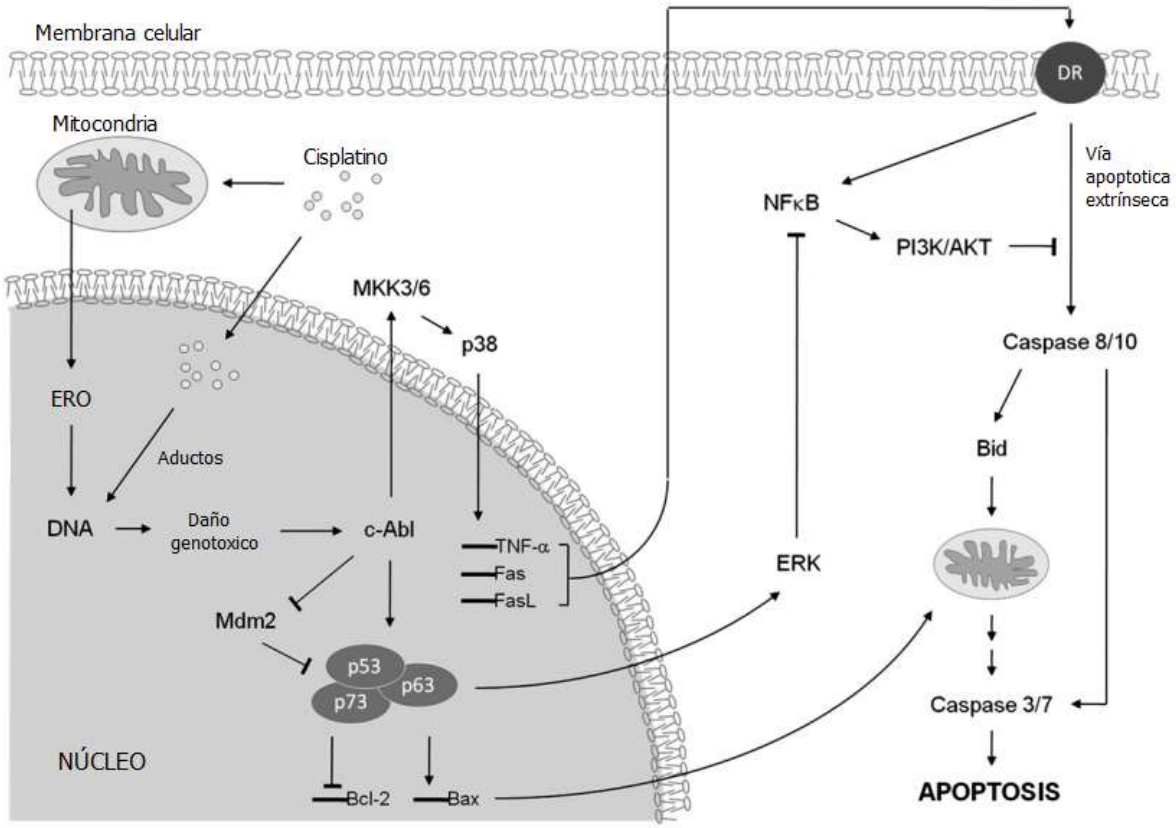

Figura 2. Representación de los efectos celulares por administración de cisplatino (Hill et al, 1982).

Una vez dentro de la célula, los iones cloruro del cisplatino son desplazados por moléculas de agua dando lugar a un compuesto electrófilico fuerte que puede reaccionar con pares electrónicos libres, como los de grupos sulfidrilos o nitrógenos donadores de electrones como los de los ácidos nucléicos. Esta reacción da lugar a la unión covalente e irreversible de la molécula inorgánica con el ADN, formando enlaces intracatenarios que obstaculizan o bloquean por completo la replicación del material genético, llevando a la célula a muerte por apoptosis (Fig. 3) (Wang et al, 2005).

Otro efecto del cisplatino es la diminución de moléculas reguladoras del estrés oxidante como el glutatión reducido (GSH), provocando un aumento en las especies reactivas de oxígeno (EROs). Este desequilibrio es capaz de inducir la apoptosis celular a través de la activación de las vías intrínseca, en donde se facilita la liberación del citocromo C por la estabilización de poros membranales, y extrínseca, por activación de la caspasa 8 (Dasari et al, 2014).

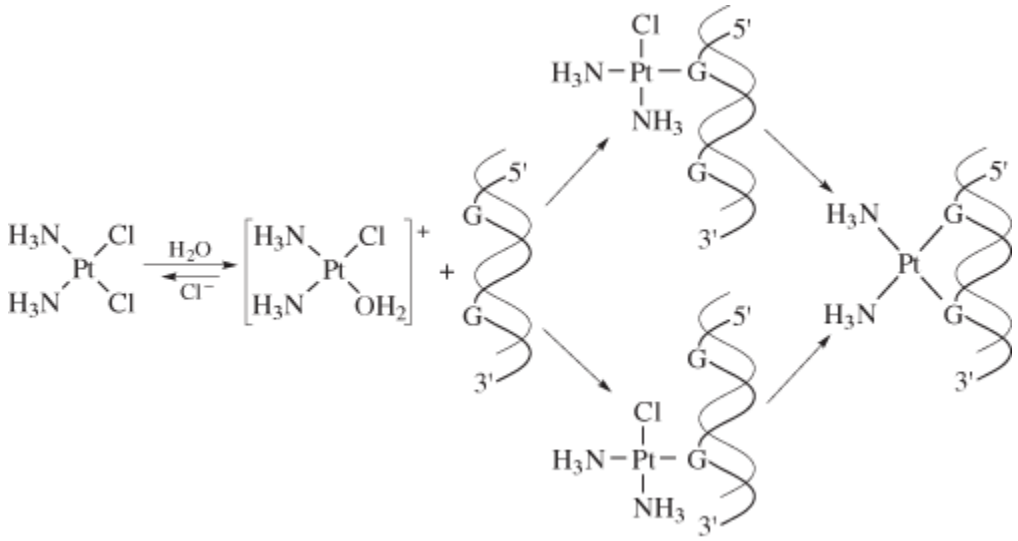

Figura 3. Estructura de cisplatino y mecanismo de unión a ADN.

A pesar de que este es uno de los fármacos más eficientes contra el cáncer, existen pruebas de que las células cancerígenas son capaces de desarrollar resistencia contra éste. Se han estudiado diversos mecanismos que incluyen la activación de vías anti-apoptóticas en las que se destaca la activación constitutiva de algunos factores de transcripción y la expresión de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) (Siddick, 2003).

Se ha demostrado que la administración periódica de cisplatino genera la producción de eritrocitos policromáticos micronucleados evidenciando su capacidad mielotóxica. En experimentos recientes se demostró que la administración de eritropoyetina previa al tratamiento con cisplatino genera un efecto protector en eritrocitos al disminuir significativamente los efectos genotóxicos de este fármaco (Rjiba-Touati et al, 2014).

Adicionalmente, se ha asociado con el desarrollo de anemia, que en muchos de los casos se revierte una vez que se detiene la administración de cisplatino. En pacientes mexicanas con CaCu, la anemia se presenta en aproximadamente el 34% de los casos antes de iniciar la quimioterapia como consecuencia de la fisiopatología de la enfermedad (Candelaria et al, 2005).

En pacientes sometidas a quimioterapia y posteriormente a una cirugía radical, se demostró que existe una asociación entre los niveles bajos de hemoglobina y una respuesta mínima al tratamiento; específicamente, aquellas con un estado más avanzado de la enfermedad presentaron menor respuesta al tratamiento y por lo tanto menor posibilidad de sobrevivencia a la enfermedad (Ferrandina et al, 2006).

C. Eritropoyetina.

La anemia en mujeres se define como niveles de hemoglobina en sangre menores a los 12.0 g/dL. En algunas enfermedades crónicas como el cáncer, la anemia es considerada típica y por lo tanto ha surgido como un factor de mucha atención ya que si se presenta se asocia con una respuesta pobre al tratamiento y la disminución de la calidad de vida del paciente. Algunos de sus signos clínicos son fatiga, debilidad, mareos y malestar general (Weiss et al, 2005).

Las causas de la anemia incluyen deficiencia de hierro, errores en su producción, falla renal y hemorragias; estas últimas, características del cáncer cervicouterino. Cuando la anemia no se revierte se implementa la administración de un factor hematopoyético como es la eritropoyetina recombinante humana (Epo-rh) o algún análogo de ésta, ya que representa un factor de pronóstico para la supervivencia al cáncer (Abels et al, 1996).

La eritropoyetina es una hormona glicoprotéica sintetizada principalmente en riñón cuya función es diferenciar y mantener las células progenitoras eritroides (Fig. 4). Lleva a cabo sus funciones a través de la unión a su receptor (Epo-R), localizado en la superficie célular el cual se dimeriza y transfosforila, iniciando una serie de señales intracelulares que van desde la senescencia hasta la división celular (Fried, 2009).

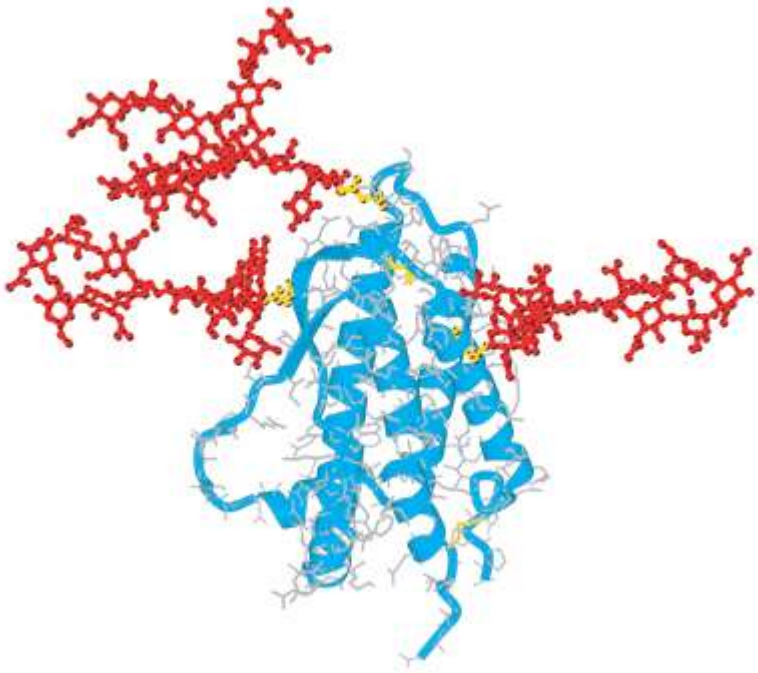

Figura 4. Modelo molecular de la eritropoyetina (Wormald et al, 2007).

Aunque se creía que la presencia de Epo-R se restringía a tejido hematopoyético, posteriormente se demostró la presencia de este receptor en otros órganos como corazón, cerebro y riñón así como en diversos tipos de cáncer como cáncer de mama, cervicouterino y gliomas (Geza et al, 2001).

La activación de Epo-R desencadena la activación de diferentes cinasas, entre la que se encuentran JAK, Akt y MEK. La vía JAK2/STAT5 y sus efectos de sobrevivencia celular se han estudiado ampliamente, ya que incluso se ha relacionado con protección contra quimiofármacos (Silver et al, 1999).

Experimentos realizados previamente por nuestro grupo de trabajo han demostrado la expresión de Epo-R en líneas celulares de CaCu y la consecuente activación tanto de los elementos de la vía canónica (JAK2/STAT5), así como la de JAK3, STAT3 y STAT5 en respuesta a la estimulación con eritropoyetina (Lopez et al, 2001). Así mismo se describió la protección mediada por eritropoyetina contra la muerte celular causada por cisplatino, de una manera dosis dependiente, al inhibir la apoptosis y/o necrosis (Vázquez-Mellado Petit, 2009).

Por otra parte, el factor STAT3 ha sido ampliamente estudiado en cáncer cervical debido a que presenta una expresión constitutiva que, además, aumenta conforme evoluciona la patología (Shukla et al, 2010), y se ha identificado como activador transcripcional de proto-oncogenes, entre ellos la survivina (Kanda et al, 2004).

D. Survivina

Survivina es una proteína con un peso molecular de 16.5 KDa, está codificada por el gen BIRC5 y pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP). En su estructura contiene un dominio Inhibidor de Baculovirus (BIR), una α-hélice en donde se realizan diferentes modificaciones y un dominio dedos de zinc (Fig. 5). Hasta el momento se han descrito 6 isoformas derivadas de variaciones post-transcripcionales (Bríd et al, 2009).

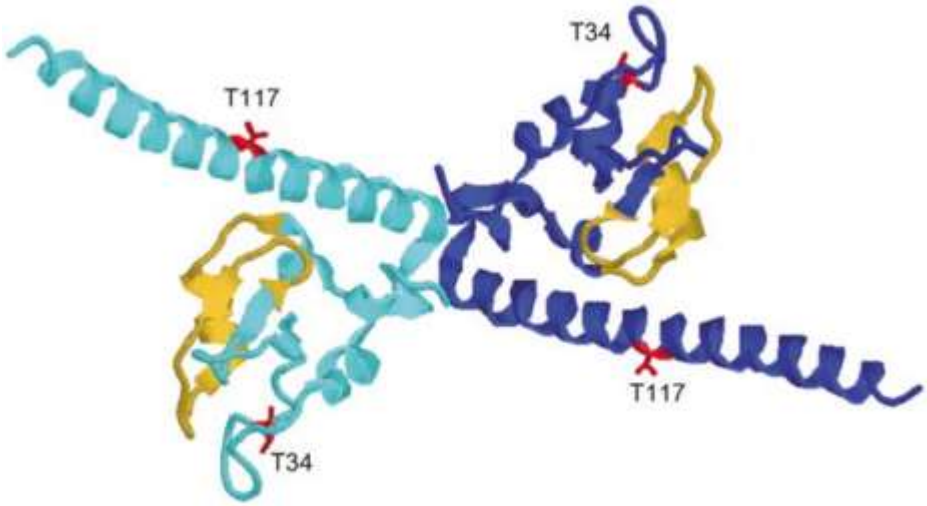

Figura 5. **Estructura homodimérica de survivina**. Cada monómero se muestra en color azul, el dominio de dedos de zinc en amarillo y en rojo los residuos susceptibles a fosforilaciones (Wheatly et al, 2005).

La localización subcelular es variada y se modifica de acuerdo al ciclo celular, puediendose encontrar en el núcleo durante la mitosis o en mitocondria como respuesta a estímulos de estrés y apoptosis. Su expresión es característica de tejido sano en desarrollo, se encuentra en niveles altos durante el desarrollo fetal y bajos en tejido adulto sano. No obstante, su expresión en tejido canceroso es

particularmente alta, lo que ha llevado a considerarla como un marcador e incluso, blanco de estudio para el desarrollo de nuevos fármacos (Athanasoula et al, 2014).

Su principal función y la más estudiada hasta el momento es su participación en el complejo cromosomal pasajero (CPC), donde se encarga de interactuar directamente con los centrómeros al reconocer histonas específicamente modificadas gracias a su dominio BIR. Si no lleva a cabo su función correctamente, la célula sufre eventos de aneuploidia lo que puede provocar la muerte celular (Altieri, 2003).

Esta función es dependiente de la fosforilación en los residuos Thr34 y Thr117 al inicio de la mitosis. Durante esta fase, la survivina fosforilada en ambos residuos se localiza en el núcleo, donde regula la correcta segregación de cromátides hermanas (Carmena et al, 2012). Adicionalmente se ha descrito una función antiapoptótica durante la fase G1 del ciclo celular al unirse a la caspasa-9 en citoplasma evitando una muerte prematura durante la replicación celular (O'Connor et al, 2000).

Aurora B, principal cinasa del CPC, es la encargada de fosforilar a survivina en Thr117, este proceso se lleva a cabo durante la prometafase y es esencial durante la citocinesis. Así mismo, se demostró que la defosforilación de este residuo también es determinante para el progreso a la anafase, ya que de no defosforilarse se presentan eventos de aneuploidia durante la mitosis. Por lo tanto, la fosforilación y defosforilación de este residuo juega un papel crucial durante la replicación celular y es un proceso altamente controlado (Wheatly et al, 2007).

La cinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1 o $p34^{cdc2}$) es la encargada de llevar a cabo la fosforilación de survivina en el residuo Thr34 y es una de las principales cinasas reguladoras en la progresión del ciclo celular. Para que esta cinasa sea funcional es necesario que se una con ciclina B, la fosforilación del residuo Thr161 y la defosforilación de Tyr15 y Thr14 (Fig. 6). De esta manera se obtiene su forma activa denominada factor promotor de la maduración (MPF) (Gu et al, 2013).

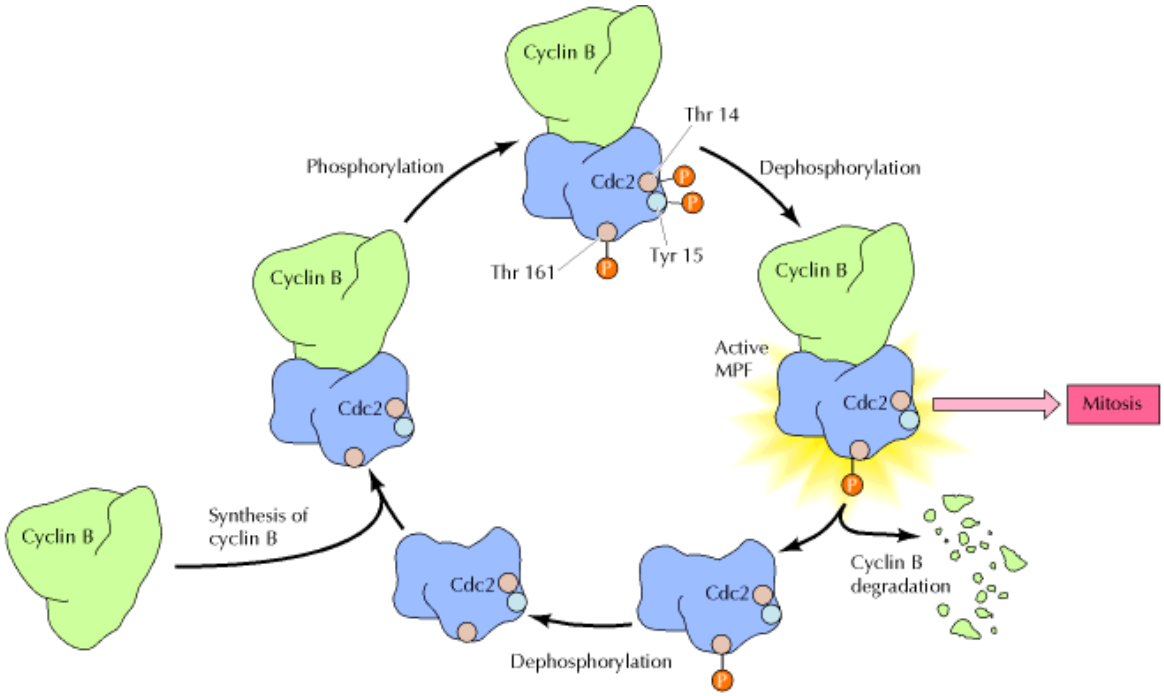

Figura 6. **Modificaciones de CDK1.** Unión de ciclina B y Cdc2 que da lugar a CDK1 y las modificaciones que sufre esta cinasa para regular su actividad.

Otra modificación funcional de survivina es la fosforilación en el residuo Ser20 realizada por cinasa A (PKA). Esta modificación en el dominio BIR impide su asociación con la proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X (XIAP), otro miembro de la familia de las IAP que inhibe la apoptosis por interacción directa con las caspasas. Por lo tanto, cuando la survivina no se encuentra fosforilada en el residuo Ser20 es capaz de unir a XIAP, aumentando su estabilidad durante procesos apoptóticos (Dohi et al, 2007).

La localización de survivina depende, además del ciclo celular, de otras modificaciones que se llevan a cabo como respuesta a estímulos externos. Su acetilación en el residuo Lys129 le confiere estabilidad en el núcleo en donde además es capaz de unir a STAT3 e inhibir la transcripción de los genes *BCLXL* y *MCL1*, que codifican para proteínas anti-apoptóticas (Wang et al, 2010).

En cuanto a investigación clínica, las diferentes isoformas de survivina han sido identificas en diversos tejidos cancerosos, su expresión ha llegado a considerarse incluso como un factor de pronóstico de la respuesta a quimioterapias (Necochea-Campion et al, 2013).

En tejido cervical sano se ha reportado una expresión mínima de survivina, mientras que en algunos casos de cáncer cervical, se encuentra expresada de manera exacerbada hasta en un 20% (Fig. 7) y se le atribuyen efectos de proliferación e inhibición de la apoptosis, promoviendo el desarrollo del tumor y protegiéndolo contra la acción de algunos quimiofármacos (Xue et al, 2011; Bache et al, 2007).

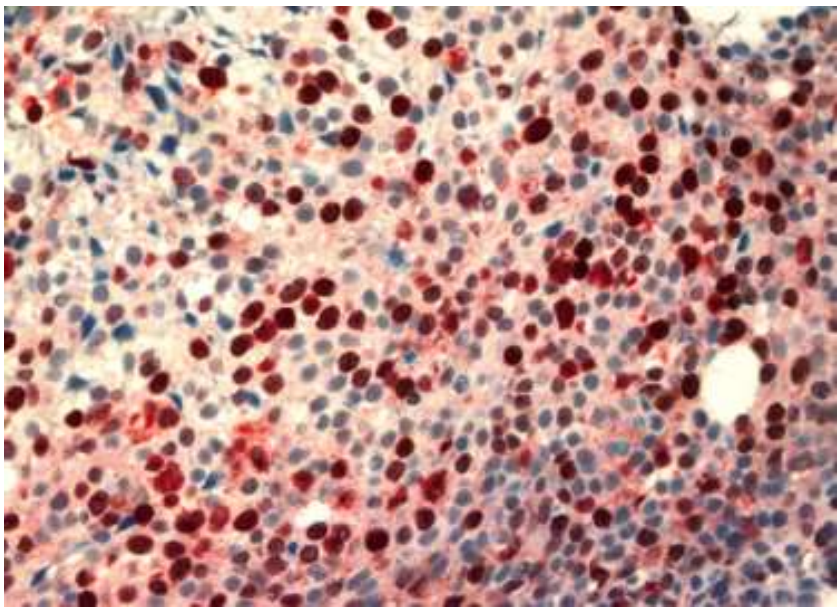

Figura 7. **Expresión de survivina en cáncer cervical**. Tinción inmunohistoquimica (400X) (Bache et al, 2007).

La expresión de survivina es regulada por una amplia variedad de factores entre los cuales destaca STAT3. En células hematopoyéticas indiferenciadas ($CD34^+$) cuando el sitio de reconocimiento para STAT3 en la región promotora de survivina es mutado o eliminado, la activación transcripcional en respuesta al factor estimulante de colonias de granulocitos es suprimida completamente, disminuyendo el crecimiento celular y aumentando la apoptosis (Gu et al, 2007) lo que demuestra la importancia de STAT3 en la regulación de la expresión de survivina.

E. STAT3

STAT3 pertenece a la familia de Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STAT). Este grupo de proteínas se caracteriza por mediar respuestas inmediatas a estímulos por citosinas a través de la fosforilación de un residuo conservado de tirosina cerca del extremo carbonilo, su consecuente dimerización y translocación al núcleo para provocar respuestas que van desde la apoptosis hasta la diferenciación celular.

Para que STAT3 pueda ser activado, una vez que la citosina se ha unido a su receptor, la dimerización de éste activa a las cinasas de tirosina asociadas a su porción citoplasmática (JAKs) las cuales fosforilan algunos residuos en la porción citoplasmica del receptor. Estos dominios son reconocidos por STATs citoplasmáticas, facilitando el acercamiento con JAK y su consecuente fosforilación. La activación de los diferentes miembros de JAK y STAT es dependiente del receptor activado, lo que da lugar a una serie de combinaciones que regulan una amplia gama de efectos (Decker, 1999).

Una vez activadas, la dimerización entre los STATs es homóloga a excepción de STAT1 que forma heterodímeros con STAT3 y STAT2. Para que los dímeros activos puedan ser translocados al núcleo requieren de transporte facilitado mediado por importina; una vez dentro la activación de los distintos genes blanco depende de la disponibilidad de los sitios de unión y de los cofactores de transcripción disponibles en ese momento (Fig. 8) (Levy et al, 2002).

La defosforilación de los dímeros se da en un periodo de 10-15 minutos por medio de fosfatasas nucleares permitiendo la exportación de los STATs hacia el citoplasma. De no ser así, la transcripción de los genes blanco es exacerbada, mecanismo que ha sido identificado en diversos tipos de cáncer y el cual ha surgido como un amplio campo de estudio por las implicaciones que podría tener como blanco terapéutico.

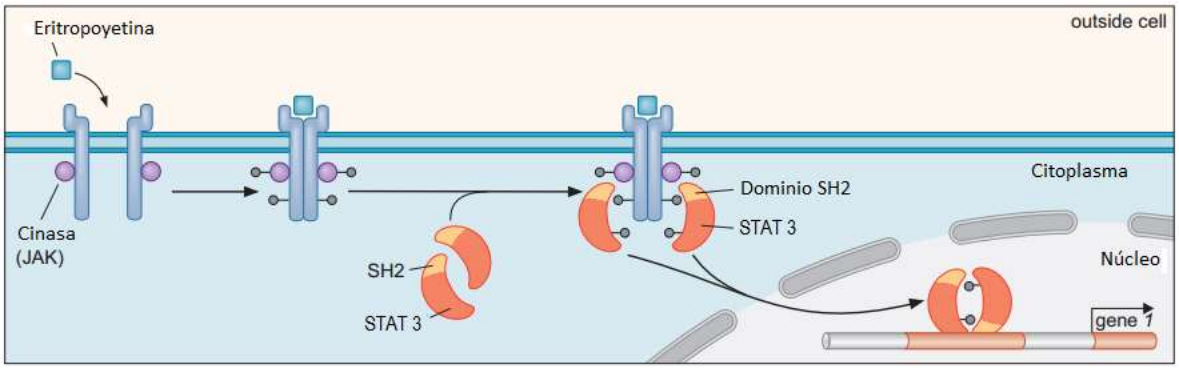

Figura 8. Activación de STAT3 por eritropoyetina (Modificado de Coskun et al, 2014).

STAT3 es uno de los más estudiados por estar involucrado en procesos de diferenciación, apoptosis y vascularización. Su activación constitutiva en diversas líneas tumorales correlaciona con la sobreexpresión de algunos genes anti-apoptóticos como *BCL2, BCLXL, BIRC5* y algunos otros reguladores del ciclo celular como *CCND1, CCND2, CDC2, CDC25A* y *PCNA* (Mali, 2015).

El análisis de STAT3 en diversos tejidos cancerosos muestra que existe una relación entre su sobre-expresión, su activación constitutiva y la resistencia a quimiofármacos, justificando su uso como posible marcador para la respuesta a tratamientos e incluso para la sobrevivencia a la enfermedad (Fig. 9) (Barré et al, 2006).

En cáncer cervical se ha demostrado que existe una diferencia significativa en comparación con tejido sano en los niveles de expresión de STAT3 así como de su activación a través de la fosforilación en los residuos Tyr705 y Ser727. Esta última fosforilación se asocia con un aumento en la capacidad de unión al ADN y una mayor actividad transcripcional (Shukla et al, 2010). Consecuentemente algunos de los genes que regula STAT3 se muestran sobre expresados, entre estos destacan Bcl-xL, survivina y Mcl-1 (Chen et al, 2007).

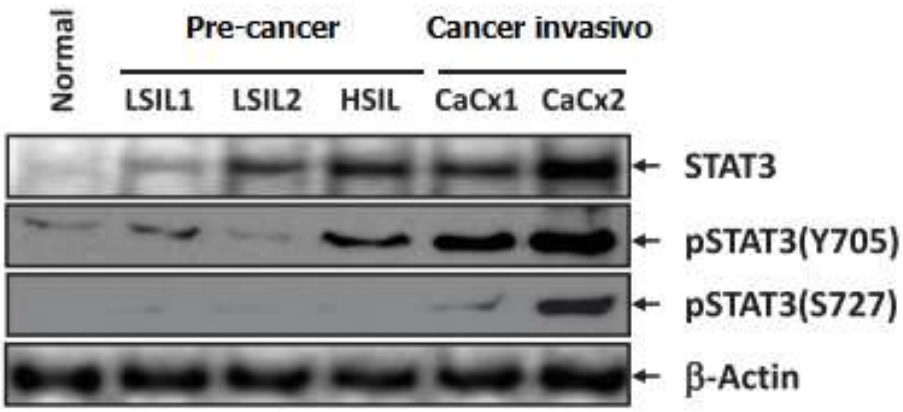

Figura 9. **Expresión de STAT3 y su fosforilación en diferentes grados de cáncer cervical**. Se incluyen LSIL (Lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado), HSIL (Lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado) y CaCx (Biopsias de CaCu) (Shukla et al, 2010).

En líneas celulares de cáncer cervical se demostró que por estimulación con eritropoyetina se induce la activación de STAT3 a través de JAK2 (Lopez et al, 2001), una vía alterna a la canónica y que recientemente se ha encontrado implicada en el mantenimiento de células con fenotipo Stem cell (Yu et al, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de la eritropoyetina como agente auxiliar en el tratamiento de la anemia en pacientes con cáncer tratados con quimioterapias es cada vez más común en la clínica debido a que la anemia ha surgido como un factor de mal pronóstico para la supervivencia a la enfermedad y como reflejo de la calidad de vida del paciente.

En diversos tipos de tejido canceroso, y específicamente en cáncer cervical, se ha asociado la sobreexpresión de STAT3 con la resistencia a quimiofármacos y una evolución más rápida y severa de la enfermedad.

Adicionalmente, en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo se demostró la activación de STAT3 en líneas de cáncer cervical como respuesta al estímulo por eritropoyetina, así como un efecto protector mediado por ésta contra la muerte por diversos quimiofármacos como el cisplatino.

Por otra parte, se ha caracterizado la sobrexpresión de algunos factores implicados en procesos de resistencia a quimiofármacos, entre los que destaca survivina, proteína implicada en diversos procesos celulares y regulada por STAT3.

Por lo tanto en este trabajo se analizará la posible activación de survivina como respuesta a la estimulación por eritropoyetina y su consecuente participación en procesos de resistencia a quimiofármacos.

IV. HIPÓTESIS

El efecto cito-protector de la Eritropoyetina contra cisplatino estará regulado por la activación de STAT3 y Survivina, dado que la estimulación con eritropoyetina induce la activación de STAT3, el cual regula la expresión de survivina.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar en la línea celular de cáncer cervical HeLa, si la protección mediada por eritropoyetina contra la muerte celular inducida por cisplatino se lleva a cabo a través de STAT3 y la activación de survivina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) del fármaco cisplatino en la línea celular HeLa.
- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de eritropoyetina sobre la muerte celular inducida por cisplatino.
- Evaluar la expresión de survivina en respuesta a la eritropoyetina.
- Determinar el efecto de la eritropoyetina sobre la fosforilación survivina.
- Evaluar la activación de la cinasa encargada de fosforilar a survivina, CDK1.
- Evaluar la activación de STAT3 en respuesta a la eritropoyetina.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Línea celular.

Se utilizó la línea celular HeLa derivada de CaCu. Esta se mantuvo en incubadora con 5% de CO_2 y a 37° C de temperatura en medio DMEM (In Vitro) con 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina y 2% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) inactivado (Incubación por 30 minutos a 57°C).

Cada vez que las células fueron replicadas se realizaron 2 lavados con PBS estéril (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 2 mM, pH=7.4) y se incubaron por 5 minutos con verseno estéril (EDTA 1mM, NaCl 0.17 mM. KCl 3 mM, Na_2HPO_4 10 mM pH=7.7). Al desprenderlas se recolectó la suspensión celular y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos para obtener el pellet que se sembraría en condiciones diferentes de acuerdo con el experimento a realizar.

B. Determinación de CI_{50}

Se realizaron pruebas de CI_{50} sembrando 50,000 células por pozo en placas de 96 pozos con medio DMEM al 1% SFB. Una vez adheridas (2 horas) se probaron concentraciones de cisplatino (cis-Diammineplatinum (II) dichloride, SIGMA) en un intervalo de (0-100 µM) y se completó un volumen final de 200 µl, se incubó la placa a 37° C con el metalofármaco por 24 horas para posteriormente retirar el medio con el tratamiento y determinar por medio de un ensayo MTT la viabilidad celular.

C. Ensayo MTT.

Una vez completado el tiempo de incubación se retiró el medio y se añadieron 100 µl de medio fresco (DMEM 1% SFB) y 50 µl de solución de MTT 2.4 mM. La placa se incubó de nuevo a 37° C por 2 horas y transcurrido este tiempo se retiró el medio. Se añadieron 150 µl de isopropanol para disolver el producto formado y una vez solubilizado se realizó la lectura de absorbancia del compuesto a 570 nm en el equipo BioTek ELx800 con espectrofotometría para obtener en función de la

absorbancia el número de células vivas interpolando en una curva patrón realizada previamente.

D. Ensayo de protección con Epo.

Se sembraron 50,000 células por pozo en placas de 96 pozos, se esperó su adherencia (2 horas) y se administraron concentraciones crecientes de Epo (0-200 U/ml) (Exetin-A, 4,000 UI/ml, PiSA BIOTEC) que se dejaron actuar por 2 horas. Posteriormente se añadió la CI_{50} del cisplatino hasta completar un volumen final de 200 µl y cuando se cumplieron 24 horas se determinó por medio de ensayos MTT la viabilidad celular.

E. Extracción de proteínas.

Se sembraron células en placas de 100 mm hasta alcanzar una confluencia cercana al 90% con 8 ml de DMEM 1% SFB y se llevó a cabo la estimulación de estas con la dosis determinada como de protección de Epo (125 U/ml) a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 30 y 60 minutos).

Una vez cumplidas las condiciones para cada ensayo los siguientes pasos se realizaron a 4°C. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS frío. Se agregó 1 ml más de PBS con el cual se rasparon las células de la caja y se recuperó el raspado en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugaron por 20 minutos a 13400 rpm y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 200 µl de amortiguador de lisis (Tris 50 mM pH=8, NaCl 150 mM, 1.0% Triton X-100, 0.5 % Deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS) que incluía inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) y de fosfatasas (Phospatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma Aldrich) para resuspender el pellet y se dejó en agitación constante por 20 minutos. El lisado obtenido se centrifugó por 3 minutos a 13400 rpm y se recuperó el sobrenadante para su cuantificación.

La cuantificación de proteína se realizó con el kit DC Protein Assay (BIO-RAD), de acuerdo con el protocolo se construyó una curva patrón con albumina de suero bovino (BSA, Santa Cruz Biotechnology) en un rango de concentraciones de

0.2 - 1.5 mg/ml con al menos 5 diluciones. Se colocaron 5 µl de cada dilución de la curva patrón así como5 µl de cada muestra a cuantificar en una placa de 96 pozos. Se añadió el volumen de cada reactivo en el orden indicando mezclando de manera suave y se incubó por 15 minutos. Una vez cumplido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 750 nm y con ayuda de la curva patrón se determinó la cantidad de proteína en cada muestra.

F. Western Blot.

Debido a la diferencia en el tamaño de las proteínas a analizar se utilizaron dos condiciones diferentes en esta técnica. Para buscar las proteínas survivina y CDK1 se hizo un gel de acrilamida al 15%, la electroforesis se realizó a 150 V por 1 hora y media y la transferencia a 300 mA por una hora (Membrana Nitrocelulosa, 0.2 µm Bio-Rad). Para STAT3 el gel se hizo al 8%, se corrió por 1 hora a 150 V y se transfirió a 250 mA por hora (membrana PVDF, 0.45 µm, Immobilion-P, Millipore). Una vez terminada la transferencia se evaluó a simple vista al teñir con Rojo de Ponceau la presencia de los carriles en la membrana así como la cantidad de proteína relativa entre carriles.

Una vez desteñidas las membranas se bloquearon por 1 hora a temperatura ambiente con una solución de leche al 3% en TBS-T (2.4 g Trizma HCl, 8.0 g NaCl, 1 ml Tween 20/ 1 L, pH=7.6) y se incubaron toda la noche a 4° C con agitación constante en las siguientes diluciones:

pSurvivina Thr34 (sc-23758-R, 1:200), pSurvivina Thr117 (ab195754, 1:250), Survivina (GTX-100441, 1:200), Cdc2 (ab32384, 1:200), Cdc2 deP-Y15 (ab18-100, 1:200), Cdc2 P-T161 (ab47329 1:200), STAT3 pTyr705 (GTX-61820, 1:1,500), STAT3 (GTX-104616, 1:500) y GAPDH (GTX-100118, 1:15,000).

Se hicieron 3 lavados con la solución TBS-Tween por 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG-HRP (sc-2004, 1:20,000) por 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados más y se utilizaron los reactivos

quimio-luminiscentes Femto West Signal (Thermo Scientific) y Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) con diferentes tiempos de exposición.

G. Análisis estadístico de datos.

Los resultados de los experimentos de protección por Epo se analizaron con el programa IBM SPSS Statistics v20. Se analizarón el promedio de tres experimentos realizados de manera independiente ±2 desviaciones estándar para cada medición. Para establecer si existían diferencias significativas entre las diferentes condiciones del experimento se analizaron los datos con una ANOVA de una vía. Se estableció como diferencias estadísticamente significativas cuando $p<0.05$ en comparación con la CI_{50}.

En cuanto a la densitometría para los Western blots se utilizó el programa ImageJ el cual permite cuantificar y comparar de manera relativa los niveles de proteína de acuerdo al número de pixeles en la imagen. Cada proteína analizada se estandarizó con su respectivo control de carga permitiendo la comparación entre las condiciones estudiadas en un mismo blot.

VII. RESULTADOS

A. La eritropoyetina protege a las células HeLa contra la muerte inducida por cisplatino

Con el fin de corroborar el efecto protector de Epo se determinó inicialmente la CI_{50} de cisplatino para la línea celular HeLa. La dosis letal de cisplatino evaluada en 3 experimentos independientes a 24 horas se estableció en 18 µM. Con este valor se evaluó la dosis de Epo necesaria para llevar a cabo el efecto protector contra la muerte por cisplatino.

Al evaluar el efecto de la administración conjunta de Epo y cisplatino en la viabilidad celular se observó que existe un efecto protector de la Epo contra la muerte por cisplatino de manera dosis dependiente (Figura 10). En las concentraciones evaluadas en el rango de 125 U/ml a 200 U/ml se observa que la viabilidad celular es prácticamente igual a la del control sin cisplatino y presentan una diferencia significativa con respecto al control sin eritropoyetina.

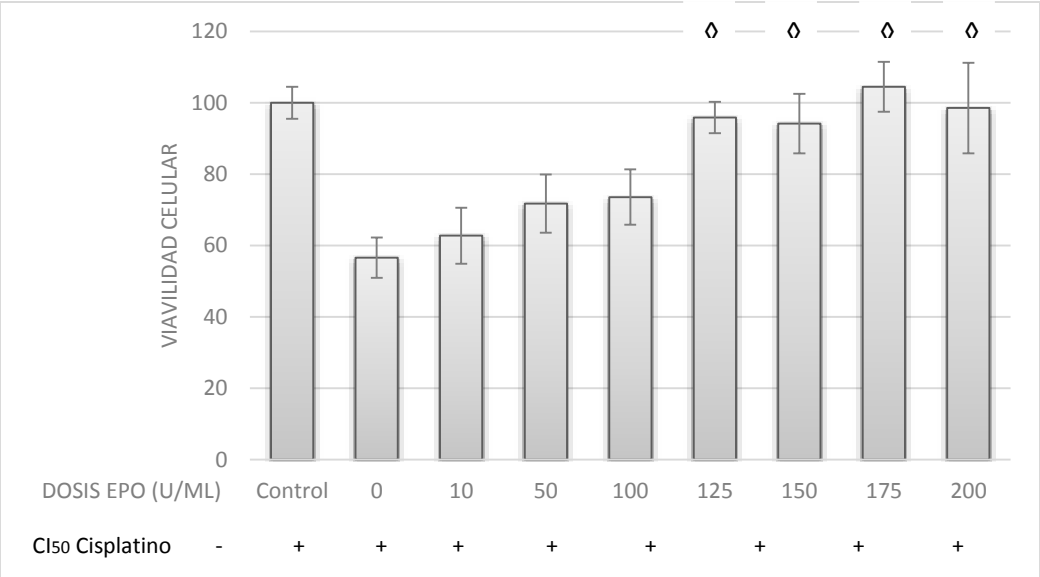

Figura 10. **Efecto protector de la Epo sobre la muerte inducida por cisplatino en células HeLa.** Las células fueron pre-incubadas con las concentraciones indicadas de Epo y 2 horas después fueron tratadas con la CI_{50} de cisplatino. La viabilidad celular se midió a las 24 hrs por el ensayo de MTT. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos realizados de manera independiente con se desviación estándar. $P<0.05$ en comparación con 0 U/ml de Epo y CI_{50} de cisplatino.

A partir de esto se seleccionó la dosis de Epo de 125 U/ml para utilizarla en los experimentos subsecuentes donde se evaluó la activación de STAT3, survivina y CDK1.

B. La eritropoyetina induce la activación transitoria de STAT3.

STAT3 es un factor transcripcional que ha sido asociado a fenómenos de citoprotección (Barré et al, 2007). Por lo que analizamos si el estímulo con Epo induce la activación de STAT3.

Como se observa en la Figura 11, existe una cantidad basal de STAT3 fosforilada que aumenta progresivamente desde el primer minuto de estimulación con Epo, se alcanza un nivel máximo a los 10 minutos y después hay una disminución hasta un nivel imperceptible a los 60 minutos. En cuanto a la proteína basal, no existen variaciones significativas en sus niveles al comparar en el rango de tiempo estudiado.

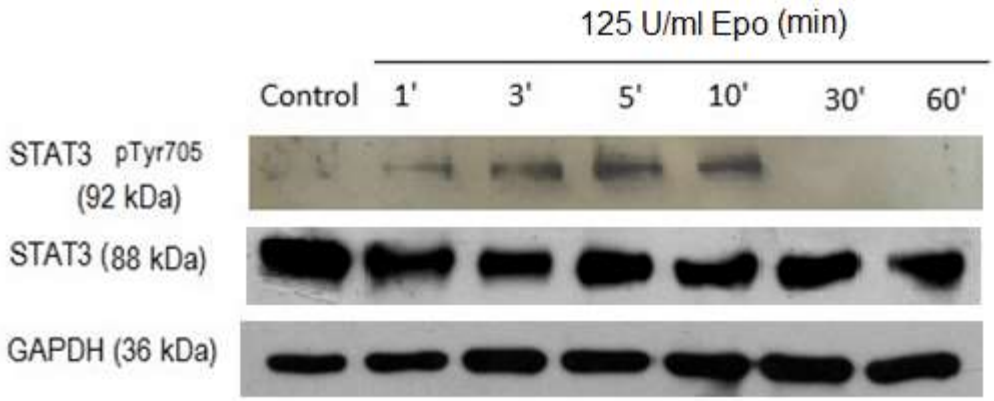

Figura 11. **Activación de STAT3 en función del tiempo de exposición a Epo en células HeLa.** Se utilizó extracto total de proteína para analizar la presencia de STAT3, STAT3 (pTyr705) y GAPDH por Western blot. Los carriles incluyen la estimulación con eritropoyetina (125 U/ml) a diferentes tiempos y un control en el que no se adicionó eritropoyetina.

Cuando STAT3 es fosforilada y forma dímeros activos, es capaz de translocarse al núcleo para llevar acabo su función transcripcional. Uno de los genes blanco de STAT3 es el de la proteína anti-apoptótica y pro-proliferativa survivina, por lo que se procedió a analizarla.

C. La eritropoyetina induce la expresión y fosforilación de survivina.

Entre los blancos transcripcionales de STAT3, survivina surge como una proteína de gran relevancia por su participación en mecanismos anti-apoptóticos y de sobrevivencia celular. Sin embargo su activación como respuesta a un estímulo por Epo es desconocida.

Aunque las células HeLa expresan cantidades considerables de survivina total, es evidente que esta cantidad aumenta desde el primer minuto de estimulación con Epo, como se muestra en la Figura 12. A los 3 minutos posteriores al estímulo se puede apreciar que la cantidad de proteína aumenta considerablemente con respecto de la cantidad inicial y que esta se mantiene hasta los 10 minutos, a partir de donde esta empieza a disminuir hasta alcanzar un nivel similar al control sin eritropoyetina.

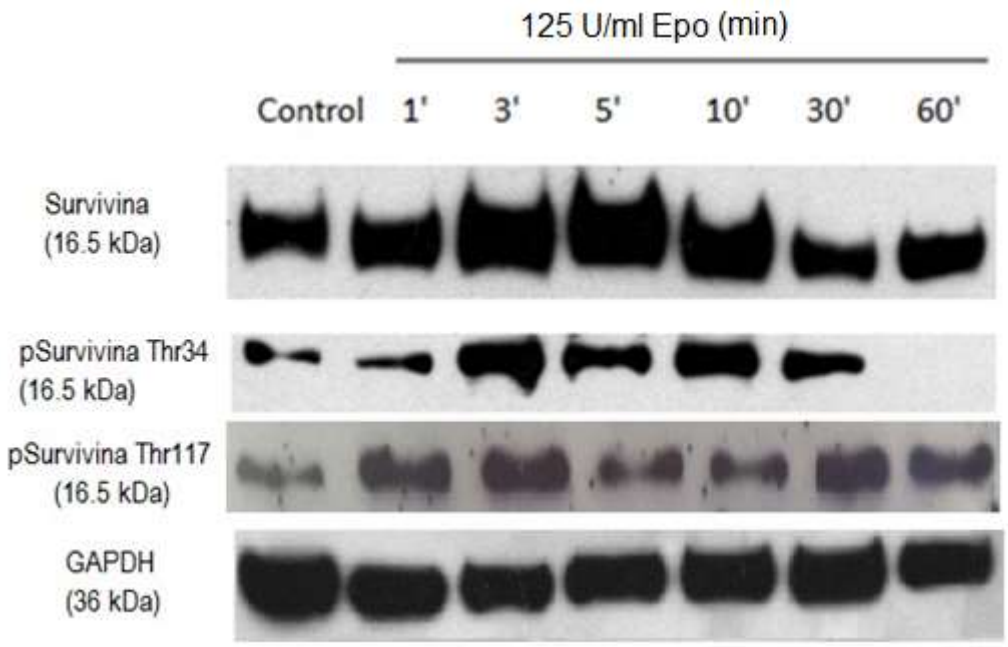

Figura 12. **Modificaciones en survivina total y fosforilada como respuesta a Epo en células HeLa.** Se utilizó extracto total de proteína para analizar la presencia de survivina, p-survivina Thr34 y p-survivina Thr117 y GAPDH por Western blot. Los carriles incluyen la estimulación con eritropoyetina (125 U/ml) a diferentes tiempos y un control en el que no se adicionó eritropoyetina.

Las fosforilaciónes de survivina en sus residuos Thr34 y Thr117 definen su localización subcelular y por lo tanto su participación en procesos altamente regulados como la replicación celular o la inhibición de la apoptosis por lo que se decidió estudiar si la Epo induce la fosforilación de estos residuos.

En cuanto a la fosforilación en el residuo Thr34 de survivina también existen variaciones en función del tiempo como respuesta a la eritropoyetina. Cuando no se administra eritropoyetina existe una cantidad basal mínima de la proteína fosforilada en este residuo, la cual aumenta a los 3 minutos posteriores al estímulo y se mantiene hasta los 10 minutos, y al igual que la proteína no total posteriormente empieza a disminuir hasta ser imperceptible a los 60 minutos (Fig. 12).

Por otra parte, aunque la survivina fosforilada en Thr117 también se presenta en una concentración basal mínima parece tener un comportamiento diferente ya que el aumento de la proteína con esta fosforilación inicia desde el primer minuto para disminuir progresivamente hasta alcanzar un nivel similar al inicial después de 10 minutos (Fig. 12).

Aunque ambas fosforilaciones son necesarias durante la mitosis, aquí observamos que no necesariamente se presentan durante el mismo intervalo de tiempo, cada una tiene un comportamiento distinto atribuido principalmente a las cinasas encargadas de llevar a cabo la fosforilación.

Al analizar estos resultados y considerando que la fosforilación de la survivina es altamente regulada por diversos factores en todo momento en la célula, resulta de gran interés para nosotros profundizar en la fosforilación del resido Thr34 que es para el cual se han descrito funciones de inhibición de la apoptosis e incluso se ha asociado con la resistencia a quimiofármacos.

D. La eritropoyetina induce la activación de CDK1.

La fosforilación en Thr34 de survivina es mediado por la actividad de CDK1 (Cinasa Dependiente de Ciclina 1) que es una de las cinasas más importantes en el control del ciclo celular. Por lo que se decidió analizar las modificaciones que sufre esta cinasa para su activación como respuesta al estímulo por Epo.

En la Figura 13 en donde se analizan CDK1 y sus variantes a través de Western blot se observa en primer lugar que la proteína constitutiva, se incrementa progresivamente a partir del primer minuto de estimulación con eritropoyetina y hasta los 30 minutos. La fosforilación en Thr161 y la defosforilación en Tyr-15 de esta cinasa mantienen el mismo patrón, alcanzan un nivel máximo entre los 3 y 5 minutos que se mantiene hasta los 30 minutos posteriores a la estimulación.

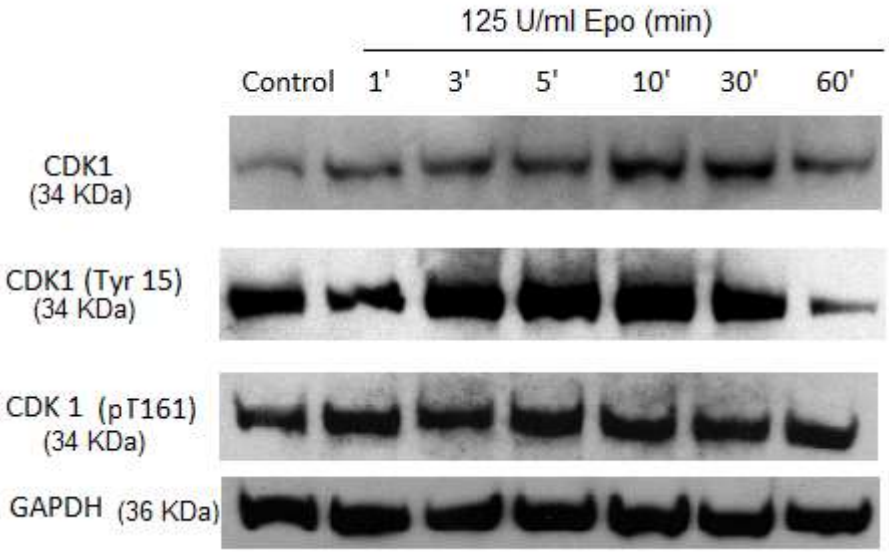

Figura 13. **Modificaciones en CDK1 total y fosforilada como respuesta a Epo en células HeLa.** Se utilizó extracto total de proteína para analizar la presencia de CDK1 total y 2 modificaciones que determinan su activación, la presencia del residuo Tyr15 defosforilado (CDK1 (Tyr15)), así como la presencia del residuo Thr161 fosforilado (CDK1 (pThr161)). Los carriles incluyen la estimulación con eritropoyetina (125 U/ml) a diferentes tiempos y un control en el que no se adicionó eritropoyetina.

Es de destacarse que la combinación de estas modificaciones que activan completamente a la cinasa mantienen el mismo patrón de aumento entre ellas, de 3 a 30 minutos después de la estimulación con eritropoyetina y además coinciden con la fosforilación de survivina en la Thr34.

Al analizar de manera conjunta las modificaciones que sufren STAT3, survivina y CDK1 como respuesta a la estimulación por Epo, comprobamos que existe una correlación entre la estimulación con esta hormona y la activación de estas proteínas a través de fosforilaciones.

VIII. DISCUSIÓN

La terapéutica del cáncer actualmente se enfrenta con el reto de optimizar los tratamientos existentes, que a pesar de ser efectivos contra algunos tipos de cáncer, no son capaces de eliminar aquellos en los que se han encontrado factores de resistencia, dando lugar a que se desarrollen y eventualmente provoquen la muerte.

Por esta razón existen actualmente diversos estudios que buscan moléculas dirigidas hacia blancos claves que determinan el progreso de la enfermedad. Entre éstos la survivina surge como un blanco muy atractivo por su participación en procesos anti-apoptóticos y de replicación celular, características asociadas a la resistencia a quimiofármacos.

En este trabajo se evaluó la viabilidad celular cuando se administran de manera concomitante Epo y cisplatino en la línea celular HeLa y se corroboró que existe un efecto protector contra la muerte celular. Dicha observación se presenta con un comportamiento dosis dependiente y mantiene la viabilidad celular cuando se administran cantidades mayores a 125 U/ml de Epo. Este resultado concuerda con reportes previos de nuestro laboratorio (Vázquez-Mellado Petit, 2009).

Clínicamente, los tratamientos con Epo utilizados para combatir la anemia, han sido asociados al crecimiento y desarrollo de tumores (Szenajch et al, 2010). Aunque este efecto no ha sido demostrado, es claro que existe la necesidad de caracterizar la interacción de esta hormona y las células cancerígenas para poder mejorar los tratamientos y por lo tanto la calidad de vida de los pacientes.

El efecto protector de la Epo ha sido ampliamente estudiado en diversos tejidos y contra diferentes condiciones de estrés celular, por ejemplo, en diabetes contra estrés oxidativo al mantener el potencial de la membrana mitocondrial y evitando la degradación apoptótica del DNA en células endoteliales y en neurodegeneración previniendo daño por exposición a radicales libre o reduciendo la perdida cognitiva por daño mecánico (Maiese et al, 2008).

Así mismo es importante resaltar la presencia del receptor para eritropoyetina en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón, ovario y mama y gliomas (Geza et al, 2001). Sus implicaciones en procesos de resistencia a quimiofármacos no han sido del todo esclarecidas ya que existen diferencias entre los resultados obtenidos, lo que ha llevado a que a la Epo se mantenga en uso constante como agente estimulador de la eritropoyesis en pacientes anémicos de quimioterapias (Aapro et al, 2012).

La unión de este receptor con su ligando genera dentro de la célula la activación de JAK2, que es capaz de fosforilar en diferentes miembros de la familia STAT, a través de los cuales se favorece la transcripción de genes implicados en procesos de proliferación, diferenciación y anti-apoptóticos (Maiese et al, 2008).

En trabajos realizados previamente por nuestro grupo se demostró la presencia del receptor para eritropoyetina en las líneas celulares de CaCu HeLa, SiHa y C33. Posteriormente se evaluó la activación de diferentes componentes de señalización celular y se demostró la activación de JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5 por efecto de la estimulación con eritropoyetina (López et al. 2011).

STAT3 es un factor transcripcional que tiene como blanco algunos genes involucrados en procesos de sobrevivencia, los cuales se han encontrado sobre-expresados en distintos tipos de cáncer como el de mama (Santillán-Benítez et al, 2014), cabeza y cuello (Mali, 2015), próstata (Qin et al, 2008), ovario (Burke et al, 2001) y mieloma (Catlett-Falcone et al, 1999).

La presencia y activación de STAT3 en tejidos malignos se asocia con angiogénesis, invasión, metástasis y anti-apoptosis, por lo que es incluso considerado como un oncogén (Barré et al, 2007). Por esta razón se han diseñado diversos inhibidores (Siveen et al, 2014) en un intento por disminuir su participación en el progreso de la enfermedad y mejorar la respuesta a quimiofármacos como se ha demostrado *in vitro* (Ji et al, 2013; Han et al, 2013)

Para que STAT3 pueda llevar a cabo su función transcripcional es necesaria su activación a través de la fosforilación del residuo Tyr705; esta modificación ocurre

cuando STAT3 interacciona con cinasas de tirosina asociadas a receptores de citosinas o de factores de crecimiento activados (Johnston et al, 2011) como el de Epo (López et al, 2011). Una vez activa, STAT3 forma dímeros que se translocan a núcleo para llevar a cabo su actividad transcripcional.

Al comparar la activación de STAT3 en etapas tempranas del cáncer cervical se encontró que conforme aumenta el grado de la lesión, aumenta progresivamente la cantidad de STAT3 fosforilada en el residuo Tyr705 (Chen et al, 2007). De igual manera, cuando se analizaron lesiones avanzadas de cáncer cervical, el porcentaje de muestras que presentan un aumento tanto en el transcrito de STAT3 como de la fosforilación en Tyr705 es mayor al 60% (Shukla et al, 2010).

Por lo tanto, aunque eran de esperarse niveles basales de STAT3 fosforilado en el residuo Tyr705, el cambio en sus niveles como respuesta a estimulación por Epo en tiempos menores a 30 minutos demuestra que esta hormona puede de generar cambios en la línea celular HeLa a través de la activación de STAT3 y sus consecuentes efectos en la actividad transcripcional. El efecto más destacado aquí demostrado es la quimioresistencia que además se muestra dosis-dependiente; sin embargo, hasta este punto se desconoce el mecanismo por el que se presenta este resultado.

En CaCu se ha demostrado la sobreexpresión y activación de STAT3 en biopsias donde mientras mayor es el nivel de expresión y fosforilación, se asocia con un grado más avanzado de la enfermedad (Shukla et al, 2010). Así mismo se demostró que la activación de STAT3 en este tejido se asocia con la expresión de una serie genes relacionados con procesos anti-apoptóticos, entre ellos survivina (Chen et al, 2007).

De entre los genes activados por STAT3, survivina es considerada una de las proteínas con mayor relevancia por su expresión en distintos tipos de cáncer (Fukuda et al, 2006), su función anti-apoptótica (Chandele et al, 2004), su participación en procesos de replicación celular (Pannone et al, 2007) y su asociación a quimioresistencia (Chakravarti et al, 2004).

La expresión de survivina en células de cáncer pancreático (Asanuma et al, 2000), gástrico (Ikeguchi et al, 2002) y cervical (Zannoni et al, 2014) se muestra aumentada cuando éstas son tratadas con distintos quimiofármacos, por lo que se considera como un blanco clave en la regulación anti-apoptótica de células resistentes a tratamientos. Cuando se inhibe su expresión hay un aumento claro en la apoptosis, incluso sin quimiofármacos (Kappler et al, 2004; Miao et al, 2007).

En pacientes de CaCu, survivina ha sido estudiada como un marcador patológico, ya que un aumento en su expresión se asocia con el desarrollo y la evolución de cáncer (Xu et al, 2010), la sobrevivencia a la enfermedad (Zannoni et al, 2014) e incluso la anemia (Bache et al, 2007). Todas estas características respaldan la propuesta de usarla como un marcador de la enfermedad (Xue et al, 2011).

En este trabajo se demuestra por primera vez que existe una relación entre el aumento de los niveles de survivina y la estimulación por Epo en células de CaCu. Dado que la survivina se regula a través de distintos factores transcripcionales dependientes de citosinas hematopoyéticas (Altieri, 2003), la activación de su expresión como respuesta a la Epo en tiempos muy cortos resalta la importancia de ésta como moduladora de respuestas rápidas en condiciones de estrés para la célula.

También se analizó el efecto de la eritropoyetina sobre los niveles de la proteína fosforilada de la proteína en el residuo Thr34, la cual denota la activación de su función anti-apoptótica al ser una modificación permite la unión de factores pro-apoptóticos. Cuando este residuo es sustituido por uno no fosforilable, la proteína no puede unirse a Casapasa-9 y pierde su función anti-apoptótica durante la división celular (O'Connor et al, 2000).

Existen alteraciones en los niveles de Survivina fosforilada en Thr34 por efecto de la eritropoyetina con un patrón similar al de la proteína no fosforilada, alcanzadose un nivel máximo de activación entre 3 y 10 minutos posteriores a la estimulación para ser prácticamente imperceptible a los 60 minutos.

Esta fosforilación en células normales le permite a survivina asociarse con moléculas del CPC y localizarlas correctamente, evitando eventos de catástrofe mitótica y llevando la replicación celular a buen término (Carmena et al, 2012); mientras que en cáncer cuando la fosforilación se inhibe, las células que sufren arresto mitótico por algún error de segregación no pueden ser rescatadas de la apoptosis e incluso mejora el efecto de quimiofármacos como el Taxol (O'Connor et al, 2002). Por lo tanto, esta modificación es considerada como parte importante de su activación anti-apoptótica durante a replicación celular.

Este podría ser uno de los mecanismos involucrados en la quimioresistencia que se observa en las células HeLa contra la muerte por cisplatino inducida por eritropoyetina, tampoco descrito con anterioridad. De ser así, resulta interesante poder elucidar a través de que mecanismo se genera este efecto, por interacción con otro miembro de la familia de IAP como XIAP (Proteina Inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X) (Dohi et al, 2007) o por unión a Caspasas (Dohi et al, 2004).

Por otra parte la fosforilación en el residuo Thr117 se asocia con la estabilidad del CPC durante la replicación celular, cuando este residuo es mutado por otro fosfomimético Survivina es incapaz de localizarse correctamente dentro el núcleo y evita la condensación cromosomal (Wheatley et al, 2004).

Ambas modificaciones le confieren a survivina la capacidad de involucrarse con dos procesos aparentemente opuestos, pero que guardan una íntima relación a nivel de regulación celular. La participación de la survivina en la inhibición de la apoptosis se debe a su capacidad de interactuar con Caspasa-3(Li et a, 1998), Caspasa-9 (Dohi et al, 2004), con XIAP (Dohi et al, 2007) o con el complejo SMAC/DIABLO (Sun et al, 2005), liberando a otras proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) e incluso induciendo la fragmentación mitocondrial (Hagenbuchner et al, 2013). Mientras que la correcta localización de otros miembros del CPC es fundamental para la replicación y la propagación celular.

La fosforilación de Survivina como respuesta a la Epo revela que además de modular la expresión de Survivina, la activación de STAT3 podría también tener efectos sobre la proteína que llevan a cabo esta modificación, la cinasa reguladora del ciclo celular CDK1, otro blanco transcripcional de STAT3 implicado en procesos de proliferación y sobrevivencia (Yu et al, 2014).

CDK1 (Cinasa dependiente de Ciclina 1) es una de las cinasas más importantes en el control del ciclo celular ya que es la única esencial para mantener a las células y es capaz de llevar a cabo la activación del ciclo celular en ausencia de las otras CDKs (Santamaría et al, 2007).

CDK1 debe cumplir con diferentes condiciones para poder llevar a cabo su función. Existen 3 modificaciones principales a las que debe ser sometida para alcanzar un estado activo completo. Una vez que la célula se ha comprometido en la replicación celular y cumple con todos los puntos de control, Cdc25 lleva a cabo la defosforilación de Tyr14 y Tyr15, aminoácidos clave para regular la actividad por ubicarse en el dominio de unión de la cinasa, y CAK (activadora de cinasas CDK) fosforila a CDK1 en el residuo Thr161, todo en el citoplasma y durante la fase G2 para ser translocada a núcleo al inicio de la mitosis vez que alcanza su activación (Ayeni et al, 2015; Castedo et al, 2004).

En estudios previos se determinó que Survivina tiene una vida media aproximada de treinta minutos así como un patrón de expresión y localización dependiente del ciclo celular, alcanzando su máximo durante las fases G2 y M (Zhao et al, 2000), coincidiendo con las fases en las que CDK1 se encuentra de manera activa y altamente regulada.

En concordancia con estos datos, encontramos que la activación total de CDK1 (defosfoTyr15 y fosfoThr161) como respuesta a Epo se da en el mismo rango que el de la Survivina, entre 3-10 minutos posteriores al estímulo, manteniéndose incluso hasta los 30 minutos. Además existe un aumento gradual en la cantidad de CDK1 hasta los 30 minutos.

Este resultado demuestra que la Epo es capaz de inducir un aumento en los niveles de CDK1 tanto activada como no activada, mostrando una vía a través de la cual induce su efecto de proliferación celular. Esta activación puede ser a través de *Cdc2,* el gen que codifica para CDK1 y que también es un blanco transcripcional de STAT3 (Yu et al, 2014).

La activación y sobre expresión de CDK1 en líneas celulares de cáncer de mama se asocia con una recaída aun cuando los pacientes se encuentran libres de nodos y se propone como un posible marcador para la enfermedad (Kim et al, 2014), mientras que en PC3, línea celular de cáncer de próstata, la inhibición de CDK1 provoca una disminución en el crecimiento de células resistentes a everolimus, un quimiofármaco aprobado para su uso en pacientes con tumores sólidos (Tsaur et al, 2011).

En CaCu no se ha descrito asociación alguna entre la sobreactividad de esta cinasa y la evolución de la enfermedad, sin embargo aquí aportamos evidencia que sugiere que el estudio de esta podría demostrar tener mayores implicaciones ya que por sí misma es capaz llevar a cabo el progreso del ciclo celular (Santamaría et al, 2007). Su activación por una citosina evidencia que en respuesta al estímulo correcto esta podría ser determinante tanto en el desarrollo de la enfermedad como en la quimioresistencia.

En conclusión, en este trabajo se describió por primera vez un aumento en los niveles de Survivina, así como su activación a través de la fosforilación de sus residuos Thr34 y Thr117, ambos implicados en procesos de replicación celular y sobrevivencia, al igual que un aumento en los niveles de CDK1, activada y no activada, como respuesta a la estimulación por Epo y por posible activación transcripcional de STAT3 (Fig. 14). Se ha demostrado que existen interacciones entre las proteínas analizadas en este trabajo, con un enfoque específico hacia la protección contra la muerte por quimiofármacos.

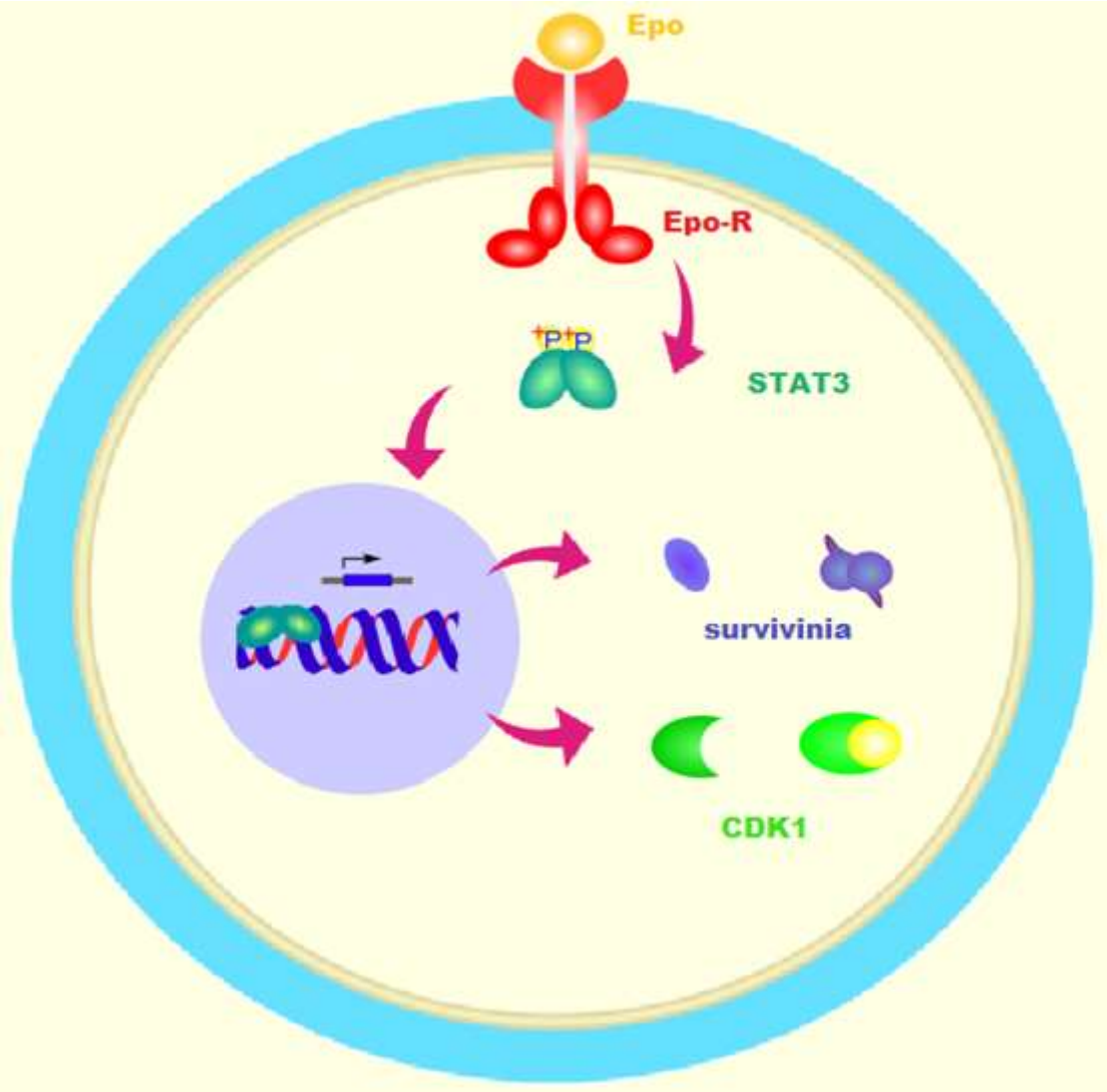

Figura 14. **Representación de los hallazgos realizados en células HeLa como respuesta a Epo.** En células HeLa, como respuesta a la activación del receptor para Epo (Epo-R), existe un incremento en la cantidad de STAT3 total y activado, el cual es capaz de regular la transcripción de los genes que codifican para survivina y CDK1. Así mismo existe un aumento en los niveles de estas 2 proteínas y en sus formas fosforiladas, destacando que la tendencia y niveles máximos de activación para survivina y CDK1 coinciden en función del tiempo.

Los resultados de este trabajo, permiten el planteamiento de una serie de posibilidades e interacciones que parecen tener un alcance aún desconocido en procesos de quimioresistencia y replicación celular, por lo que un estudio más a fondo de todas estas posibilidades permitirá integrar los factores aquí identificados como responsables de un efecto de quimioresistencia para su futuro estudio de manera conjunta en apoyo a la investigación de tratamientos más efectivos contra el cáncer.

IX. CONCLUSIONES

- La administración de eritropoyetina tiene un efecto protector contra la muerte celular inducida por cisplatino en células HeLa.

- La estimulación con eritropoyetina en la línea celular HeLa aumenta la cantidad de STAT3 fosforilada y total.

- Existen alteraciones en los niveles de survivina total y fosforilada en Thr34 y Thr117 como respuesta al estímulo por eritropoyetina.

- Los niveles de CDK1 activa y basal aumentan como respuesta al tratamiento con eritropoyetina.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar por PCR tiempo real variaciones en los transcritos de survivina y CDK1 mediados por Epo.

- Definir la participación de STAT3 en la modulación transcripcional de survivina mediante su inhibición con (S3I-201).

- Evaluar la activación de survivina y CDK1 cuando se inhibe STAT3.

- Evaluar el efecto cito-protector de eritropoyetina contra cisplatino cuando STAT3 esta inhibido.

- Inhibir a survivina a través de un siRNA específico y evaluar el efecto cito-protector de eritropoyetina contra cisplatino.

XI. REFERENCIAS

- Aapro et al. Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer (Minireview). British Journal of Cancer (2012). 106:1249 – 1258.
- Abels et al. Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) for the Treatment of the Anemia of Cancer. The Oncologist (1996). 1:140-150.
- Altieri. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. Oncogene (2003). 22:8581–8589.
- Asanuma et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. Japanese journal of cancer research (2000). 91:1204-1209
- Athanasoula et al. Survivin beyond physiology: Orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. Cancer Letters (2014). 347:175–182.
- Ayeni et al. “Ready, Set, Go”: Checkpoint regulation by Cdk1 inhibitory phosphorylation. Fly (2015). 8:140-147
- Bache et al. Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy. Gynecologic Oncology (2007). 104:139–144.
- Barré et al. The STAT3 oncogene as a predictive marker of drug resistance. TRENDS in Molecular Medicine (2007). 13:4-11.
- Bríd et al. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. Cancer Treatment Reviews (2009). 35:553–562.
- Burke et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. Oncogene (2001). 20:7925-7934.
- Candelaria et al. Anemia in Cervical Cancer Patients. Medical Oncology (2005). 22:161–168.
- Carmena et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis (Review). Nature Reviews (2012). 13:789-803.
- Castedo et al. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. Cell death and differentiation (2002). 9:1287-1293.

- Catlett-Falcone et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity (1999). 10:105-115.
- Chakravarti et al. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. Oncogene (2004). 23:7494-7506.
- Chandele et al. Upregulation of Survivin in G2/M Cells and Inhibition of Caspase 9 Activity Enhances Resistance in Staurosporine-Induced Apoptosis (2004). Neoplasia. 6:29-40.
- Chen et al. Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. British Journal of Cancer (2007). 96:591 – 599.
- Connor et al. A p34 cdc2 survival checkpoint in cancer. Cancer cell (2002). 2:43-54
- Coskun et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacological Research (2013). 76:1-8.
- Dasari et al. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. European Journal of Pharmacology (2014). 740:364–378.
- Decker. Introduction: STATs as essential intracellular mediators of cytokine. Cellular and Molecular Life Sciences (1999). 55:1505–1508.
- Dohi et al. Compartmentalized Phosphorylation of IAP by Protein Kinase A Regulates Cytoprotection. Molecular Cell (2007). 27:17–28.
- Dohi et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. Journal of Clinical Investigation (2004). 114:1117-1127
- Doorbar et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Reviews in Medical Virology (2015). 25:2–23.
- Ferrandina et al. Anemia in patients with locally advanced cervical carcinoma administered preoperative radiochemotherapy: Association with pathological response to treatment and clinical outcome. Gynecologic Oncology (2006). 103:500–505.
- Fried W. Erythropoietin and erythropoiesis. Experimental Hematology (2009). 37:1007–1015.

- Fukuda et al. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. Molecular Cancer Therapeutics (2006). 5:1087-1098.
- Geza et al. Erythropoietin and Erythropoietin Receptor Expression in Human Cancer. Cancer Research (2001). 61:3561–3565.
- Globocan 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
- Green et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix (Review). Cochrane Database Systematic Reviews (2005). 3:CD002225.
- Gu et al. Contribution of STAT3 to the activation of survivin by GM-CSF in CD34+ cell lines. Experimental Hematology (2007). 35:957–966.
- Guías diagnosticas 2013, Cáncer Cervicouterino. Oncología. Hospital General de México. Versión 1.2013.
- Gurumurthy et al. Human papillomavirus update (including vaccination). Obstetrics, Gynaecology And Reproductive Medicine (2013). 23:8.
- Hagenbuchner et al, 2013. BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. Oncogene (2013). 32:4748-4757.
- Han et al. Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications (2013). 435:188-194.
- Hill et al. Organo-platinum complexes as antitumor agents (Review). Anticancer Research (1982). 2:173–186.
- Ikeguchi et al. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. Apoptosis (2002). 7:23-29
- INEGI, 2013. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer.
- INEGI, 2015. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer.
- Ji et al. Abrogation of constitutive Stat3 activity circumvents cisplatin resistant ovarian cancer. Cancer Letters (2013). 341:231-239.
- Johnston et al. STAT3 SIGNALING: Anticancer Strategies and Challenges (Review). Molecular Interventions (2011). 11:18-26

- Kanda et al. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. Oncogene (2004). 23:4921–4929.
- Kappler et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. Cancer gene therapy (2004). 11:186-193
- Kim et al. The cell cycle profiling-risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy. Cancer Letters (2014). 355:217–223
- Levy et al. STATS: transcriptional control and biological impact (Review). Molecular cell biology (2002). 3:651-662.
- Li et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature (1998). 396:580-584.
- Long et al. Clinical approach to diagnosis and management of cancer of the cervix and vulva. Surgical Pathology (2011). 4:1–16.
- Lopez et al. Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. International Journal of Cancer (2011). 129:2566–2576.
- Maiese et al. Erythropoietin: Elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. Progress in Neurobiology (2008). 85:194–213.
- Mali. Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer. Oral Oncology (2015). 51:565-569.
- Miao et al. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. World journal of gastroenterology (2007). 13:1170-1174
- Muñoz et al. HPV in the etiology of human cancer. Vaccine (2006). S3:1–10
- Necochea-Campion et al. Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. Cancer Letters (2013). 339:167–174.
- O'Connor et al. A $p34^{cdc2}$ survival checkpoint in cancer. Cancer Cell (2002). 2:43-54.

- O'Connor et al. Regulation of apoptosis at cell division by $p34^{cdc2}$ phosphorylation of survivin. Proceedings of the National Academy of Sciences (2000). 24: 13103–13107.
- Pannone et al. Survivin phosphorylation and M-phase promoting factor in oral carcinogenesis. Histology and Histopathology (2007). 22:1241-1249.
- Qin et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation. Cancer Research (2008). 68:7736-7741.
- Rjiba-Touati et al. Induction of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei by cisplatin in rat bone-marrow cells: Protective effect of recombinant human erythropoietin. Mutation Research (2012). 747:202–206.
- Sancho-Martínez et al. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. Pharmacology & Therapeutics (2012). 136:35–55.
- Santamaría et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. Nature (2007). 448:811-815
- Santillán-Benítez et al. JAK2, STAT3 and SOCS3 gene expression in women with and without breast cancer. Gene (2014). 547:70-76.
- Shukla et al. Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. Molecular Cancer (2010). 9:282.
- Siddick. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene (2003). 22:7265–7279.
- Silver et al. Effects of Recombinant Human Erythropoietin on the Antitumor Effect of Cisplatin in SCID Mice Bearing Human Ovarian Cancer: A Possible Oxygen Effect. Gynecologic Oncology (1999). 73:280 –284.
- Siveen et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. Biochimica et biophysica acta (2014). 1845:136-154.

- Smith et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. International Journal of Cancer (2007). 121:621–32.
- Stanley. Pathology and epidemiology of HPV infection in females (Review). Gynecologic Oncology (2010). 117:S5–S10.
- Sun et al. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. Biochemistry (2005). 44:11–17.
- Szenajch et al. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells. From clinic to bench - a critical review (Review). Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer (2010). 1806:82-95.
- Tsaur et al. The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line. Cancer Letters (2011). 313:84–90
- Vázquez-Mellado Petit. Efecto de la eritropoyetina recombinante humana sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 2009.
- Walboomers et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. Journal of Pathology (1999). 189:12-19
- Wang et al. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nature Reviews (2005). 4:307-320
- Wang et al. Acetylation Directs Survivin Nuclear Localization to Repress STAT3 Oncogenic Activity. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (2010). 46:36129–36137.
- Weiss et al. Anemia of Chronic Disease. The New England Journal of Medicine (2005). 352:10.
- Wheatly et al. Aurora-B Phosphorylation in Vitro Identifies a Residue of Survivin That Is Essential for Its Localization and Binding to Inner Centromere Protein (INCENP) in Vivo. Journal of Biological Chemistry (2004). 279:5655-5660.

- Wheatly et al. Phosphorylation by aurora-B negatively regulates survivin function during mitosis. Cell Cycle (2007). 6:1220-1230
- Wheatly et al. Survivin: A Protein with Dual Roles in Mitosis and Apoptosis (Review). International Review of Cytology (2005). 247:35-88.
- Wormald et al. Commercial interest grows in glycan analysis. Nature Biotechnology (2007). 25:145 – 146.
- Xu et al. Expression of Survivin Gene among Human Normal Endometrium, Atypical Hyperplasia of Endometrium and Endometrial Carcinoma. Journal of Reproduction and Contraception (2010). 21:129-135
- Xue et al. Detection of survivin expression in cervical cancer cells using molecular beacon imaging: new strategy for the diagnosis of cervical cancer. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (2011). 159:204–208.
- Yu et al, Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions (Review). Nature Reviews Cancer (2014). 14:736-746.
- Zannoni et al. Survivin Protein as Predictor of Pathological Response in Locally Advanced Cervical Cancer Patients Treated with Chemoradiation Followed by Radical Surgery. Human Pathology (2014). 45:1872-1878
- Zhao et al. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. Journal of Cell Science (2000). 113:4364-4371.