



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FAULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**La interleucina 2 induce la pérdida del potencial de membrana
mitocondrial, la activación de las caspasas 3 y 7 y la apoptosis en las células
de carcinoma de cérvix CALO e INBL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EDGAR IVAN TORRES CORIORILES

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: M. en C. Rosalva Rangel Corona
FES Zaragoza, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Rebeca López Marure
Instituto Nacional de Cardiología

COMITÉ TUTOR: Dr. Benny Weiss Steider
FES Zaragoza, UNAM.

Ciudad de México. Noviembre, 2016



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 19 de septiembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **TORRES CORIORILES EDGAR IVÁN** con número de cuenta **404100692** con la tesis titulada "La interlucina 2 induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la activación de las caspasas 3 y 7 y la apoptosis en las células de carcinoma de cérvix CALO e INBL", bajo la dirección de la **MTRA. ROSALVA RANGEL CORONA**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DR. BENNY WEISS STEIDER
Suplente: DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de octubre de 2016.

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 el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica.

Al programa de becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con número de becario: 385831 y de CVU: 631912.

Al programa PAPIME de la DGAPA por su apoyo en el proyecto PE206615.

A mi asesora y directora de tesis, la M. en C. Rosalva Rangel Corona y a los miembros de mi comité tutor Dra. Rebeca López Marure y al Dr. Benny Weiss Steider por su gran aportación para la elaboración de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y directora de tesis, la M. en C. Rosalva Rangel Corona por el tiempo dedicado, ayuda, apoyo y sugerencias para la elaboración de este trabajo, es un gran ejemplo a seguir.

A los miembros del comité tutor:

A la Dra. Rebeca López Marure por sus consejos, aportaciones y sugerencias para este proyecto.

Al Dr. Benny Weiss Steider por su tiempo y sobre todo por sus brillantes aportaciones para desarrollar este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Leticia Rocha Zabaleta, Dr. Alberto Monroy García y al Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández por todos sus consejos para mejorar mi trabajo.

A la Dra. Teresa Corona Ortega por su valioso conocimiento y consejos dados.

Al Sr. Don José Chavarría por la convivencia y el mantenimiento de los materiales del laboratorio.

A todos los alumnos del Laboratorio de Oncología Celular que me apoyaron en la realización de este proyecto: Josué, Fernando, Isaac, Sergio, Itzel, Santa.

Finalmente agradecer a la Biol. Guadalupe Gómez García por su apoyo y consejos en citometría de flujo.

DEDICATORIAS

A mis padres Ma. De Lourdes Corioriles Leyte e Ignacio Torres Torres por su amor, dedicación, apoyo, confianza y por permitirme una formación académica profesional, los amo y estoy muy agradecido con ustedes.

A mis hermanos Sergio y Vele por su apoyo en todos los aspectos de mi vida.

Por ultimo a mi esposa Martha Ramírez Ramírez y a mi hijo Diego Armando Torres Ramírez por comprender, soportar y ser cómplices de todos mis sueños y objetivos.

GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE	7
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	14
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	18
Cáncer	18
Citocinas	20
Interleucina 2 (IL-2)	21
Apoptosis	22
Camptotecina	23
Vía extrínseca o de receptores de muerte	24
Vía intrínseca o mitocondrial	25
Clasificación y funciones de las caspasas	26
Caspasa 6	29
Caspasas 3 y 7	29
Características morfológicas de células apoptóticas	30
Características bioquímicas de células apoptóticas	31
Familia de proteínas Bcl-2	31
IAPs	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS PARTICULARES	38
ANTECEDENTES DIRECTOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
Material biológico	40
Condiciones de cultivo y proliferación de las líneas celulares	40
Cultivo en presencia de IL-2	41

Determinación de síntesis de caspasa 3 y 7 activa	41
Determinación de anexina V/IP	41
Determinación de potencial de membrana mitocondrial.....	42
RESULTADOS	43
Evaluación de caspasas 3 y 7 activas mediante citometría de flujo.	43
Caspasa 3.....	43
Inducción por IL-2 de caspasa 3 activa en células de la línea de (CaCu) CALO.	44
Inducción por IL-2 de caspasa 3 activa en células de la línea de (CaCu) INBL.	45
Caspasa 7.....	46
Inducción por IL-2 de caspasa 7 activa en células de la línea de CALO.	47
Inducción por IL-2 de caspasa 7 activa en células de la línea de INBL.....	48
Análisis de apoptosis por la técnica de anexina-V/ioduro de propidio	49
IL-2 induce cambios en la simetría de la membrana en células CALO.	50
IL-2 induce cambios en la simetría de la membrana en células INBL.....	51
Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	52
IL-2 promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en CALO.....	53
IL-2 promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en INBL	54
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

<i>Figura 1. Incidencia y mortalidad del carcinoma de cérvix en México.</i>	20
<i>Figura 2. Vías de activación de apoptosis.</i>	25
<i>Figura 3. Clasificación funcional y estructural de las caspasas de mamíferos.</i>	21
<i>Figura 4. Activación de caspasas efectoras .</i>	225
<i>Figura 5. Caspasa 3 activa en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	41
<i>Figura 6. Caspasa 3 activa en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	42
<i>Figura 7. Caspasa 7 activa en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	44
<i>Figura 8. Caspasa 7 activa en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	45
<i>Figura 9. Determinación de anexina V/ioduro de propidio (IP) en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	47
<i>Figura 10. Determinación de anexina V/ioduro de propidio (IP) en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	48
<i>Figura 11. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial de la línea celular CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	50
<i>Figura 12. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial de la línea celular CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina.</i>	51
<i>Figura 13. Modelo hipotético de inducción de apoptosis regulado por 100 UI/mL de IL-2.</i>	58
<i>Tabla 1. Expresión de RNAm de caspasas en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.</i>	34
<i>Tabla 2. Características de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL.</i>	35

ABREVIATURAS

(Δ pH): Diferencia de pH.

($\Delta\Psi$ m): Potencial de membrana mitocondrial.

Apaf-1: Factor activador de apoptosis.

ATP: Adenosin trifosfato.

Bad: Miembro apoptótico de la familia Bcl-2.

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

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

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

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

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

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

BH4: Dominio antiapoptótico de la familia Bcl-2

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

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

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

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

CaCu: Cáncer cérvicouterino.

CaCu: Carcinoma de Cérvix.

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas.

CASPASAS: Cisteína proteasas específicas de aspartato.

CPT: Camptotecina.

CPTs: Compuestos derivados o análogos de camptotecina.

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

DD: Dominio de muerte.

DED: Dominio efector de muerte.

DISC: Complejo de señalización de iniciación de muerte.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

ECM: Matriz extracelular.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas.

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

FBS: Suero fetal bovino.

FSC: (forward scatter). Dispersión frontal.

HR HPV: Virus del papiloma humano de alto riesgo.

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

ICAD/CAD: Heterodímero inhibidor/desoxiribonucleasa, que para actuar como desoxiribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD.

ICAD: DNAsa inhibidora de caspasas activadas.

IF: Intensidad de fluorescencia.

IFNs: Interferones.

IL-1: Interleucina 1.

IL-2: interleucina 2.

IL-37: Interleucina 37.

INF: Interferón.

IP: Ioduro de propidio.

LAK: Células asesinas naturales estimuladas por citocinas.

LR HPV: Virus del papiloma humano de bajo riesgo.

MCP-1: Proteína atrayente de macrófagos 1

NF- κ B: Factor nuclear del locus Kappa de las inmunoglobulinas en células B.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NK: Células asesinas naturales.

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

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

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

PBS: Tampón salino de fosfato.

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

RANTES: Activación expresada y secretada factor de células T normales.

RB: Proteína del retinoblastoma.

RIL-2: Receptor de interleucina-2.

RING: Proteína con dominio dedos de zinc.

RIP: Proteína inactivadora de ribosomas

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNA_m: RNA mensajero.

ROCK 1: Proteína cinasa asociada a Rho.

Smac/DIABLO: Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la

caspasa, /proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP.

SSC: (Side scatter). Dispersión lateral.

STAT-1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1.

TGF beta: Factor transformador de crecimiento.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR: Receptor de factor de necrosis tumoral.

TNFR1: Receptor de muerte del TNF.

TOPO I: Topoisomerasa I.

TRADD: Proteína con dominio de muerte.

TRAF: Factor asociado al receptor TNF.

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

UIDCC: Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.

VDAC: Proteína de canal aniónico dependiente de voltaje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en el Laboratorio de Oncología Celular, de la Unidad multidisciplinaria de investigación experimental UMIEZ en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza "UNAM". Dirigido por la M en C. Rosalva Rangel Corona

Durante la realización del presente trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa PAPIME de la DGAPA, UNAM Proyecto PE-206615.

Ciudad de México, noviembre de 2016

RESUMEN

El carcinoma de cérvix (CaCu), es la segunda causa de mortalidad femenina en todo el mundo. El 80% de los casos corresponden a los países en vías de desarrollo y cerca de 500,000 casos nuevos se presentan cada año, con unas 300,000 muertes. Tan sólo en el año 2002 se presentaron 493,243 casos y de éstos, 273,505 fueron decesos. Según Globocan en el 2012 en México la incidencia de CaCu fue de 10,186 casos de los cuales 5,061 fueron decesos. En el año 2013, en el grupo específico de mujeres de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones en mujeres con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000. Las entidades con mayor mortalidad por CaCu son Morelos (18.6%), Chiapas (17.2%) y Veracruz (16.4%) (Secretaria de Salud 2015). Por otra parte, la interleucina 2 (IL-2) es utilizada sola o en combinación en inmunoterapia, para inducir regresión de tumores en estadios avanzados, mostrando una modesta respuesta antitumoral. Investigaciones del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer FES-Zaragoza de la UNAM, han demostrado que 100 UI/mL de IL-2 administrada en cultivos de líneas celulares de CaCu inhibe su proliferación y después de tres días las células mueren mostrando signos de apoptosis, como la fragmentación del DNA. Tomando en cuenta que las caspasas son los principales reguladores de la muerte celular por apoptosis y que de ellas las caspasas 3 y 7 son consideradas como efectoras de muerte por esta vía de señalización, se decidió estudiar si IL-2 regula su expresión y activación. También se evaluó la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular y el potencial de membrana mitocondrial como otros indicios de apoptosis en células de las líneas celulares, CALO e INBL.

Los resultados del presente trabajo muestran que cuando las células CALO e INBL, cultivadas en ausencia de IL-2, se detectan niveles basales de caspasa 3 activa y en contraste en presencia de IL-2 aumenta significativamente el porcentaje de células que presentan caspasa 3 y 7 activa, propiciando la muerte por apoptosis. Cuando se evaluó la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular se observó un aumento progresivo en el porcentaje de células positivas a la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular hasta alcanzar su mayor expresión a las 48 horas de cultivo. La línea celular CALO, de estadio IIB presentó un mayor porcentaje de células en apoptosis que la

línea celular INBL, de estadio IVB, cuando ambas se cultivaron en presencia de IL-2. Lo que sugiere que la actividad de la citocina depende del grado de avance de este tumor. Asimismo, se demostró que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células de CaCu ocurre, como lo esperado en procesos apoptóticos, en los primeros minutos de haber sido cultivadas en presencia de IL-2.

Nuestros resultados confirman que la muerte inducida por altas dosis de IL-2 en células de carcinoma de cérvix que expresan el receptor para esta interleucina es mediante un proceso apoptótico en donde se activan la caspasa 3 y la 7.

ABSTRACT

Cervical Carcinoma (CeCa) is the second cause of female mortality in the entire world. The 80% percent of the cases belong to developing countries and around 500,000 new cases occur each year with some 300,000 deaths. Only in 2002, 493.243 cases were reported and of these, 273.505 were deaths. According to Globocan in 2012 in Mexico the incidence of cervical cancer was 10,186 cases of which 5,061 were deaths. In 2013 around 3,771 deaths in women with a rate of 11.3 deaths per 100,000 were registered in a specific group of women aged 25 years and over. The states with the highest mortality from cervical cancer are Morelos (18.6%), Chiapas (17.2%) and Veracruz (16.4%) (Health Ministry 2015). Moreover, interleukin 2 (IL-2) is used alone or in combination in immunotherapy to induce tumor regression in advanced stages, showing a mild antitumor response. Researches in Laboratory of Cellular Oncology Research Unit on Cell Differentiation and Cancer from FES Zaragoza, UNAM, have shown that 100 IU/ml IL-2 administered in cultured cell lines of CeCa inhibits proliferation and after three days they die, showing signs of apoptosis such as DNA fragmentation. Due to caspases are key regulators of cell death by apoptosis and which of them, caspases 3 and 7 are considered effectors of death for this signaling pathway, it was decided to study whether IL-2 regulates their expression and activation. The presence of phosphatidylserine was also evaluated in the outside of the cell membrane and mitochondrial membrane potential and other signs of apoptosis in cervical cancer cell line, CALO and INBL. The results of this study show that while CALO and INBL, grown in the absence of IL-2, there are basal levels of active caspase 3 in the presence of IL-2 significantly increases the percentage of cells showing caspase 3 and 7 active, promoting the death by apoptosis. When it was evaluated the presence of phosphatidylserine in the outer face of the cell membrane a progressive increase was observed in the percentage of positive to the presence of phosphatidylserine in the outer face of the cell membrane cells to reach its highest expression at 48 hours culture. A higher percentage of cells in apoptosis was found in CALO cell line, stage IIB, that in the cell line INBL of stage IVB, cultured in presence of IL-2 may indicate that the activity of this interleukin depends on the progress of this tumor. Also, it was shown that the loss of mitochondrial membrane potential in cells CeCa occurs, as expected in apoptotic processes, in the first minutes of being cultured in the presence of IL-

2. Our results confirm that high doses by IL-2-induced cervical carcinoma cells express the receptor for interleukin this death is through a process where both apoptotic caspase 3 and 7 are activated.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

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

Un ejemplo de esta enfermedad es el carcinoma de cérvix (CaCu) que es considerado como un problema de salud pública en todo el mundo, puesto que ocupa el segundo lugar en enfermedades ginecológicas solo por debajo del cáncer de mama en cuanto a incidencia y mortandad. Diversos estudios muestran que dentro de la etiopatogenia del CaCu se ha identificado al virus del papiloma humano (VPH) como el principal agente infeccioso de transmisión sexual. Existen otros factores de riesgo como son, inicio prematuro de vida sexual activa (antes de los 18 años de edad), no haberse practicado un estudio citológico como el Papanicolaou, inmunodeficiencia adquirida o congénita, promiscuidad sexual propia o de la pareja, uso de anticonceptivos orales por más de 10 años sin supervisión médica, tabaquismo, multiparidad, antecedentes familiares de cáncer, infecciones genitales recurrentes. En más del 99% de los casos de CaCu es posible detectar el DNA del virus del VPH en las lesiones intraepiteliales o lesiones malignas. Algunos tipos de VPH se conocen como virus de bajo riesgo porque raramente generan cáncer y ocasionan verrugas o Condiloma (Lagunas et al., 2009).

El VPH puede ser clasificado como de alto riesgo (HR-HPV) o de bajo riesgo (LR-HPV) sobre la base de sus asociaciones clínico genital. Los tipos VPH-HR, tales como el VPH 16 y 18 se asocian con lesiones que pueden progresar a neoplasia intraepitelial de alto grado y en última instancia, a un carcinoma, mientras que el LR-HPV, como HPV 6 y 11 se

encuentran asociados principalmente con lesiones genitales benignas, que rara vez progresan a cáncer (López et al., 2006; Olga et al., 2016; Lu et al 2016). El CaCu es más común después de los 35 años, lo que sugiere infección a temprana edad y progresión lenta a cáncer.

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

Cada año se diagnostican 500,000 nuevos casos de CaCu en el mundo. Según Globocan (Globocan 2012), 2012 en México la incidencia más alta en tumores ginecológicos corresponde al cáncer de mama con 13,939 casos de los cuales 5,217 fueron decesos y el segundo lugar para el CaCu con 10,186 casos de los cuales 5,061 fueron decesos estos datos se muestran en la figura 1. Datos recientes de la Secretaría de Salud indican que anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. En el año 2013, en el grupo específico de mujeres de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones en mujeres con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres (Secretaría de Salud 2015), por lo que es necesario contar con nuevas alternativas terapéuticas para las pacientes con este tipo de tumor sobre todo para aquellas mujeres que presentan tumores en estadios avanzados, por ello se plantea el uso de citocinas como una terapia alternativa para el tratamiento de esta enfermedad (Globocan 2008; Rosenberg 2014; Rudolph et al., 2016), un ejemplo de esto es la utilización de citocinas como interleucina 2 (IL-2).

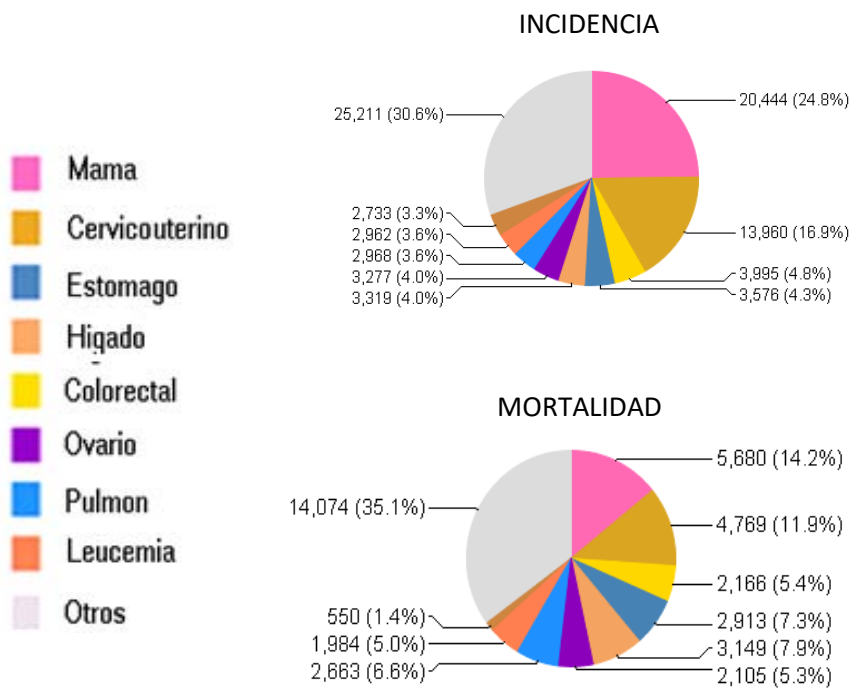


Figura 1. Incidencia y mortalidad del carcinoma de cérvix en México (Globocan 2012).

Citocinas

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

La secreción de las citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado, en general no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia con una nueva transcripción. Pueden influir en la síntesis y la activación de otras citocinas. La acción de estas citocinas a menudo son pleiotropicas y redundantes. Inician su acción uniéndose a receptores de

membrana específicos presentes en las células diana. Las acciones de las citocinas pueden ser locales o sistémicas. La mayoría actúan cerca del lugar donde son producidas, en una célula próxima o bien en la misma célula que la secreta, cuando se producen en grandes cantidades pueden entrar en la circulación y actuar a distancia del sitio de producción. Se pueden incluir como citocinas las interleucinas (que se suelen enumerar como IL-1 a IL-37 (Banchereau et al., 2012), los interferones, los factores estimuladores de colonias (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), el factor de necrosis tumoral, los factores de crecimiento (NGF, EGF) y las quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1) (Sarah et al., 2010, Pedraza et al., 2016).

Interleucina 2 (IL-2)

IL-2 es una proteína de 15,5 a 16-kDa, formada por cuatro alfa hélices que ejerce su acción mediante la unión a su receptor RIL-2, en particular con el receptor denominado de alta afinidad formado por las cadenas alfa, beta y gama. Es producida por células T CD4+ y en menor cantidad por células T CD8+. IL-2 actúa en las mismas células que la producen, por lo tanto, funciona como un factor de crecimiento autócrino. IL-2 también, actúa en linfocitos T periféricos, incluyendo a células CD4+ y CD8+, y es por lo tanto un factor de crecimiento parácrino. IL-2 fue la primer citocina en ser utilizada en inmunoterapia y demostró tener eficacia clínica en cáncer metastásico siendo utilizada en altas dosis de 600000-720000 IU/kg (Rosenberg 2014). IL-2 es producida por los linfocitos T CD4+ y en menores cantidades por las células T CD8+. La activación de las células T por antígenos y coestimuladores que activan la transcripción del gen de la IL-2 para la síntesis y secreción de esta proteína, ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune, teniendo un papel esencial en el desarrollo de la respuesta inflamatoria crónica, humoral y celular, es también un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T, B y NK, promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas) tras unirse a su receptor en linfocitos T; la tarea fundamental de estas células es eliminar por apoptosis las células infectadas por patógenos, o a aquellas que ha sufrido una transformación (Tao et al., 2016; Rosenberg 2014).

Apoptosis

La apoptosis es la forma fisiológica de muerte celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Es diferente a la necrosis, que es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo y que es originada por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento, ya que las células se hinchan y se deterioran las estructuras celulares, además de que se paralizan algunas funciones críticas para la vida (Douglas et al., 2016). La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Fernández et al., 1994; Vorobjev et al., 2016).

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células y para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en la fase G₀ o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G₁ (gap 1) o de presíntesis, las células producen RNA y proteínas necesarias para la siguiente etapa; en la fase S se replica el DNA; en la fase G₂ (gap 2) o de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “arrestadas” en G₀ durante años. En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de oncogenes (que codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de genes supresores (que codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización.

Las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, bien para poder ser reparado, o bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy

extenso. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del DNA. Un fármaco utilizado para inducir apoptosis de células tumorales es camptotecina.

Camptotecina

La camptotecina se aisló de *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino, cuyos extractos se investigaron en la década de 1950, como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona y fue al azar que se decidió evaluar la actividad antitumoral (Wall et al.,1996). El primer reporte de actividad antitumoral fue generado por los estudios realizados en el NCI, y el principio activo resultó ser la camptotecina (Hsiang et al.,1985). Los estudios clínicos de fase I, empleando la sal sódica de la camptotecina, se realizaron a los inicios de 1970, pero pronto fueron suspendidos debido a la severa toxicidad. En 1985 se revivió el interés debido al novedoso mecanismo de acción que involucra a la enzima Topoisomerasa I (Topo I). Se realizaron modificaciones químicas a la camptotecina obteniendo el topotecan el cual se aprobó en los Estados Unidos de Norteamérica en 1996 para el tratamiento de cáncer de ovario.

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

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

La formación del complejo ternario entre la CPTs-Topo I-DNA provoca la inhibición de la síntesis del DNA y ARN y la exposición prolongada a CPTs conduce a un daño irreparable en el DNA y por lo tanto provoca la muerte celular por apoptosis generalmente por la activación de las caspasas (Yigong et al., 2002; Ning et al., 2013). La muerte celular por apoptosis puede ser activada por dos vías; la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca o de los receptores de muerte.

Vía extrínseca o de receptores de muerte

Se denomina vía extrínseca o de los receptores de muerte debido a que las señales de muerte celular son originadas en el espacio extracelular y son recibidas y propagadas por receptores transmembranales específicos. Estos receptores se agrupan dentro de la Superfamilia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y se denominan receptores de muerte. Sus miembros comparten la presencia de dominios extracelulares ricos en residuos cisteína y de secuencias citoplasmáticas homólogas de 80 aminoácidos correspondientes a los dominios de muerte (DD), los cuales permiten a los receptores reclutar la maquinaria apoptótica celular. Los receptores de muerte incluyen a Fas/CD95, TNFR1, DR3/ Apo3, TRAILR1/DR4 y TRAIL-R2/DR5. Por su parte, los ligandos que activan a estos receptores están estructuralmente relacionados y son Fas-L, TNF α y TRAIL (o Apo2L) respectivamente (Xiaoliang et al., 2016). La cascada de señalización de la vía extrínseca o de los receptores de muerte se muestra en la figura 2. Inicia con la unión del ligando con su receptor, como lo es la unión de él ligando Fas-L con su receptor Fas. Este reconocimiento es necesario para el reclutamiento de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), que a su vez recluta a la procaspasa 8 para conformar el complejo (DISC) (Death-Inducing Signaling Complex). Este complejo activa a la procaspasa 8 y dependiendo de la concentración de ésta en el citoplasma podrá activar directamente a la caspasa 3 o marcar una ruta alternativa de señalización como lo es la vía intrínseca o mitocondrial (Ye et al., 2016).

Vía intrínseca o mitocondrial

La característica principal de esta vía apoptótica es la participación de la mitocondria junto con la propagación de la cascada de señales proapoptóticas. Es activada por condiciones de estrés intracelular, dentro de los que se encuentra, el daño al DNA, estrés oxidativo e incremento en los niveles de Ca^{2+} . Cuando en la célula se genera alguna de estas características, las señales proapoptóticas convergen a nivel de la membrana externa de la mitocondria, que será permeabilizada en el caso de que las señales apoptóticas no cesen y por lo tanto las moléculas proapoptóticas serán activadas para desencadenar esta cascada de señalización representada en la figura 2. En esta vía uno de los procesos fundamentales es la liberación de citocromo C al citosol que se une a la proteína Apaf-1. Como resultado de esta interacción, se genera la formación del apoptosoma, que es un complejo heptamérico de alto peso molecular. Este complejo es el encargado de reclutar a siete moléculas de pro-caspasa 9 que luego se activarán por autoproteólisis. Para finalmente activar a las caspasas ejecutoras 3 o 7, que, a su vez, son enzimas que pueden escindir a una amplia variedad de sustratos intracelulares dando lugar a los cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis (Ye et al., 2016; Yağmur et al., 2016).

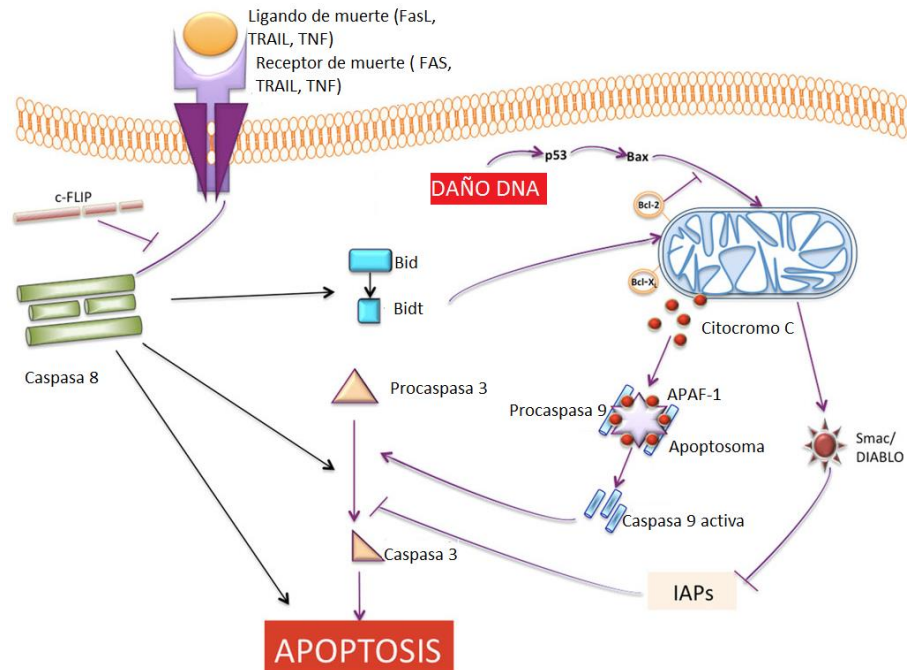


Figura 2. Vías de activación de apoptosis: vía extrínseca o de los receptores de muerte y vía intrínseca o mitocondrial. (Yağmur et al., 2016)

Clasificación y funciones de las caspasas

La maquinaria apoptótica está compuesta principalmente por un núcleo enzimático de una familia de proteasas de cisteína denominadas caspasas, se denominan caspasas por que se refieren a la abreviatura del inglés (cisteína aspartyl-specific proteases) y constan de tres dominios: un pro-dominio N terminal, una subunidad larga p20 y una subunidad corta p10 hacia el extremo C terminal. Las subunidades p20 y p10 se encuentran unidas por un pequeño fragmento peptídico. Se clasifican en tres grandes grupos; Las caspasas inflamatorias dentro de las cuales se encuentran las caspasas 1, 4, 5, 11 y 12; las caspasas iniciadoras de apoptosis como las caspasas 2, 9, 8 y 10 y finalmente el grupo de las caspasas ejecutoras o efectoras, las caspasas 3, 6 y 7, como se muestra en la figura 3. Estas proteínas son normalmente sintetizadas como precursores inactivos denominados zimógenos, que al recibir la señal de activación de apoptosis sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa activa (Xiaoliang et al., 2016). En las caspasas efectoras, el prodominio es inexistente o corto, mientras que en las caspasas iniciadoras comprende un mayor número de aminoácidos. A la fecha las caspasas más estudiadas son la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

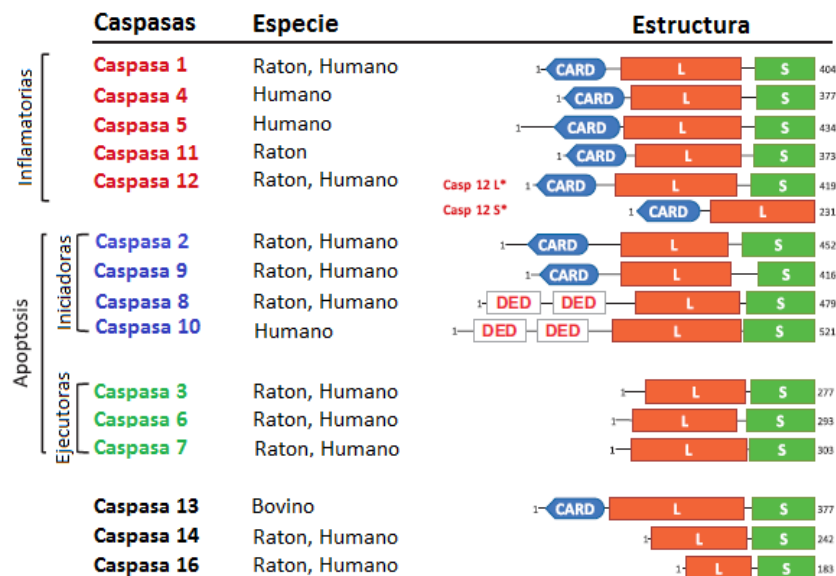


Figura 3. Clasificación estructural y funcional de las caspasas de mamíferos. Caspasas 1, 4, 5, 11 y 12 forman parte de las caspasas inflamatorias. Las caspasas iniciadoras de apoptosis son las caspasas 2, 8, 9 y 10 y las caspasas efectoras son 3, 6 y 7. (Shalini et al., 2015).

Tomando en cuenta la estructura primaria de estas enzimas, determinada por resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de Rayos X, se pueden agrupar en dos clases: pertenecen a la clase I las procaspasas que tienen un prodominio N-terminal grande, como las procaspasas 1, 2, 8, 9 y 10 (Lavrik et al., 2005). En las procaspasas de clase II el prodominio N-terminal es pequeño o carecen de él, pertenecen a esta clase las procaspasas 3, 6 y 7. Los prodominios de las procaspasas de clase I contienen dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos, estos complejos están compuestos por tetrámeros de dos subunidades grandes y dos pequeñas que favorecen su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico.

Todas estas moléculas constan de 6 alfa hélices anfipáticas y antiparalelas las cuales están muy empaquetadas formando un centro hidrofóbico originando interacciones hidrofóbicas entre los DEDs (dominio efector de muerte) e interacciones electrostáticas entre los CARDS (dominio reclutador de caspasas). La auto activación de las caspasas de clase I las dirige al citoplasma para activar a las procaspasas de clase II, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico).

Las caspasas pueden activarse mediante dos mecanismos diferentes: la homoactivación en el caso de las caspasas iniciadoras y la heteroactivación o transactivación para las caspasas efectoras, como se muestra en la figura 4 (García et al., 2016).

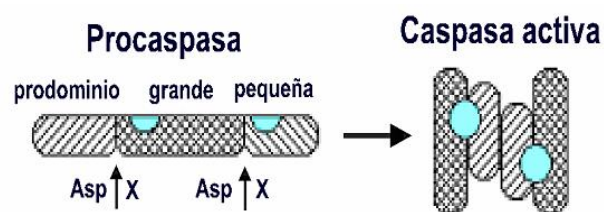


Figura 4. Activación de caspasas efectoras. Las procaspasas contienen tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y una pequeña, las procaspasas son enzimas inactivas pero una vez que sufren dos rompimientos catalíticos en los residuos de ácido aspártico que aparta las tres subunidades. Las subunidades grandes forman un heterodímero por la unión de sus sitios activos, la unión de dos heterodímeros se genera en dirección opuesta con las dos subunidades pequeñas rodeadas por las subunidades grandes.

En estas condiciones las caspasas activas inician los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del DNA (Lavrik et al., 2005). En el caso de la formación del DISC, los receptores de membrana para factores de muerte se caracterizan porque poseen, en el extremo intracelular, una secuencia llamada dominio de muerte (DD) la cual sirve de unión a diversas proteínas adaptadoras que finalmente causan la activación de las caspasas (Fuentes et al., 2004).

En todos los casos las interacciones de las procaspasas con los adaptadores que se conocen a la fecha están mediadas por dominios específicos que se repiten en los prodominios de las procaspasas, en las caspasas, en los adaptadores, en las cinasas y en los dominios asociados a los receptores de muerte. La activación de los receptores de muerte es consecuencia de la unión de su ligando, que induce la transmisión de una señal, a través del dominio transmembranal, al dominio citoplásmico del receptor. Este sufre un cambio conformacional que favorece su fosforilación por una de las cinasas asociada a ese receptor, que a su vez fosforila a los adaptadores FADD (dominio de muerte asociado a Fas), TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del factor de necrosis tumoral, TNFR) o TRAFs (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), para activar a la procaspasas 8 y 10 y así iniciar la cascada de activación de caspasas. A pesar de que las caspasas son muy similares, existen diferencias en sus mecanismos de activación que se demuestran por el tipo de adaptador. Así, las caspasas 1 y 2 son capaces de oligomerizarse en concentraciones elevadas sin la intervención de un adaptador, en cambio la caspasa 8 requiere del adaptador FADD y la caspasa 9 de APAF-1 (Yigong et al., 2002).

Las señales apoptóticas, tanto intracelular como extracelulares, convergen para activar a un grupo de caspasas denominadas efectoras 3, 6 y 7: las caspasas 3 y 7 son las responsables de la condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, caspasa 6 es responsable de originar la fragmentación nuclear, morfológicamente, en la apoptosis se produce la fragmentación de DNA mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos de la muerte celular (Jun et al., 2011).

Caspasa 6

Caspasa 6 se clasifica como una caspasa efectora, el gen que codifica a caspasa 6 es Mch2 en humanos, durante la apoptosis es activada por caspasa 3, sin embargo, se ha demostrado que en ausencia de caspasa 3 es posible encontrar caspasa 6 activa, debido a que puede autoactivarse. Durante el proceso apoptótico caspasa 6 se localiza en el núcleo, es la encargada de regular la contracción nuclear durante la apoptosis y por lo tanto de fragmentar moléculas estructurales del núcleo como la proteína NuMa (nuclear mitótica aparatos proteína), además de la laminina B. (Cowling et al., 2002; Xiao et al., 2015)

Caspasas 3 y 7

Dentro de las caspasas ejecutoras se encuentran las caspasas 3 y 7. En diversos estudios se ha demostrado que estas caspasas tienen actividad sobre sustratos en común y se creía que cumplían con un rol redundante en el proceso apoptótico. Se sabe que caspasa 3 es una de las principales ejecutoras de la apoptosis, la cual es responsable, ya sea parcial o totalmente en la ruptura proteolítica de muchas proteínas importantes, como la enzima polinuclear (ADPribosa), de la polimerasa PARP, proteína clave durante la apoptosis. Es probablemente la mejor entendida de las caspasas de mamíferos en los términos de su especificidad y su papel en la apoptosis. Caspasa 3 también es necesaria para algunas características típicas de la apoptosis, y es indispensable para condensación de la cromatina apoptótica y la fragmentación del DNA. Caspasa 3 está ampliamente distribuida, con una alta expresión en los linajes celulares linfoides, lo que sugiere que puede ser un mediador importante de la apoptosis en el sistema inmunológico (Strasser 2000). Esta acción es también llevada a cabo por la enzima CAD que, en condiciones normales, se encuentra unida a su correspondiente inhibidor (ICAD); sin embargo, ante una señal apoptótica, dicho inhibidor es clivado por la caspasa 3 activa, dejando a CAD libre para ejercer su acción. Otros sustratos de caspasa 3 son: la Topoisomerasa I, DFF45, Rb, Vienten, RIP, STAT1, BID y X-IAP.

Los sustratos en los que coinciden la proteólisis por caspasa 3 y caspasa 7 son: PARP, Rhode, y ROCK I, y la única proteína que es un blanco exclusivo de caspasa 7 es la cochaperona p23. La activación de caspasa 7 a diferencia de caspasa 3 radica en que su maduración proteolítica o activación, se ha observado en condiciones inflamatorias. Caspasa 7 requiere activación de caspasa 1, complejo denominado inflamasoma como se mencionó anteriormente, estas proteasas presentan grandes diferencias en términos de su capacidad para escindir muchos otros sustratos. Es de destacar que caspasa 3 comprende una gama mucho más amplia de sustratos en comparación con caspasa 7. Con estos datos se puede argumentar que la caspasa 3 y caspasa 7 son funcionalmente proteasas distintas y que la caspasa 3 es el principal factor asociado a apoptosis. (Walsh et al., 2007; Lamkanfi et al., 2010)

Características morfológicas de células apoptóticas

Uno de los cambios morfológicos que presentan las células que inician con el proceso apoptótico consiste en la condensación del citoplasma y por lo tanto la reducción de tamaño y volumen celular, acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forman cúmulos densos adosados a la membrana nuclear; seguida de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina. De la misma forma, en la membrana celular se presentan invaginaciones que fragmentan a la célula formando vesículas que contienen orgánulos, a estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos, un fenómeno distintivo de la apoptosis se presenta antes de que los cuerpos apoptóticos se desintegren, éstos son fagocitados por células vecinas en un proceso en el que participan el reconocimiento de antígenos específicos y de un fosfolípido la fosfatidilserina que en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la membrana celular y al ser activado el proceso apoptótico se presenta en la lámina externa de la membrana celular de los cuerpos apoptóticos.

La siguiente característica que se considera exclusiva de la muerte celular por apoptosis, es la degradación internucleosomal de DNA, de manera tal que, al someterse a una separación por electroforesis en un gel de agarosa, se advierte un patrón de bandas característico al que se denomina escalera de la muerte. Este patrón revela que durante la muerte por apoptosis los fragmentos producidos son múltiplos de 180 bases, correspondiente a la longitud del DNA que se enrolla alrededor de cada nucleosoma (Evgeniia et al., 2015).

Características bioquímicas de células apoptóticas

El proceso apoptótico está acompañado de algunas características bioquímicas importantes como la activación de las caspasas, de igual forma se han asociado alteraciones en el funcionamiento mitocondrial, que incluyen una caída transitoria en el potencial de membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C y la producción de radicales libres. En algunas células estos cambios parecen ser esenciales para la fase de ejecución de muerte celular. La liberación de citocromo C es un paso indispensable en la activación de una segunda serie de caspasas que en su activación requieren de proteínas como la que es codificada por el gen *ced-4* de *Caenorhabditis elegans*. Por otra parte, las alteraciones que permiten la liberación de citocromo C afectan a la cadena respiratoria permitiendo un aumento en la generación de electrones desapareados y por tanto la producción de radicales libres. (Evgeniia et al., 2015)

Proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas

Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 ha sido considerada como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico. Inicialmente, Bcl-2 fue identificada como producto del oncogén *bcl-2*, siendo uno de los miembros de una familia de moléculas pro y antiapoptóticas (Bras et al., 2005). En humanos se conocen más de 20 miembros de esta

familia. Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembranal (Vogelstein et al., 2004).

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

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

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

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

IAPs

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

Las IAPs son inhibidores directos de las caspasas. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 inhiben las caspasas 3, 7 y 9. Estas proteínas inhiben a las caspasas mediante la unión a ellas por dominios BIR. Las IAPs pueden presentar uno o más dominios BIR dominios RING, que actúan como una ubiquitin-ligasa induciendo su autodegradación y la degradación de la caspasa que va unida a él, a través del proteosoma. Dominios CARD pueden permitir la regulación de la degradación de caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

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

tratamiento con antagonistas de XIAP podría tener valor terapéutico en los casos con elevados niveles de expresión de la proteína (Geserick et al., 2009).

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

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acción de IL-2 es mediada por la unión no covalente de ésta a su receptor (RIL-2). El receptor pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyético, es de naturaleza multimérica compuesta por tres proteínas. Investigaciones del Laboratorio de Oncología Celular de la UIDCC, FES-ZARAGOZA UNAM, han demostrado la presencia del RIL-2 en células de CaCu (Alvarado 1997), indicando que dicho receptor es funcional. En dicho laboratorio, se ha estudiado el efecto de IL-2 sobre la proliferación de células de las líneas de CaCu CALO e INBL, demostrando que 100 UI/mL de IL-2 exógena causo un aumento en la expresión de procaspasa 3 (Torres 2012), asimismo la fragmentación de DNA (Del Rio 2013). Como se sabe dicha fragmentación es una característica morfológica típica de células en apoptosis. Otro parámetro molecular que nos da un indicio de muerte por apoptosis, es la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. El objetivo del presente trabajo fue determinar cambios de potencial de membrana mitocondrial, la presencia de caspasas activas efectoras 3 y 7 y de fosfatidil serina en células de las líneas CALO e INBL cultivadas con IL-2 con este estudio se pretende contribuir a elucidar el mecanismo molecular mediante el cual interleucina regula la muerte de células de CaCu.

JUSTIFICACIÓN

En México el carcinoma de cérvix (CaCu) ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en enfermedades ginecológicas solo por debajo del cáncer de mama. En el 2012 la incidencia de CaCu fue de 10,186 casos de los cuales 5,061 fueron decesos. El grupo de mujeres más afectadas por esta enfermedad es el de 35 a 64 años de edad. La mayoría de las mujeres tienen entre 40 y 50 años, pero cada vez es más común en edades de 20 y 30 años a pesar que es una enfermedad totalmente curable si es detectada a tiempo.

Para las pacientes en las que el cáncer es detectado en estadios avanzados se intentan desarrollar tratamientos alternativos como el uso de citocinas. A este respecto en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES-Zaragoza de la UNAM, se han obtenido resultados *in-vitro* con respecto a la inhibición de la proliferación de las líneas celulares de CaCu, ya que se encontró que 100UI/ml de IL-2 induce la muerte de células de CaCu por la vía apoptótica, proceso, que, en su mayor parte, esta mediado por caspasas. Este trabajo tiene como objetivo determinar si en células de las líneas de CaCu, CALO e INBL cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 se regula la activación de caspasas efectoras 3 y 7, el potencial de la membrana mitocondrial y la exposición de fosfatidil serina que son propiedades conocidas de este proceso apoptótico.

HIPÓTESIS.

Se sabe que 100 UI de IL-2 induce la muerte por apoptosis de células de las líneas de CaCu CALO e INBL y que también regula la expresión del RNA mensajero de caspasas iniciadoras y de proteínas proapoptóticas como citocromo C. Por lo tanto, si cultivamos células de las líneas de CaCu CALO e INBL en presencia de 100 UI de IL-2 esperamos que se activen las caspasas efectoras 3 y 7 además de la translocación de fosfatidil serina en la membrana celular y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, que son propias de la apoptosis.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la determinación de caspasas 3 y 7 activas, evaluar el potencial de membrana mitocondrial y la exposición de fosfatidil serina en las líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCu) CALO e INBL cultivadas con 100 UI de IL-2.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Realizar el cultivo celular de las líneas CALO e INBL en presencia de 100UI/ml de IL-2 a diferentes tiempos.
- Evaluar la actividad de caspasas 3 y 7 por citometría de flujo a diferentes tiempos.
- Evaluar la presencia de fosfatidil serina en la membrana celular por la técnica de Anexina-V/Ioduro de propidio a diferentes tiempos.
- Evaluar el potencial de membrana mitocondrial a diferentes tiempos.

ANTECEDENTES DIRECTOS

En el Laboratorio de Oncología Celular de la FES Zaragoza, se ha demostrado que células de las líneas de carcinoma de cérvix (CaCu) CALO e INBL cultivadas en presencia de 100UI/ml de IL-2 regulan positivamente la expresión del RNAm para caspasa 8 (Sierra en 2011), asimismo se ha observado un aumento del RNAm para caspasas 3 y 9 (Martínez 2011). También se ha determinado un aumento en la expresión de procaspasa 3 (Torres 2012). De igual forma se ha reportado un aumento en la expresión del mensajero para citocromo C (Barragán en 2012; Del Rio 2013). Por su parte, Massé en 2013 observa aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bid y en 2013, Del Rio identifica fragmentación de DNA, los datos antes mencionados son representados en la siguiente tabla.

Proteína	Expresión de RNAm en la línea celular CALO cultivada en presencia de 100UI/ml de IL-2	Expresión de RNAm en la línea celular INBL cultivada en presencia de 100UI/ml de IL-2
Caspasa 8	La mayor expresión de caspasa 8 se da a los 30 minutos y 2 horas, observándose una caída en la expresión a 48 y 96 horas y un nuevo aumento a las 144 horas.	La mayor expresión de caspasa 8 se da a los 48 y 96 horas, manteniendo una expresión constante a 30 minutos 2 y 144 horas.
Caspasa 9	La expresión de caspasa 9 es constante en todos los tiempos evaluados.	La expresión de caspasa 9 es constante a 10, 15, 20 ,30 minutos 1, 2, 48 y 72 horas observándose una ligera disminución a los 5 minutos y 2 horas.
Caspasa 3	La expresión de caspasa 3 es constante a 5, 10, 15, 20, 30 minutos 1, 2, 48 y 72 horas. Observándose una mayor expresión de caspasa 3 a 10 minutos.	La expresión de caspasa 3 es constante a 5, 10, 15, 20, 30 minutos 1, 2, 48 y 72 horas. Observándose una mayor expresión de caspasa 3 a 10 minutos y 48 horas

Tabla 1. Expresión de RNAm de caspasas 8, 9 y 3 en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL (Sierra 2011, Martínez 2011).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Las líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCu) con las que se desarrolló este trabajo se muestran en tabla 2 y se obtuvieron de la reserva criopreservada del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea celular	Estadio clínico	HPV
INBL	carcinoma epidermoide estadio IV B	18
CALO	carcinoma epidermoide estadio II B	18

Tabla 2. Características de las líneas celulares de CaCu (CALO, INBL). (López-Marure et al., 2002)

Condiciones de cultivo y proliferación de las líneas celulares

Las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL se cultivaron en cajas de cultivo de 75 cm³ con 8 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (MICROLAB) adicionado con 10% de SFB (suero fetal bovino) (GIBCO), mantenidos en una incubadora (FORM SCIENTIFIC USA) con 37°C de temperatura y pH de 7.0-7.2 y en una atmósfera húmeda saturante al 5% de CO₂. Estas células se incuban durante 2 o 3 días aproximadamente, tiempo suficiente para que proliferen y para la estimulación con interleucina 2 recombinante humana (IL-2) (R&D SYSTEM) y con camptotecina.

Cultivo en presencia de IL-2

Se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul de tripano (SIGMA), a través de una cámara de Neubauer (AMERICAN OPTICAL, USA), las células se trasladan a una caja petri con medio de cultivo RPMI-1640, en ausencia de suero fetal bovino para sincronizarlas por 24hr para que los cultivos partan del mismo punto del ciclo celular (G1). Las células se cultivaron en presencia o ausencia de 100 UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos. Se cultivaron células en presencia de camptotecina como un control positivo de muerte.

Determinación de síntesis de caspasa 3 y 7 activa

Al finalizar el tiempo de cultivo en presencia de IL-2 se realizan 3 lavados con PBS se fijarán las células con etanol al 70% durante 20 minutos y se efectúan otros tres lavados con PBS, enseguida se incuban las células con los anticuerpos primarios (1:1000 μ L) (Purified anti-Caspase 3 (SIGMA) y 7 (GENETEX) activas durante toda la noche a 4 °C.

Después de 3 lavados con PBS, se incuba con el anticuerpo secundario conjugado con FIT-C en una concentración (1:500 μ L) (SIGMA). Después de 3 lavados con PBS se colocan las células en 500 μ L de PBS en una celda para citometría donde se adquieren 10,000 eventos en un citómetro de flujo (BDFACSAria II) analizados con el software Flowing Software 2.5.1.

Determinación de anexina V/IP

Una vez concluido el tiempo de cultivo en presencia de IL-2 se realizaron 3 lavados con PBS y se incuban las células con IP durante 20 minutos (SIGMA), seguido de tres lavados con PBS para proceder a incubar con el anticuerpo primario anexina V conjugado con FIT-C (1:200 μ L) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) durante 45 minutos. Después de 3 lavados con PBS se colocaron las células en 500 μ L de PBS en una celda para citometría donde se

adquieren 10 000 eventos. En un citómetro de flujo (BDFACSAria II) para su análisis con el software Flowing Software 2.5.1.

Determinación de potencial de membrana mitocondrial

Transcurrido el tiempo de cultivo en presencia de IL-2 se realizaron 3 lavados con PBS y las células se incuban durante 15 minutos con 10 µg/ml rodamina 123 (SIGMA) para evaluar el potencial de membrana mitocondrial. Se realizan tres lavados con PBS y finalmente se colocan en 500mL de PBS en una celda para su adquisición en el citómetro de flujo. (BDFACSAria II) para su posterior análisis con el software Flowing Software 2.5.1

Cabe mencionar que todos los experimentos se realizaron 4 veces y por duplicado, obteniendo resultados semejantes en cada una de las repeticiones, en los resultados se presenta un experimento representativo de cada evaluación.

RESULTADOS

Evaluación de caspasas 3 y 7 activas mediante citometría de flujo.

Caspasa 3

Con la finalidad de estudiar el efecto de IL-2 sobre la activación de caspasa 3 en células de las líneas de carcinoma de cérvix (CaCu) CALO e INBL. Se realizaron cultivos hasta por 24 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2. La determinación de esta caspasa es importante ya que se trata de una de las caspasa ejecutoras de la muerte por apoptosis. Asimismo, para contar con un control positivo de muerte por apoptosis, se cultivaron células de ambas líneas en presencia de camptotecina. Se utilizó este fármaco ya que existen numerosas publicaciones que lo describen como un potente activador de apoptosis. Como control negativo se cultivaron células en ausencia de IL-2. La determinación de caspasa 3 activa se realizó por citometría de flujo adquiriendo 10 000 eventos en cada experimento.

Inducción por IL-2 de caspasa 3 activa en células de la línea de (CaCu) CALO.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos de las células de la línea celular CALO cultivadas en presencia de IL-2 o de camptotecina a diferentes tiempos. Se puede observar que IL-2 tiene una gran eficiencia para activar a caspasa 3 comportándose de manera muy similar al control de muerte. La mayor cantidad de caspasa 3 activa mediada por IL-2 se encuentra a las 24 horas presentando un 96% de células positivas a caspasa 3 activa. Es interesante destacar que se presentó una disminución significativa a las 3 horas con un 38%.

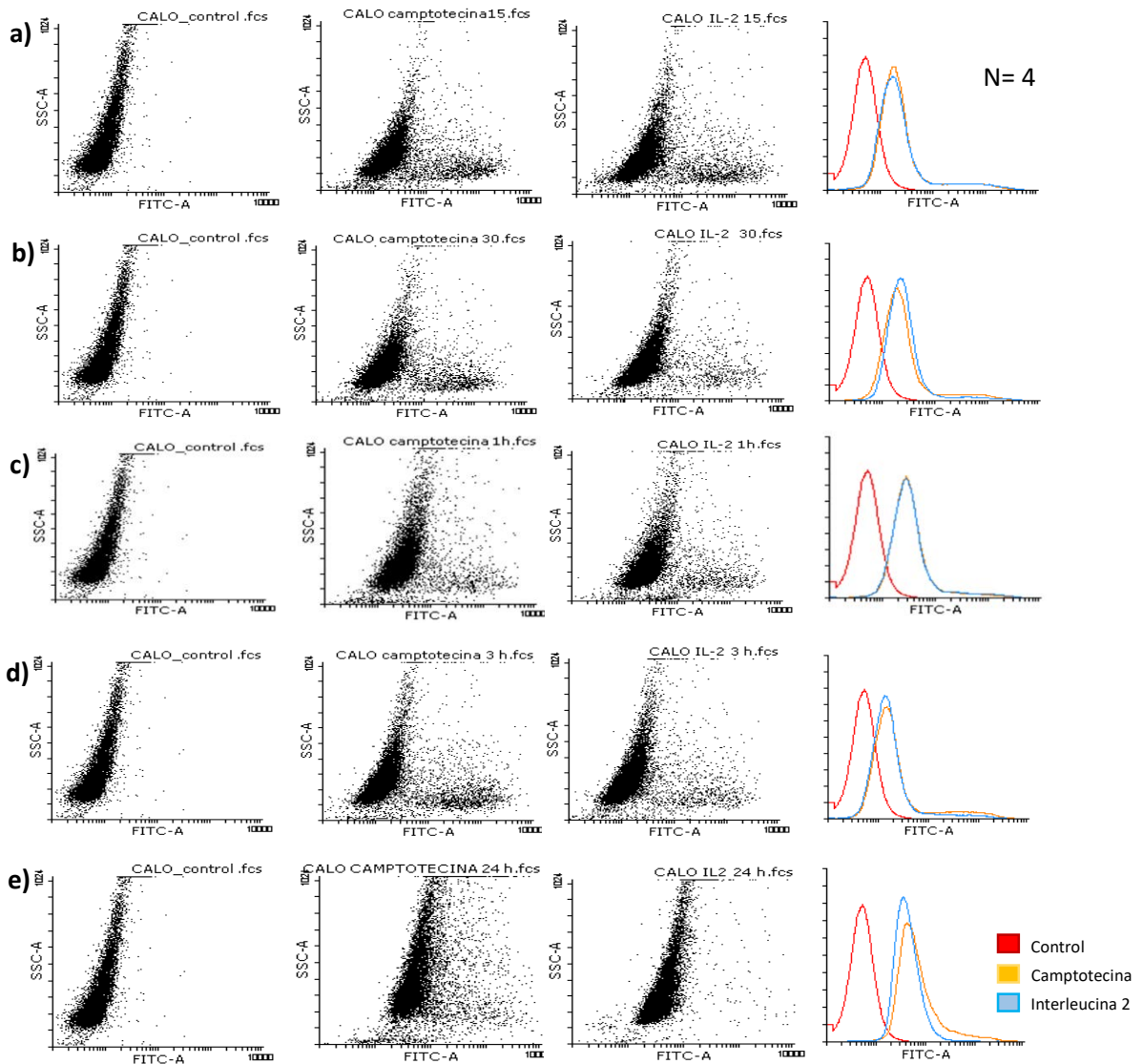


Figura 5. Caspasa 3 activa en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 15 minutos; b) 30 minutos; c) 1 hora; d) 3 horas; e) 24 horas. N=4 número de repeticiones del experimento realizadas

Inducción por IL-2 de caspasa 3 activa en células de la línea de (CaCu) INBL.

Las células de la línea celular INBL cultivadas en presencia de IL-2 o de camptotecina muestran un aumento gradual de caspasa 3 activa similar al de CALO (Figura 6).

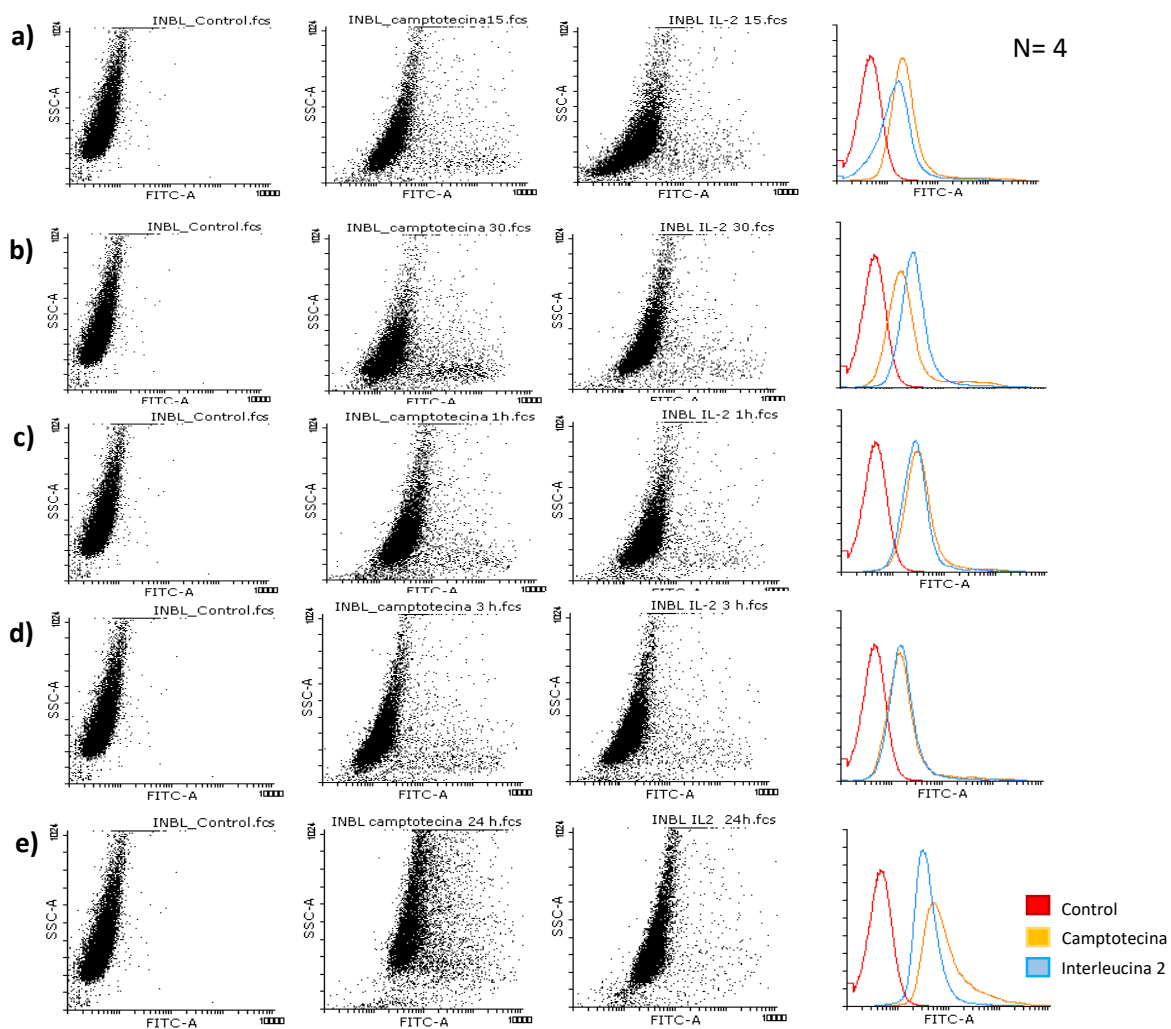


Figura 6. Caspasa 3 activa en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 15 minutos; b) 30 minutos; c) 1 hora; d) 3 horas; e) 24 horas. N número de repeticiones del experimento realizadas

Caspasa 7

Caspasa 7 es activada universalmente en el proceso apoptótico. La activación de caspasa 7 a diferencia de caspasa 3 radica en que su maduración proteolítica o activación se ha observado en condiciones inflamatorias, caspasa 7 requiere activación de caspasa 3 o de caspasa 1. Para evaluar el efecto que tiene IL-2 sobre la inducción de caspasa 7 activa. Células de las líneas CALO e INBL fueron cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2 y se evaluaron por citometría de flujo. Como un control positivo de apoptosis se cultivaron células en presencia de camptotecina. Como control negativo se cultivaron células en ausencia de IL-2. Adquiriendo 10 000 eventos en cada experimento.

Inducción por IL-2 de caspasa 7 activa en células de la línea de CALO.

Los resultados obtenidos en células de la línea celular CALO cultivadas en presencia de IL-2 muestran un perfil de caspasa 7 activa en tiempos de cultivo cortos de hasta el 90% de la población a una hora, para luego desaparecer a partir de las 3 horas (Figura 7).

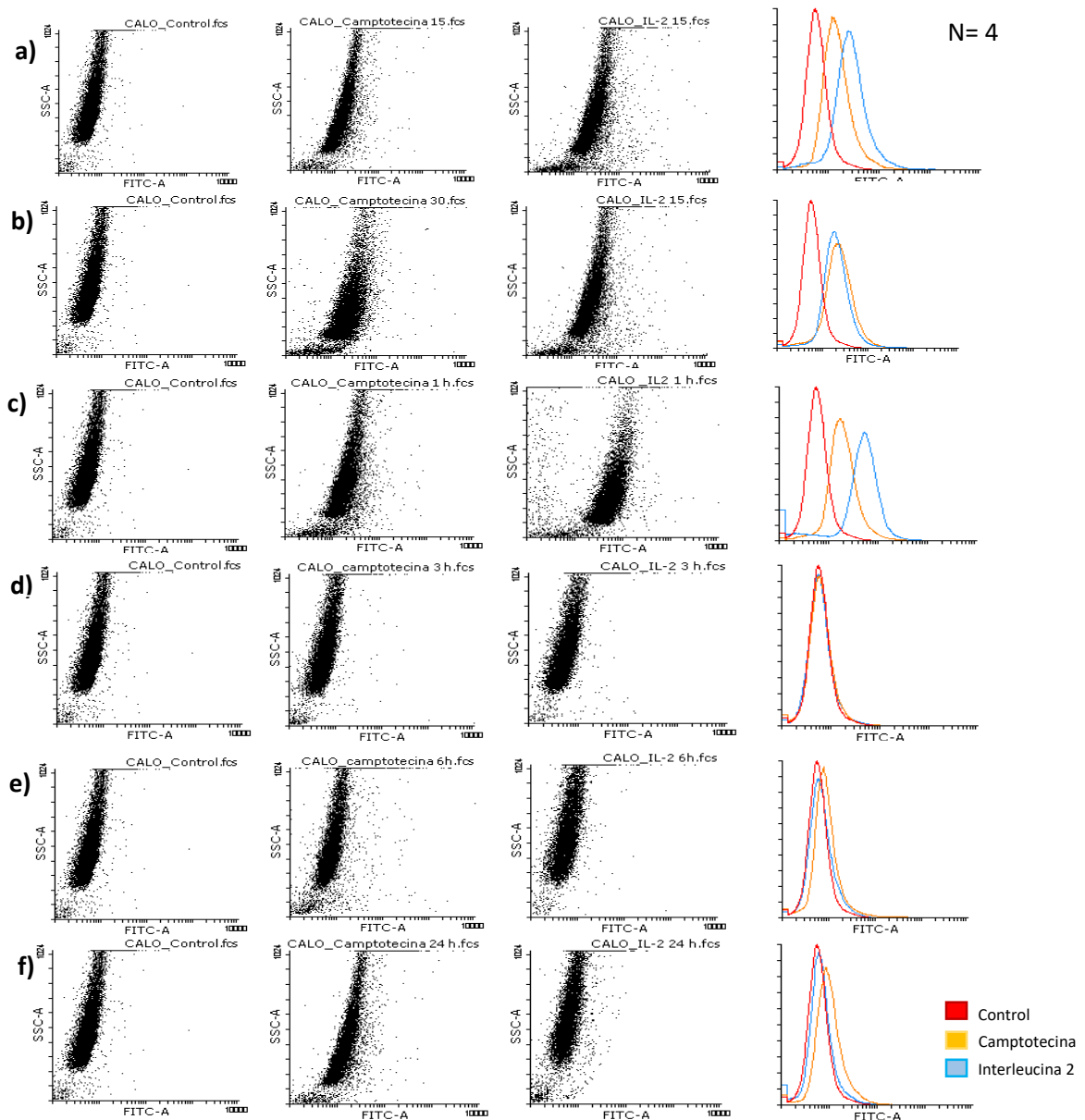


Figura 7. Caspasa 7 activa en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 15 minutos; b) 30 minutos; c) 1 hora; d) 3 horas; e) 6 horas; f) 24 horas. N número de repeticiones del experimento realizadas

Inducción por IL-2 de caspasa 7 activa en células de la línea de INBL

Para el caso de la línea INBL cultivadas en presencia de IL-2 se observó un mayor porcentaje de activación de caspasa 7 a los 15 minutos descendiendo hasta llegar a cero a las 3 horas, como se obtuvo con las células CALO, sin embargo, con la diferencia que la actividad se volvió a presentar a partir de las 3 horas (Figura 8).

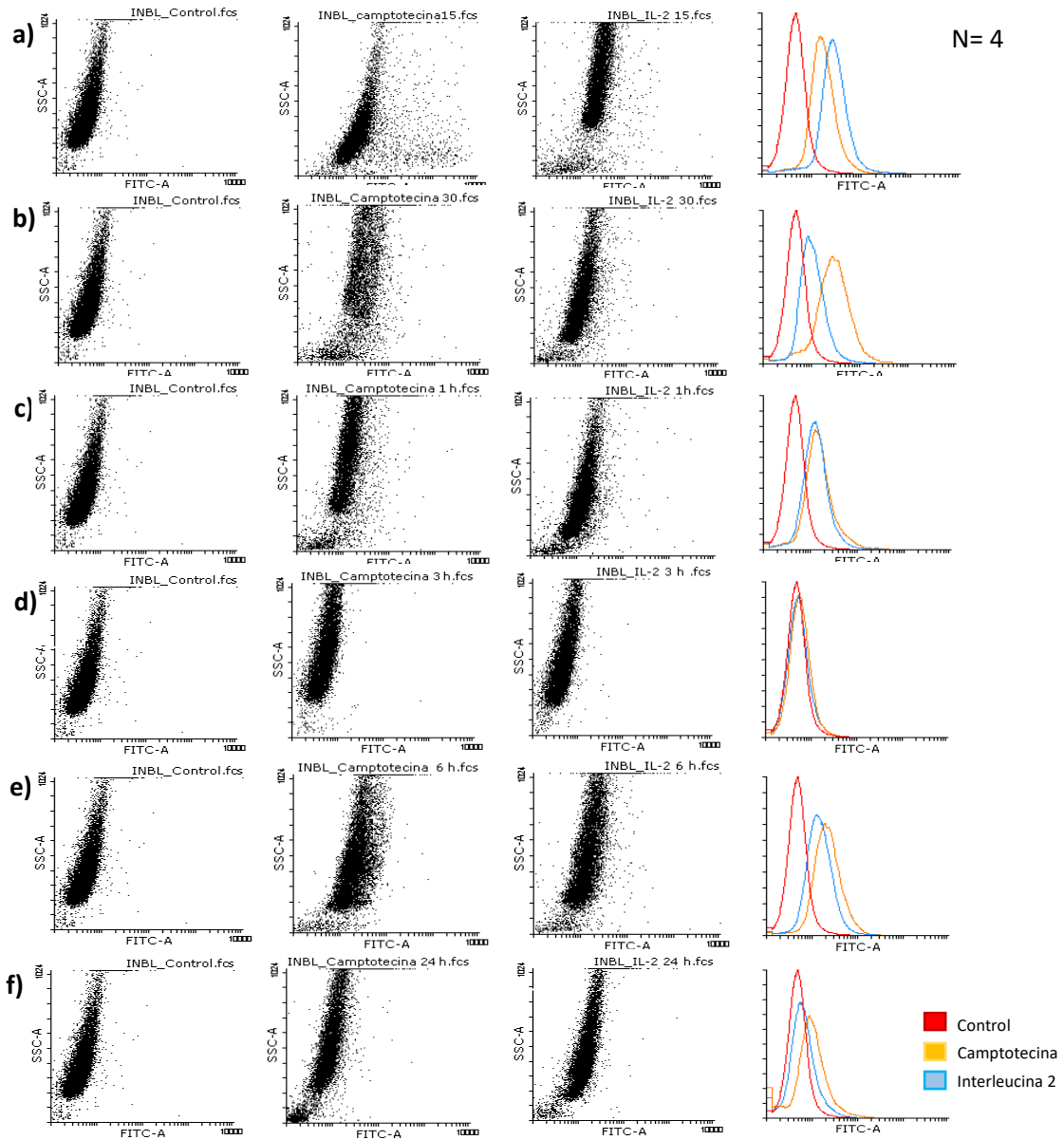


Figura 8. Caspasa 7 activa en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 15 minutos; b) 30 minutos; c) 1 hora; d) 3 horas; e) 6 horas; f) 24 horas. N número de repeticiones del experimento realizadas

Análisis de apoptosis por la técnica de anexina-V/ioduro de propidio.

Con la intención de evaluar el efecto de IL-2 sobre el cambio de la asimetría de la membrana plasmática en las células de las líneas CALO e INBL, se realizaron cultivos por 1, 3, 24 y 48 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, de igual manera se cultivaron células en presencia de camptotecina como control positivo de muerte por apoptosis y como control negativo se cultivaron células sin estímulo. La evaluación del cambio de asimetría se realizó por la unión de anexina-V y la incorporación de ioduro de propidio. La anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. El marcaje con anexina-V conjuntamente con el ioduro de propidio permite la diferenciación de las células apoptóticas tempranas y de las apoptóticas tardías o necróticas. La evaluación se realizó por citometría de flujo adquiriendo 10 000 eventos en cada experimento.

IL-2 induce cambios en la simetría de la membrana en células CALO.

Los datos presentados en la figura 9 indican que las células de CALO cultivadas en presencia de IL-2 presentan un aumento significativo de fosfatidil serina a partir de las 24 horas llegando a un máximo de 87% a las 48.

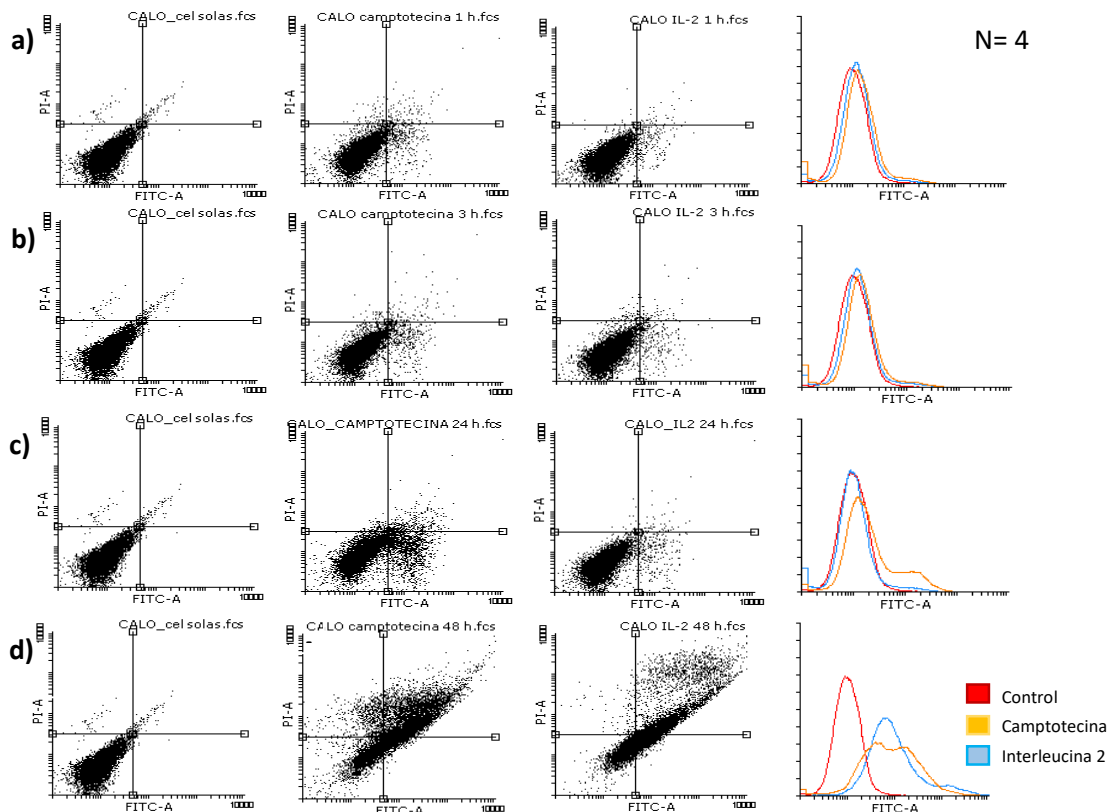


Figura 9. Determinación de anexina V/Ioduro de propidio (IP) en células de la línea de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 24 horas; d) 48 horas. En el recuadro inferior izquierdo se presentan las células sin fluorescencia, en el recuadro superior izquierdo se muestran las células necróticas que son fluorescentes a (IP), en la región inferior derecha se localizan las células marcadas con anexina V fluorescentes a FIT- C (apoptóticas) y las células en apoptosis tardía se localizan en la parte superior derecha que son marcadas por IP y anexina V. N número de repeticiones del experimento realizadas

IL-2 induce cambios en la simetría de la membrana en células INBL.

Al evaluar el efecto de 100UI/mL de IL-2 sobre INBL cultivadas en diferentes tiempos encontramos un aumento de la translocación de fosfatidil serina obteniendo un máximo de 43% a las 48 horas. Siendo más eficiente la inducción de cambios en la simetría de la membrana en la línea CALO (Figura 10).

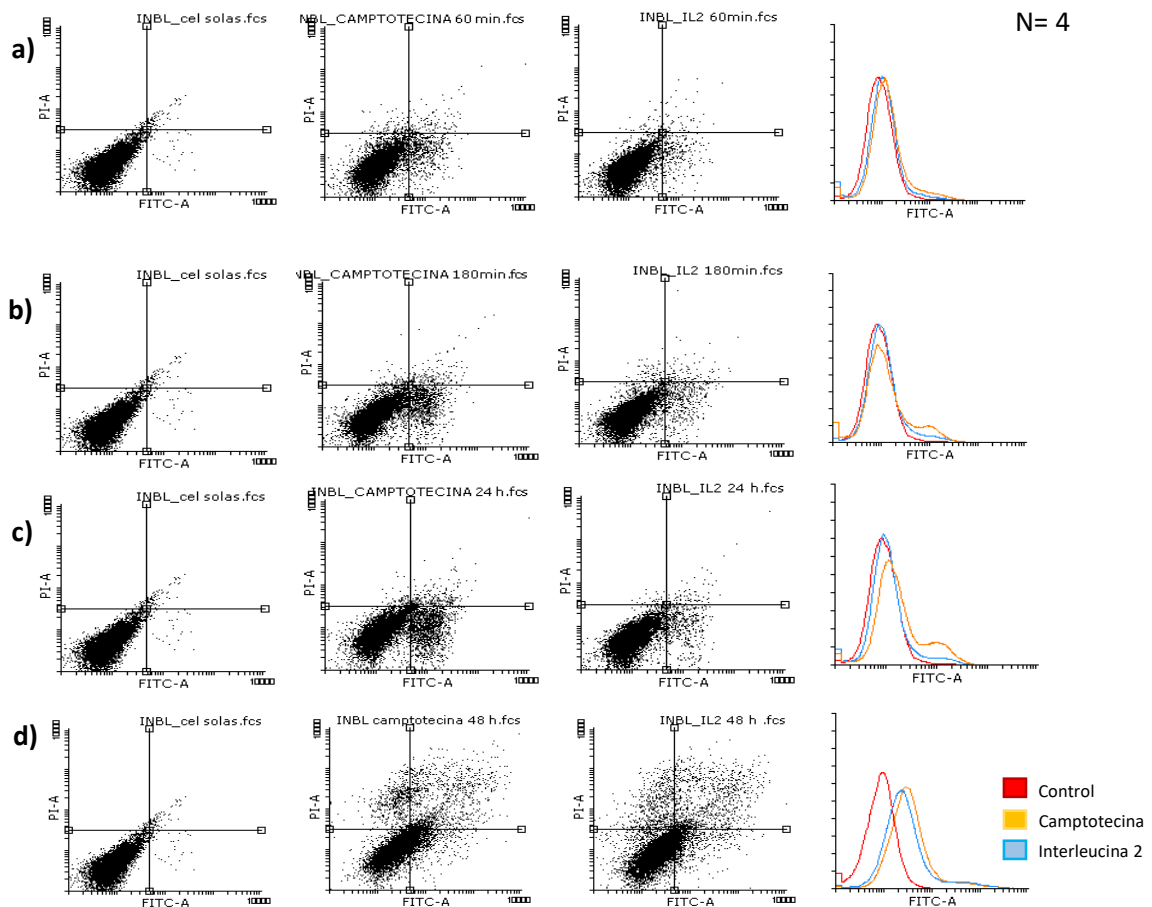


Figura 10. Determinación de anexina V/Ioduro de propidio (IP) en células de la línea de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 24 horas; d) 48 horas. En el recuadro inferior izquierdo se presentan las células sin fluorescencia, en el recuadro superior izquierdo se muestran las células necróticas que son fluorescentes a (IP), en la región inferior derecha se localizan las células marcadas con anexina V fluorescentes a FIT-C (apoptóticas) y las células en apoptosis tardía se localizan en la parte superior derecha que son marcadas por IP y anexina V. N número de repeticiones del experimento realizados

Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en prácticamente todas las células eucariotas. Están encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizan ATP a expensas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa. La mitocondria posee un sistema de doble membrana una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. La membrana externa es una bicapa lipídica, continua, uniforme y está constituida por 40% de lípidos y 60% de proteínas que forman poros, llamados porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje (del inglés voltage dependent anion channel: VDAC) que la hacen permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos. La membrana externa posee receptores de importación capaces de reconocer secuencias de direccionamiento de las proteínas citosólicas destinadas a las mitocondrias, por ejemplo, las DNA y RNA polimerasas mitocondriales. La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena transportadora es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial). Este gradiente de protones permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de H^+ generados para producir ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico. De esta manera, la membrana mitocondrial interna separa dos compartimientos de diferente concentración de H^+ lo que produce diferencias en la concentración química (ΔpH) y en la distribución de la carga ($\Delta\Psi_m$) a través de la membrana. El resultado neto es la fuerza protón motriz.

Con el objetivo de estudiar el efecto que tiene IL-2 en la regulación del potencial de la membrana mitocondrial en CALO, INBL se realizaron cultivos por 15, 30 minutos y 24 horas en presencia de 100 UI/mL de IL-2. Como control positivo de apoptosis se utilizó camptotecina y control negativo células sin estímulo. Las células se marcan con rodamina 123 que es una sonda de naturalezas catiónica y lipofílica que se emplea como indicador de la funcionalidad mitocondrial, ya que sólo se acumula en mitocondrias metabólicamente activas cuyo potencial de membrana es negativo. Por lo tanto, la fluorescencia será

inversamente proporcional a la pérdida de potencial mitocondrial. La evaluación se realizó por citometría de flujo adquiriendo 10 000 eventos en cada experimento.

IL-2 promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en CALO.

Los resultados obtenidos para la determinación de potencial de membrana mitocondrial se muestran los histogramas obtenidos para las células de la línea celular CALO cultivadas en las diferentes condiciones de cultivo marcadas con rodamina 123 en donde se puede observar la disminución de la fluorescencia que indica la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial siendo más evidente a 15 minutos.

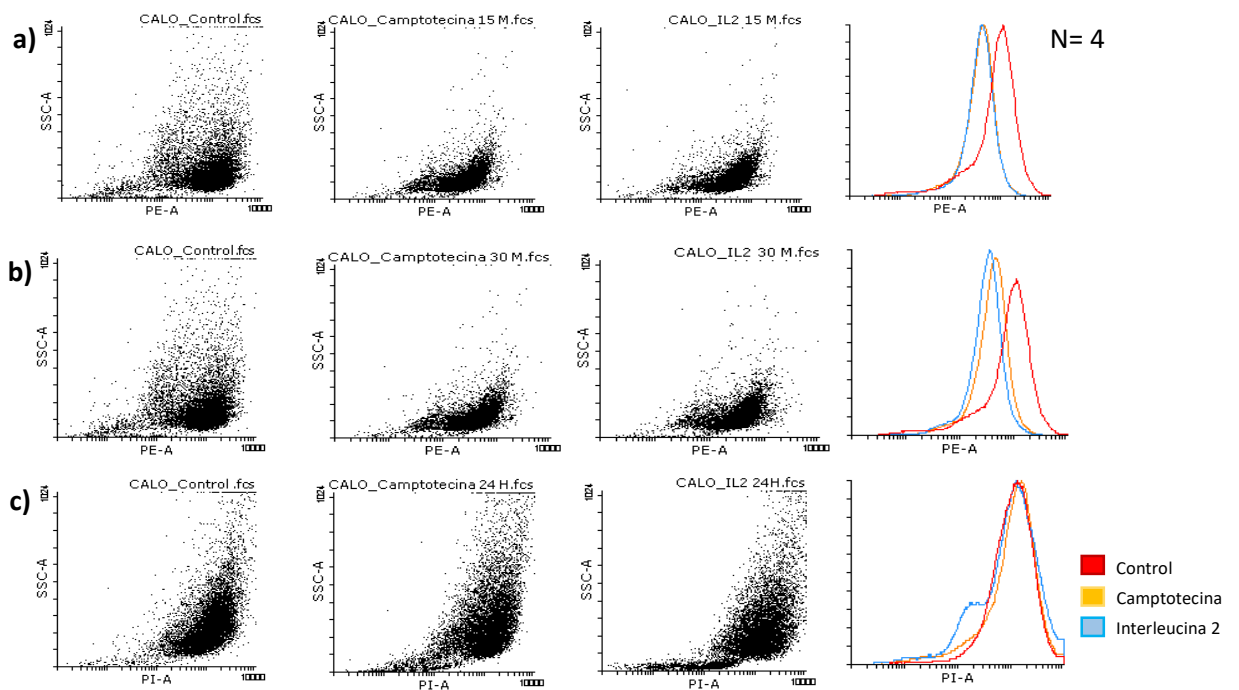


Figura 11. Evaluación del Potencial de membrana mitocondrial de la línea celular de CaCu CALO cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 24 horas. N número de repeticiones del experimento realizados.

IL-2 promueve la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en INBL

En la figura 12 se muestra los resultados obtenidos para INBL en donde se puede observar que la máxima pérdida de fluorescencia se presentó a las 24 horas de cultivo.

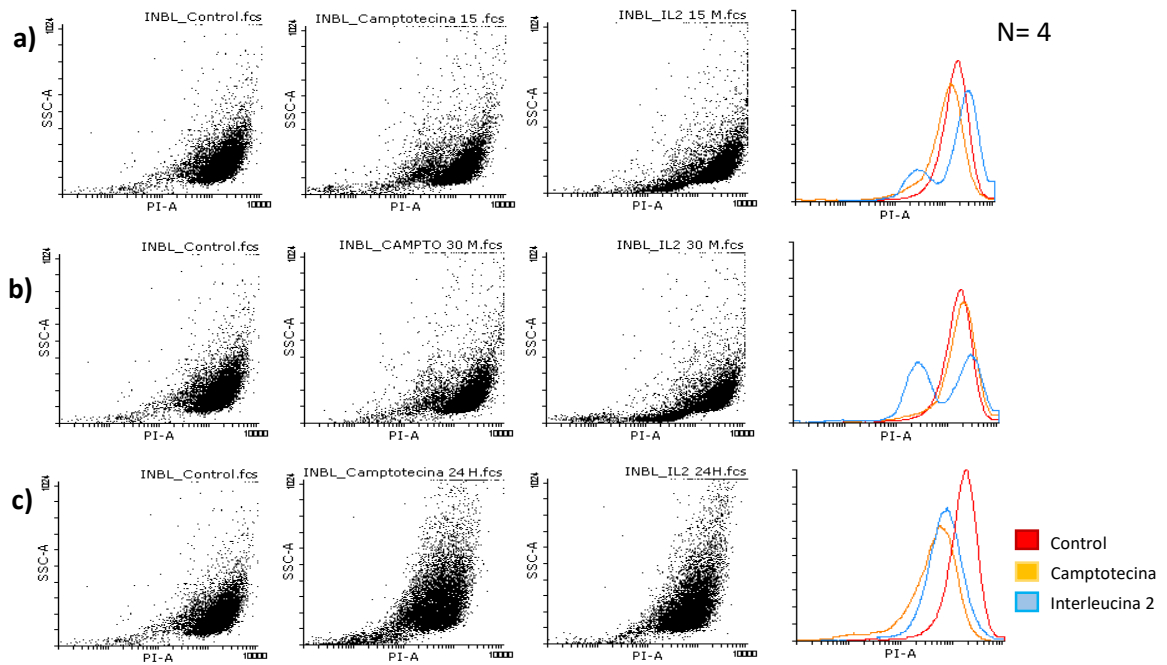


Figura 12. Evaluación del Potencial de membrana mitocondrial de la línea celular de CaCu INBL cultivadas en presencia de IL-2 y camptotecina durante: a) 1 hora; b) 3 horas; c) 24 horas. N número de repeticiones del experimento realizadas

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente el cáncer constituye uno de los problemas de salud pública más graves y difíciles de tratar, debido a las sucesivas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que alteran el ciclo celular, se han desarrollado alternativas terapéuticas como la inmunoterapia con citocinas como Interleucina 2 (IL-2) que ha sido utilizada como terapia contra el cáncer incluyendo el carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas y carcinoma de mama (Tawbí et al., 2009; Guang et al., 2011). La IL-2 está implicada en el crecimiento y diferenciación de linfocitos T y B, mejora las funciones citolíticas de células asesinas naturales (NK), e interviene en la proliferación de varios tipos de células no linfoides. El complejo receptor de IL-2 (RIL-2) comprende tres subunidades (α , β y γ), codificadas por genes no relacionados. El tipo de afinidad de RIL-2 a su ligando depende de que subunidad del receptor se expresa en la superficie celular. Las cadenas beta y gama juntas forman el receptor de afinidad intermedia, mientras que el receptor de alta afinidad se forma con la adición de la subunidad alfa a este dímero (García-Tuñón et al., 2004).

Se ha reportado que IL-2 está presente en otros tejidos normales, incluyendo células endoteliales, epitelio intestinal y en células nerviosas (Mishra et al., 2012; Meola et al., 2013; Krieg C et al., 2010). En tejidos normales los fibroblastos y células de riñón la presencia de IL-2 es más abundante en células mitóticas que en células que se encuentran en cualquier otra fase del ciclo celular. También, se ha reportado la presencia de RIL-2 en células de tumores sólidos como cáncer de estómago, riñón, espinocelular y los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (García Tuñón et al, 2004). El uso de secuencias anti-sentido para IL-2, en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello han demostrado que el bloqueo de la cadena beta del receptor para IL-2 (RIL-2 β) tienen como consecuencia la inhibición del crecimiento celular. En el Laboratorio de Oncología Celular, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas de CaCu CALO e INBL, con una expresión diferencial del RIL-2 dependiente del estadio clínico del tumor (Alvarado 1997). También se ha encontrado que CALO e INBL producen y secretan hasta 45 UI/mL de IL-2 que es suficiente para mantener su proliferación, en un modelo autócrino (Rangel-Corona et al., 2010). Asimismo, se estableció que 100 UI/ml de IL-2

inhibe su proliferación y que esta inhibición conduce, finalmente a su muerte. Otro dato importante que recién publicamos es que 100UI/mL de IL-2 regula la expresión del RNA mensajero para caspasa 3 en estas líneas celulares, expresión que parece estar regulada cíclicamente (Martínez 2011). De igual forma se ha demostrado que 100UI/ml de IL-2 regula la síntesis de la procaspasa 3 en las líneas celulares de CaCu CALO, CASKI, INBL y SIHA, (Torres 2012). Es importante mencionar que en estas células se ha confirmado la fragmentación del DNA, una característica morfológica de células que mueren por apoptosis (Del Rio 2012). Sin embargo, con estos resultados no es posible aseverar que caspasa 3 está siendo activada por IL-2, porque de manera normal las caspasas son sintetizadas en las células como precursores inactivos o procaspasas. Al determinarse la presencia basal de procaspasa 3 en las células de CaCu es posible que con el estímulo adecuado se genere la activación de caspasa 3 y regular la muerte celular por apoptosis, debido a que se sabe que esta proteína es el principal efector de este tipo de muerte celular. La apoptosis es un mecanismo normal de muerte celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas.

Morfológicamente, en la apoptosis se produce la fragmentación de DNA mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (Del Rio 2012; Yigong et al., 2002). El volumen celular total se reduce, la célula se encoge, los organelos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata, pero las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales. A continuación, se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que se denominan cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos. Al mismo tiempo, se producen una serie de procesos bioquímicos que activan endonucleasas que cortan el DNA genómico por espacios internucleosomales que generan fragmentos de DNA en un rango de 180-200 pb.

Por otra parte, se produce pérdida del potencial mitocondrial y asimetría de la membrana plasmática: los residuos de fosfatidilserina que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana celular, aparecen también en la cara externa de la misma. Este hecho permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas por los macrófagos (Kurosaka et al., 2003). Los procesos morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la

apoptosis están mediados por efectores de muerte celular como las caspasas (cisteína-proteasas). Las señales apoptóticas, tanto intracelular como extracelulares, primera etapa del proceso apoptótico, convergen para activar a las caspasas efectoras como es el caso de caspasa 3 y 7. La siguiente fase comprende la detección de esta señal y la transducción de la misma mediante vías que envían la señal a la maquinaria efectora de la muerte celular. La tercera fase es la efectora en la que están implicados las proteasas que activan la apoptosis, así como sus reguladores positivos y negativos. Y finalmente la fase en la que se produce la condensación de la cromatina y la degradación del DNA. Las señales que inducen la apoptosis son diversas entre ellas, se encuentran el daño al DNA, agentes tóxicos, estrés celular, radiaciones y factores y muerte.

Se sabe que camptotecina, un fármaco utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, induce muerte por apoptosis. Camptotecina (CPT) y sus análogos (CPTs) actúan al enlazarse con los aductos DNA-Topo I, lo que estabiliza el complejo divisible DNA-Topo I evitando la liberación del DNA y provocando la acumulación de complejos estabilizados. La formación del complejo ternario entre la CPTs-Topo I-DNA provoca la inhibición de la síntesis del DNA y RNA y la exposición prolongada a CPTs conduce a un daño irreparable en el DNA y por lo tanto provoca la muerte celular por la activación de las caspasas (Liu et al 2000; Hsiang, et al 1985; Husain et al, 1994; Fan et al 1998). Así mismo, se ha reportado que camptotecina induce apoptosis en las células SIHA mediante la inducción de cambios de permeabilidad de la mitocondria que conduce a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, disminución de los niveles de Bcl-2, liberación del citocromo c, activación de la caspasa 3 y la fragmentación del DNA (Sang et al, 2009), por lo cual este fármaco es utilizado como control positivo para evaluar muerte por apoptosis.

Tomando en cuenta los antecedentes ya mencionados, en esta investigación se aporta información sobre el mecanismo molecular del proceso de muerte celular inducido por IL-2 en células de las líneas CALO e INBL, en el que se genera la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la presencia de caspasas ejecutoras activas, como caspasa 3 y 7 y la formación de cuerpos apoptóticos evaluado por la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana mitocondrial.

Con base en los resultados presentados en este trabajo se propone que uno de los primeros eventos provocado por IL-2 característico de apoptosis es la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y para determinarlo se utilizó rodamina 123, ya que se trata de una sonda de naturalezas catiónica y lipofílica que se emplea comúnmente como indicador de la funcionalidad mitocondrial, ya que sólo se acumula en mitocondrias metabólicamente activas cuyo potencial de membrana es negativa. Se comenzó la evaluación desde 15 minutos de estimulación hasta las 24 horas y los datos adquiridos demuestran que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, indicado por la disminución de la fluorescencia en ambas líneas celulares, se presenta en tiempos cortos. Cabe destacar que la disminución máxima de la fluorescencia en ambas líneas ocurrió cuando fueron cultivadas durante 15 y 30 minutos lo que nos indica la pérdida de la función mitocondrial es un proceso bioquímico que se lleva a cabo en las primeras etapas de apoptosis.

Al analizar los resultados de activación de caspasa 3 obtenidos CALO e INBL se puede observar un comportamiento similar en cuanto al aumento gradual de caspasa 3 activa. Nuestros resultados muestran que IL-2 logra inducir una activación de caspasa 3 de la misma magnitud que la camptotecina, lo que sugiere que IL-2 regula la muerte por apoptosis. Asimismo, encontramos un aumento gradual de caspasa 3 activa con un máximo a 24 horas, pasando por una ligera disminución a las 3 horas lo que indica que la estimulación de los cultivos en presencia de 100UI/mL de IL-2 en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL induce un comportamiento cíclico de activación y síntesis de caspasa 3. Estos resultados son sustentados por datos experimentales previos de expresión de RNAm en los cuales se indica que existe expresión constante del gen de caspasa 3 en CALO e INBL realizado durante 5, 10, 15, 20, 30 minutos 1, 2, 48 y 72 horas (Martínez 2011).

Es importante mencionar que en CALO que proviene de un estadio IIB mostró que a los 15 minutos se encuentra un alto porcentaje de células positivas para caspasa 3 activa, mientras que para la línea INBL de un estadio IVB metastásico, ese porcentaje se detecta hasta los 30 minutos, lo que podría implicar que tumores de estadios tempranos son más susceptibles al efecto de IL-2 para activar caspasa 3. Sin embargo, sería pertinente evaluar este fenómeno en líneas celulares en otros estadios para generalizar nuestros resultados.

Por otro lado, los resultados de la activación de caspasa 7 con IL-2 muestran, al igual que con caspasa 3, una activación significativa de esta caspasa desde tiempos cortos y un proceso cíclico. Para la determinación de caspasa 7 se presenta un periodo de nula activación a las 3 horas para ambas líneas celulares, lo que indica que la proteína es sintetizada de novo.

La evaluación de la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular se realizó por el método de anexina-V/ioduro de durante 1, 3, 24 y 48 horas. La presencia de este fosfolípido en la cara externa de la membrana nos indica la formación de cuerpos apoptóticos. Nuestros resultados muestran que hasta las 24 horas el porcentaje de células que presentan fosfatidil serina en la cara externa de la membrana plasmática era muy pequeño, lo que sugiere que para que se genere la translocación de este fosfolípido en la membrana plasmática tienen que suceder una serie de acontecimientos morfológicos y bioquímicos como la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la activación de las caspasas. La mayor exposición de fosfatidil serina por ser un evento tardío en el proceso de apoptosis se encontró hasta las 48 horas de tanto en CALO como INBL. Sin embargo, en CALO la estimulación se presentó en el 88.6 % mientras que INBL en el 42.9 %, lo que sugiere que el estadio clínico puede estar jugando un papel importante en cuanto a la regulación de este proceso. Análogamente sería pertinente evaluar más células y en otros estadios para generalizar nuestros resultados.

En nuestros resultados de pérdida de potencial de membrana mitocondrial inducido por la IL-2 encontramos que se presenta muy intensamente en 1 hora en CALO recuperándose a las 24 horas, mientras que en INBL se incrementa progresivamente hasta llegar a su máximo a las 24 horas, demostrando una vez más diferencias importantes en su proceso apoptótico probablemente asociado a su estadio tumoral o grado de malignidad.

Tomando integralmente nuestros resultados podemos proponer que los tiempos de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 se generan en los primeros pasos de apoptosis inducida por IL-2 y que la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular en la etapa final de muerte en las células de CaCu. Podemos sugerir que IL-2 induce apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial, ya que uno de los eventos clave para desencadenar esta vía de señalización es la pérdida del potencial mitocondrial que genera la liberación de proteínas proapoptóticas que se localizan

en el espacio intermembranal de las mitocondrias y son necesarias para formar el apoptosoma encargado de la activación de caspasa 3 y ésta a su vez a caspasa 7 procesos que conducen a la muerte celular por apoptosis. Esta hipótesis se complementa con resultados previos que indican que IL-2 regula positivamente la expresión del gen de caspasa 8 y ésta a caspasa 3 con la inminente muerte por apoptosis de la célula (Sierra 2012).

Podríamos suponer, según nuestros resultados, que la caspasa 3 activa la 7, sin embargo, se ha publicado que caspasa 7 también puede ser activada por caspasa 1 como resultado de un proceso inflamatorio. Para esclarecer si su activación es inducida por caspasa 1 o 3 se podría utilizar un inhibidor específico de activación de caspasa 3 y evaluar la presencia de caspasa 7 activa.

En el Laboratorio de Oncología Celular se ha demostrado la presencia del receptor de interleucina 2 (RIL-2) en las líneas celulares de CaCu y que a altas concentraciones induce apoptosis, debido a esto y basado en nuestros resultados proponemos la hipótesis de que RIL-2 funcione como un receptor de muerte que al unirse con su receptor active una cascada de señales en donde se conforme el complejo de iniciación de muerte (DISC), activando a caspasa 8 que a su vez se encargue de activar a caspasa 3. Otra opción sería que IL-2 sea capaz de activar directamente a caspasa 8 para que pueda a su vez activar a caspasa 3 (Du C et al). En nuestra hipótesis la IL-2 generaría la activación de la cascada de señalización para conformar el complejo de iniciación de muerte (DISC), activando a caspasa 8 y que logre escindir la proteína proapoptótica Bid y que está posteriormente ingrese en espacio intermembranal de la mitocondria y se genere la formación del poro de transición en la membrana mitocondrial que tiene como consecuencia la liberación de proteínas proapoptóticas, para la formación del complejo proteico constituido por citocromo c, la proteína adaptadora Apaf-1 (del inglés Apoptosis protease-activating factor-1) y por caspasa 9 que será activada por este complejo y una vez activada formar parte de la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 para que realicen su función, que es la degradación de múltiples substratos como proteínas importantes en la regulación de la apoptosis. Para culminar con la translocación de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana mitocondrial y por lo tanto la formación de vesículas características del proceso apoptótico en donde se encuentra embebido el contenido celular denominados cuerpos apoptóticos.

Con los resultados arriba referidos proponemos el siguiente esquema que describe los mecanismos moleculares por los cuales IL-2 induce la muerte *in vitro* de células de las líneas de CaCu CALO e INBL (Figura 13).

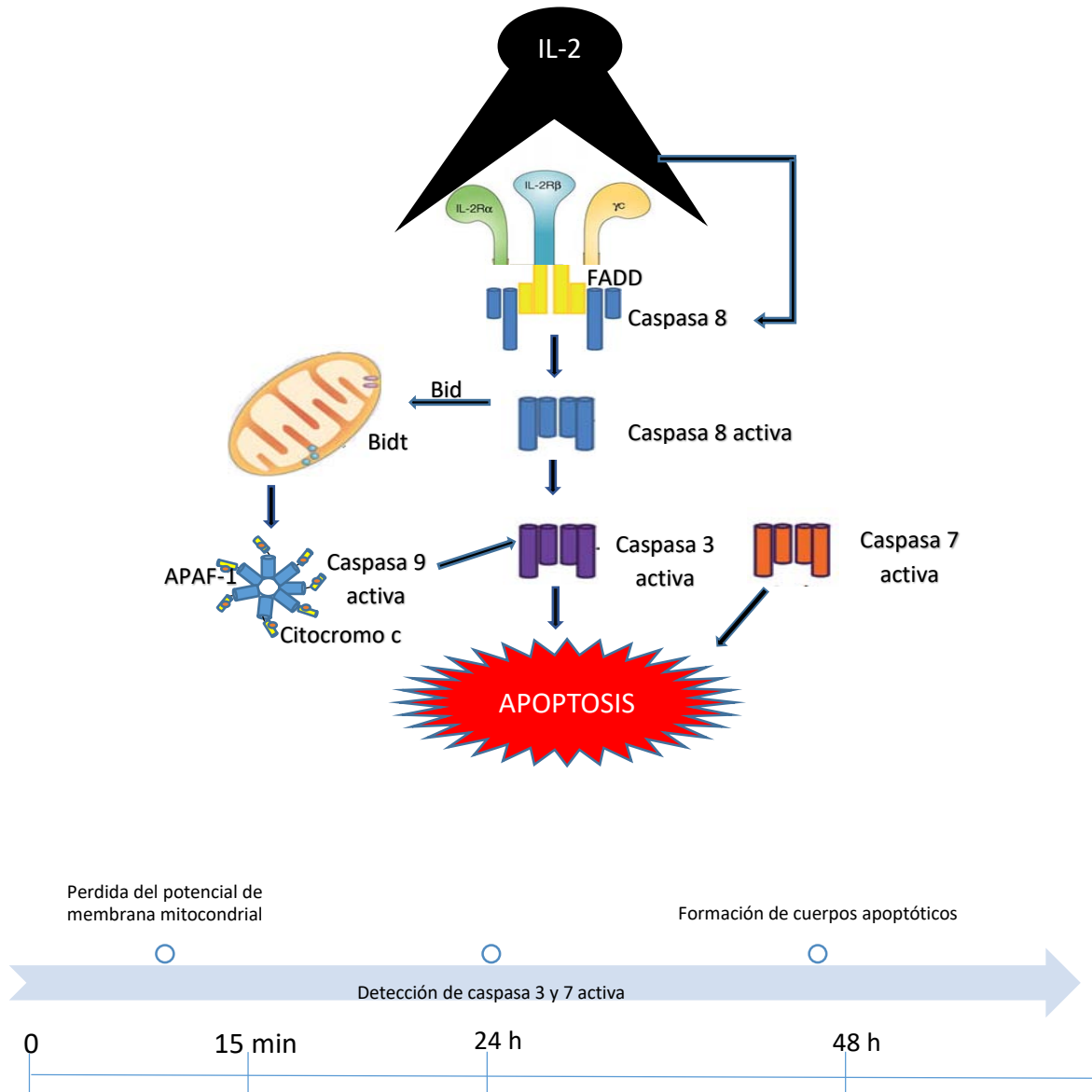


Figura 13. Modelo hipotético de inducción de apoptosis regulado por 100UI/mL de IL-2. En donde se incluye la liberación de las proteínas proapoptóticas al espacio intermembranal de la mitocondria, de igual manera se genera un aumento en la presencia de las caspasa 3 y 7 activas y la presencia de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana celular, eventos que conducen a la formación de cuerpos apoptóticos.

CONCLUSIONES

- ✓ IL-2 regula positivamente la síntesis y activación de caspasa 3 en las líneas celulares carcinoma de cérvix (CaCu) CALO e INBL, existen indicios que sugieren que este proceso es cíclico.
- ✓ La síntesis de caspasa 7 activa en las líneas celulares de CaCu es regulado por la estimulación con IL-2.
- ✓ IL-2 induce la expresión de fosfatidil serina en CaCu como indicador de muerte por apoptosis.
- ✓ IL-2 induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en CaCu.
- ✓ IL-2 induce la muerte celular por apoptosis en CaCu.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck M, Bossy-Wetzel E, Fuentes-Prior P, Salvesen G. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J*; 384, 201–232.
- Alani RM, Monger K. (1997) Human papillomaviruses and associated malignancies. *J clin oncol* 1997; 16(1):330-337
- Alvarado M. (1997) Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la Interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F
- Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. (2012) From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines nature. *Immunology* volume 13 number 10 october 2012)
- Bortner, C, Cidlowski J. (2002) "Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ*; 9(12): 1307-10.
- Bras M, Queenan B, Susin S. (2005) Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. DOI: 10.1007/s10541-005-0105-4
- Carpi A, Nicolini A, Antonelli A, Ferrari P, Rossi G. (2009) Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: an update and expectation. *Curr Cancer Drug Targets*. (8):888903.
- Cowling V, Downward J. (2002) Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death and Differentiation* (2002) 9.
- Curtin J, Cotter T. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*; 15:983-992.
- Danial N, Korsmeyer S. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
- Del Rio O. (2012) Estudio de la participación de los genes Citocromo C y COX-IV en la inhibición de la proliferación de células de carcinoma de cérvix cultivadas en

presencia de IL-2. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Biología Experimental, UNAM.

- Du C, Guan Q, Yin Z, Zhong R, Jevnikar A. (2005) IL-2-mediated apoptosis of kidney tubular epithelial cells is regulated by the caspase-8 inhibitor c-FLIP. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(4):1397-409.
- Dueñas-González A, Cetina L, Coronel J, Martínez-Ban D. (2010) Pharmacotherapy Options for Locally Advanced and Advanced Cervical Cancer Drugs; 70 (4): 403-432
- Fan Y, Weinstein J, Kohn K, Shi L, Pommier Y. (1998). Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J. Med. Chem.* 41:2216-2226.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D: GLOBOCAN (2002). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base no. 5. Version 2.0, IARC Press, Lyon,
- Fernandez A, Litwack T, Alnemri G. (1994) CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin 1 β -converting enzyme. *E. S. J. Biol. Chem.*; 269: 30761-30764.
- Floriano-Sánchez E. (2010) Human papilloma-virus: Marker of response to radiotherapy/chemoradiotherapy in cervical cancer. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44 (3): 337-46
- Fuentes-Prior P, Salvesen G. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-32. DOI: 10.1042/BJ20041142
- Garcia S, Massieu L. (2016) Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. *Focus on caspase-12 Apoptosis* 21:763–777
- García-Tuñón I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. (2004) Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Res*; 6: R1-R7 (DOI 10.1186/bcr730).

- Geserick P, Hupe M, Moulin M, Wong W, Feoktistova M, Kellert B, Gollnick H, Silke J, Leverkus M. (2009) Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J Cell Biol.* 2009 Dec 28;187(7):1037-54. doi: 10.1083/jcb.200904158.
- GLOBOCAN (2008) (IARC).
- GLOBOCAN (2012). (IARC)
- Green D, Fitzgerald P. (2016) Just So Stories about the Evolution of Apoptosis *Current Biology* 26, R620–R627, July 11, 2016 ^a 2016 Elsevier Ltd.
- Guang T, Xin Z, Hongbo F, Haifeng L, Zhongyu W (2011). The Therapeutic Effect of Cytokine-Induced Killer Cells on Pancreatic Cancer Enhanced by Dendritic Cells Pulsed with K-Ras Mutant Peptide. *Clin Dev Immunol.*
- Hanaha D, Weinberg R. (2011) *Hallmarks of Cáncer: The Next Generation.* USA Cell; 144, March 4, 2011. Elsevier Inc
- Hengartner M. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407(6805): 770-6.
- Hsiang Y, Hertzberg R, Hecht S, Liu L. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260:14873-14878.
- Husain I, Mohler J, Seigler H, Besterman J. (1994). Evaluation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 54:539-546.
- Korsmeyer S, Wei M, Saito M, Weiler S, Oh K, Schlesinger H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*; 7:1166-117
- Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. (2010) Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(26):11906-11911. doi:10.1073/pnas.1002569107.

- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; 171:4672-9.
- Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V, Gariglio P. (2009) Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1805 (2010) 6–16.
- Lamkanfi M, Kanneganti T. (2010) Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (2010) 21–24.
- Lavrik I, Golks A, Krammer P. (2005) Caspases pharmacological manipulation of cell death. Division of Immunogenetics, Tumor Immunology Program, German Cancer Research Center, Heidelberg, German.
- Liu L, Desai S, Li T, Mao Y, Sun M, Sim S. (2000). Mechanism of action of camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Volume 922.
- López-Marure R, Gutiérrez G, Mendoza C, Ventura J, Luis Sánchez L, Reyes M, Zentella A, Montaña L. (2010) Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00315-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00315-7)
- Lu-Lu Y, Hui-Qin G, Xiao-Qin L, Yu Q, Ze-Ni W, Le-Ni K, Xun Z, You-Lin Q, Wen C. (2016) p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3 year cohort study in China
- Martínez F. (2011) Determinación de la expresión de ARNm para caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino: HELA, INBL y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes tiempos. Tesis de licenciatura, Fes Zaragoza UNAM
- Masse A. (2012) IL-2 regula la expresión del rnm de la proteína bid en células de las líneas de cáncer de cérvix inbl y calo. Tesis de licenciatura, Fes Zaragoza UNAM
- Meola D, Huang Z, King M, Petitto J. (2013) Loss of Cholinergic Phenotype in Septohippocampal Projection Neurons: Relation to Brain Versus Peripheral IL-2 Deficiency. *Neuroscience letters*. 2013;539:60-64.doi:10.1016/j.neulet.2013.01.054.

- Mishra J, Waters C, Kumar N. (2012) Molecular mechanism of interleukin-2-induced mucosal homeostasis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2012;302(5):C735-C747. doi:10.1152/ajpcell.00316.2011.
- Newmeyer D. (2000) Preservation of Mitochondrial Structure and Function after Bid- or Bax-mediated Cytochrome c Release; *The Journal of Cell Biology*, Volume 150, 2000
- Ning W, Xi-Wei W, Keli A, Yves P, Jun D, Ding L, Lian-Quan G, Zhi-Shu H, Lin-Kun A. (2010) A Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with Different Mechanism from Camptothecin Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest to K562 Cells. *Biochemistry*. 2010 Nov 30; 49(47): 10131–10136. doi: 10.1021/bi1009419
- Parkin D, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2002) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74–108
- Pedraza-Brindisa E, Sánchez-Reyesa K, Hernández-Flores G, Bravo-Cuellara A, Jave-Suárez J, Aguilar L, Gómez-Lomelía P, López-López B, Ortiz-Lazareno P. (2016) Culture supernatants of cervical cancer cells induce an M2 phenotypic profile in THP-1 macrophages. doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.07.001
- Prokhorova E, Zamaraev A, Kopeina G, Zhivotovsky B, Lavrik I (2015) Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution.
- Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, del Río-Ortiz I, Nieves-Ramírez ME, Morán-Bañuelos H, González-Tenorio O, Cáceres-Cortés J, Weiss-Steider B. (2011) Cationic liposomes bearing IL2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice. *J Drug Target*. 19(2):79-85
- Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres Guarneros C, Weiss-Steider B. (2010) Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*. 50(3):273-7.
- Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Cáceres-Cortés J, Alvarado-Moreno A, Valle-Mendiola A, Soto-cruz I, Weiss-Steider B, Rangel-Corona R. (2004) Interleukin-2 (IL-2) Receptor- β signalling is activated by c-kit in the absence of IL-2, or by

exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling* 16:1239-1247.

- Rosenberg S. (2014) IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer, *J Immunol* 2014; 192:5451-5458;
- Rudolph S, Lorincz A, Wheeler C, Gravitt P, Lazcano-Ponce E, Torres-Ibarra L, León-Maldonado L, Ramírez P, Rivera B, Hernández R, Franco E, Cuzick J, Méndez-Hernández P, Salmerón J; FRIDA Study. (2016) Group Population-based prevalence of cervical infection with human papillomavirus genotypes 16 and 18 and other high risk types in Tlaxcala, Mexico. doi: 10.1186/s12879-016-1782-x
- Sánchez-Barriga J. (2012) Tendencias de mortalidad por cáncer cervicouterino en las siete regiones socioeconómicas y en las 32 entidades federativas de México en los años 2000-2008. Dirección de Investigación Operativa en Epidemiología. Dirección General Adjunta de Epidemiología. Secretaría de Salud, México, D.F. *Gaceta Médica de México*. 2012; 148:42-51
- Sang W, Yun J, Wonyong K, Chung S. (2009) Antitumor Effects of camptothecin combined with conventional anticancer drugs on the cervical and uterine squamous cell carcinoma cell line SiHa. *Korean J Physiol Pharmacol* Vol 13: 115–121,
- Santos S, Hans K, Zamzami N, Marzo I, Snow B, Brothers G, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett D, Abersold R, Siderovski D, Penninger J, Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation* (2015) 22, 526–539. doi:10.1038/cdd.2014.216
- Sierra M. (2011) Participación de caspasa 8 y 12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de cáncer cérvico uterino, cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de licenciatura, Fes Zaragoza UNAM
- Tao J, Caicun Z, Shengxiang R. (2016) Role of IL-2 in cancer immunotherapy. ISSN: (Print) 2162-402X (Online) Journal homepage:

- Tawbi H, Nimmagadda N. (2009) Targeted therapy in melanoma. *Biologics*.2009; 3:475-84.
- Tomicic T, Kaina B. (2013) Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors *Biochimica et Biophysica Acta* 1835 11–27,
- Torres C (2012) Interleucina 2 regula la expresión de caspasa 3 en las líneas de cáncer cervicouterino caski, calo, inbl, siha Tesis de licenciatura, Fes Zaragoza UNAM
- Veijalainen O, Kares S, Kujala P, Tirkkonen M, Vuento R, Kholová I, Luukkaala T, Osuala V, Mäenpää J. (2016) HPV test with cytology triage in organized screening for cervical cancer. doi: 10.1111/aogs.13013
- Venditto V, Simanek E. (2010) Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. *Mol Pharm*. 2010 Apr 5;7(2):307-49
- Verhagen A, Ekert P, Pakusch M, Silke J, Connolly L, Reid G, Moritz R, Simpson R, Vaux D. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):43-53.
- Vogelstein B, Kinzler K. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug;10(8):789-99.
- Vorobjev I, Barteneva N. (2016) Multi-parametric imaging of cell heterogeneity in apoptosis analysis. 2016 Published by Elsevier Inc.).
- Wall M, Wani M. (1996) Camptothecin. Discovery to clinic. *Ann N Y Acad Sci*. 1996 Dec 13; 803:1-12.
- Walsh J, Cullen S, Sheridan C, Luthi A, Gerner C, Martin S. (2007) Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases
- Weinstein F, Kohn J, Shi K, Pommier S. (1998). Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J.Med. Chem*. 41:2216-2226.
- Willis S, Adams J.(2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):617-25. Epub 2005 Oct 21

- Xiao-Jun W, Qin C, Yan Zhang, Xiao-Dong Su. (2015) Activation and regulation of caspase-6 and Its Role in neurodegenerative diseases. *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. 55:553–72
- Xiaoliang Y, Sudan H, Yu H. (2016) The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways *Virology Journal* (2016) 13:77 DOI 10.1186/s12985-016-0528-0
- Yağmur K, Aysun A, Melis K, Yusuf B. (2016) Características bioquímicas y morfológicas de apoptosis Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis *Tumor Biol.* DOI 10.1007/s13277-016-5035-9
- Ye Su, Haijiang Wu, Alexander P, Ling-Lin Z, Xinna D, Zhu X, Anthony M. (2016) Regulatory non-coding RNA: new instruments in the orchestration of cell death *Cell Death and Disease* 7, e2333; doi:10.1038/cddis.2016.210; published online 11 August 2016)
- Yigong S. (2002). Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, Vol. 9, 459–470.