



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Tesis de Licenciatura

Inhibidor (Z-DEVD-FMK) confirma la participación de Caspasa 3 en el proceso de muerte inducida por IL-2 en células de la línea de carcinoma de cérvix INBL

Presenta:

Téllez Ramírez Sergio Gersán

Para obtener al grado de:

Biólogo

Director de Tesis

C. a Dr. Rosalva Rangel Corona

Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), Laboratorio 4 de la planta Baja.

Ciudad de México, mayo 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Fecha: 22 de mayo de 2018

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

Zaragoza

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en el Laboratorio de Oncología Celular “L-4 planta baja”, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la C. a Dra. Rosalva Rangel Corona.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del programa PAPIME de la DGAPA, UNAM Proyecto PE-217117

Ciudad de México, mayo 2018



## Dedicatoria

A la memoria de mi abuelo Miguel Téllez Gonzales, por todo el amor, cariño, comprensión, consejo y apoyo incondicional durante toda mi carrera, sus palabras siempre me alentaron a autosuperarme y alcanzar mis objetivos y sueños.

A mis padres María del Rosario Ramírez Díaz y Sergio Téllez Suarez por enseñarme a perseverar ante las adversidades para lograr cumplir mis metas, por siempre alentarme a seguir mis estudios y siempre estar en continua formación para llegar a convertirme en un profesional integral.

A mi hermana Corinna Téllez Ramírez, por siempre brindarme su apoyo incondicional pese a nuestras constantes diferencias.

## Agradecimientos

A mi asesora de Tesis, la Maestra en Ciencias Biológicas Rosalva Rangel Corona por su tiempo, ayuda, apoyo, consejo y ejemplo durante la elaboración de mi trabajo de tesis, además de permitirme pertenecer al grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Santa, Ángel, Edgar, Marco, Itzel, Isaac, Anai, Leticia, José Carlos, Carmen, Berenice, Adrián y Leonardo, por esos momentos gratos dentro del laboratorio, momentos de trabajo y de juego, en especial a Santa, por su cariño y aliento durante los momentos difíciles y sobre todo por su amistad pese a todo, a Edgar por su asesoría, consejo y enseñanzas durante toda mi estadía dentro del laboratorio, y por último a Leonardo por su asesoría y consejo.

Al señor José Chavarría por su dedicación y ayuda dentro del laboratorio, además de su grata compañía y a la señora Ángeles por su amistad y apoyo en el laboratorio.



## Contenido

I.	Abreviaturas .....	4
II.	Resumen .....	5
III.	Marco Teórico .....	7
1.	Cáncer .....	7
2.	Huellas del Cáncer.....	10
3.	Clasificación del Cáncer .....	12
4.	Estadificación del Cáncer .....	15
5.	Clasificación del CaCe.....	15
6.	Neoplasia Intraepitelial Cervical .....	19
7.	Carcinoma de Cérvix .....	20
8.	El cáncer en México .....	22
9.	Importancia del Carcinoma de Cérvix.....	24
10.	Tratamiento contra el cáncer .....	24
11.	Alternativas terapéuticas, Inmunoterapia .....	25
12.	Citocinas .....	27
13.	Interleucina 2 (IL-2) .....	27
14.	Apoptosis .....	29
15.	Vía Intrínseca .....	29
16.	Vía extrínseca .....	30
17.	Fase de ejecución de la apoptosis.....	33
18.	Caspasas .....	33
19.	Camptotecina .....	37
IV.	Antecedentes .....	38
V.	Justificación .....	39
VI.	Hipótesis.....	40
VII.	Objetivos .....	40
VIII.	Procedimiento.....	42
IX.	Resultados.....	46
	Determinación de Caspasa 3, 6 y 7 Activas .....	46
	Presencia de caspasa 3 activa en células de la línea INBL.....	47
	Presencia de Caspasa 6 activa en células de la línea INBL .....	48
	Presencia de caspasa 7 activa en células de la línea INBL.....	50
	Determinación de Anexina V .....	52
X.	Discusión de Resultados.....	54
XI.	Conclusiones .....	61
XII.	Perspectivas .....	61
XIII.	Referencias.....	62



## I. Abreviaturas

Apaf-1: Factor activador de apoptosis.

ATP: Adenosin trifosfato.

BID: Dominio de muerte para la interacción

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

CaCe: Carcinoma de cérvix.

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas.

CASPASAS: Cisteína proteasas específicas de aspartato.

CPT: Camptotecina

DD: Dominio de muerte.

DED: Dominio efector de muerte.

DISC: Complejo de señalización de iniciación de muerte.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ECM: Matriz extracelular.

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas.

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

FBS: Suero fetal bovino.

FIGO: Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

HPV: Virus del papiloma humano.

IL-2: interleucina 2.

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical

NK: Células asesinas naturales.

PBS: Tampón salino de fosfato.

R IL-2: Receptor de interleucina-2.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARN: RNA mensajero.

TOPO I: Topoisomerasa I

UIDCC: Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer.

Z-DEVD-fmk: péptido sintético Asp-Glu-Val-Asp fluorometilcetona



## II. Resumen

Las células que componen al cuerpo humano se dividen y mueren bajo un control riguroso. Cuando este control se pierde a través de un proceso de Carcinogénesis, se desencadena el crecimiento descontrolado de las células y así se conduce al desarrollo de un cáncer.

El Carcinoma de Cérvix (CaCe) ocupa el séptimo lugar entre las neoplasias en la población mundial, y el cuarto lugar de neoplasias más frecuentes entre las mujeres, con un aproximado de 528 mil casos diagnosticados al año, 85% de los cuales se registran en países en vías de desarrollo. En América Latina es la segunda neoplasia más común en la población femenina con 68 mil casos anuales.

En México el CaCe es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estiman 13,960 casos. Para enfrentar este problema, se han empleado diferentes métodos, entre los que se encuentra la inmunoterapia en la que se emplean citocinas como Interleucina 2 (IL-2), que se ha mostrado puede inducir regresión tumoral en estadios avanzados, sin embargo, los efectos secundarios implicados, han limitado el uso de estas terapias, lo cual hace indispensable, dilucidar el mecanismo de acción de la IL-2 para superar las limitaciones de esta terapia.

Investigaciones del Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer FES-ZARAGOZA UNAM, han demostrado que 100 UI/ml de IL-2 administrada en cultivos de la línea celular INBL de CaCe, regula positivamente la apoptosis, así como la síntesis de caspasa 3.

Los resultados de este trabajo muestran que en la línea celular INBL cultivada en presencia de 100UI/ml de IL-2 los niveles de caspasa 3 activa aumentan considerablemente respecto a la expresión basal. Sin embargo, al inhibir caspasa3 activa con un inhibidor específico de caspasa 3 activa (Z-DEVD-fmk), se observó



la presencia de caspasa 6 activa lo que nos hace pensar que la activación se lleva a cabo a través de una vía independiente de caspasa 3. Interesantemente también detectamos un aumento de caspasa 7 activa al usar el inhibidor Z-DEVD-fmk por lo que proponemos que el aumento de su expresión es un fenómeno de sustitución o relevo de caspasa 3 cuando esta es bloqueada irreversiblemente por el inhibidor. Asimismo, pensamos que caspasa 7 regula el proceso de apoptosis en ausencia de caspasa 3 activa.



### **III.Marco Teórico**

#### **1. Cáncer**

Las células que componen al cuerpo humano crecen, se dividen y mueren bajo un control estricto y riguroso, permaneciendo limitadas al área de donde se originaron. Esto quiere decir que, cuando las células envejecen o se dañan, se mueren y nuevas células toman su lugar (Macarulla & Ramos, 2009).

La división de una célula conlleva a la formación de otras dos células exactamente iguales a las de origen, con sus mismos componentes y sus mismas funciones. Esta división está regulada por una serie de mecanismos de control contenidos en el material genético, los cuales consisten en indicar a la célula el momento adecuado en el que debe dividirse, así como el momento adecuado para detenerse (Figura 1). Es cuando la pérdida del correcto funcionamiento del sistema de regulación a través de un proceso de Carcinogénesis, que puede desencadenar el crecimiento descontrolado de la célula y así conducir a esta, al desarrollo de un cáncer (Macarulla & Ramos, 2009).

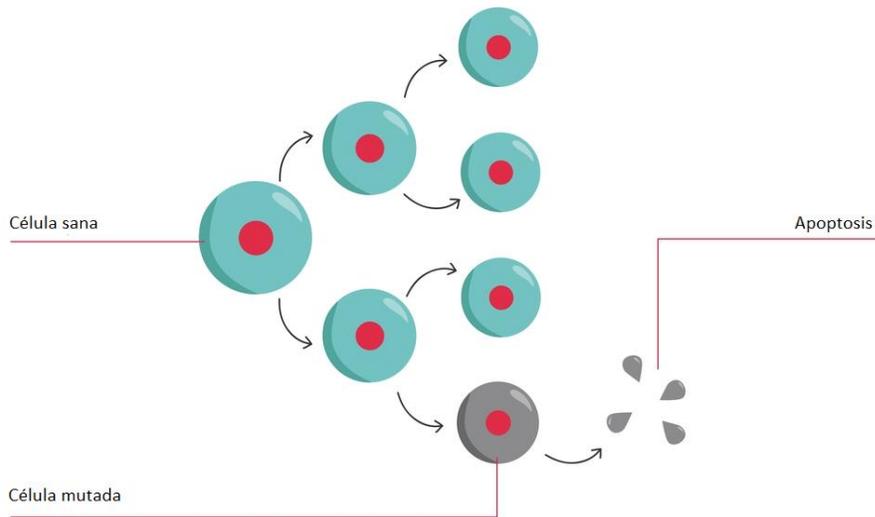


Figura1. Proliferación celular normal, donde las células con daño genético pasan por un riguroso control que culmina en la Apoptosis. (Tomado y Modificado de TBTC 2014)

El Cáncer es el nombre dado a un conjunto de enfermedades relacionadas a un crecimiento anormal de células (Mercado *et al.*, 2016). En todos los casos, el cáncer se produce por múltiples cambios en la expresión de diferentes genes que conducen a la proliferación desequilibrada de las células y un proceso de muerte celular programada deficiente, que finalmente, evoluciona en una población de células con la capacidad de proliferar indefinidamente invadiendo tejidos de todo el organismo (Figura 2), fenómeno al que se le denomina metástasis (Ruddon, 2007).

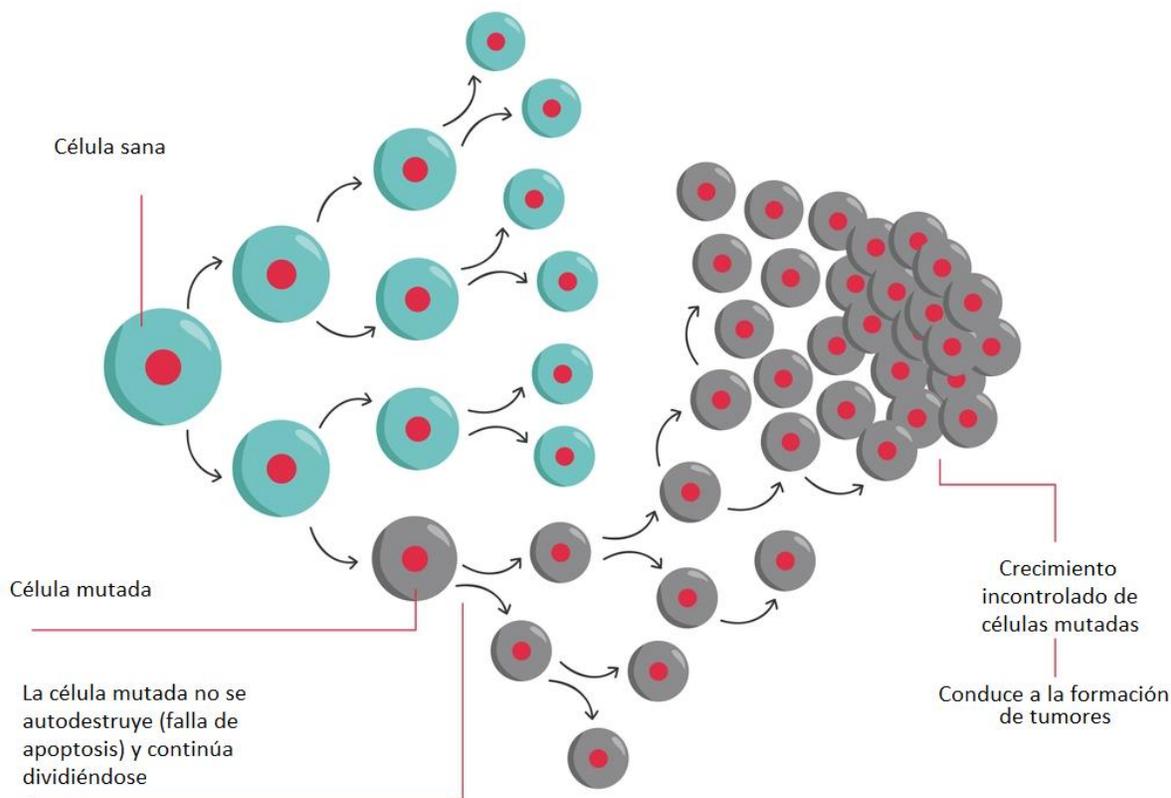


Figura 2. Proliferación celular anormal, donde las células con daño genético logran evadir los procesos de control de proliferación y, por tanto, la Apoptosis. (Tomado y Modificado de TBTC, 2014)

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la salud (OMS), tan solo en el 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, y se calcula que el número de casos aumentará en un 70% en los próximos 20 años (Stewart & Wild, 2014).

Las características que distinguen un cáncer de un tumor benigno son las habilidades para invadir localmente y extenderse a los ganglios linfáticos regionales para hacer metástasis a los órganos distantes del cuerpo (Gupta &



Massagué, 2006). Clínicamente, el cáncer parece ser muchas enfermedades con características fenotípicas diferentes (Ruddon, 2007), y a medida que avanza el crecimiento del cáncer, la variabilidad genética en la población celular, causada por la acumulación de errores genómicos, produce heterogeneidad en características tales como antigenicidad celular, invasividad, potencial metastásico, tasa de proliferación celular, estado de diferenciación y respuesta a agentes quimioterapéuticos (Ruddon, 2007).

En general, los cánceres causan una morbilidad significativa y serán letales para el huésped si no se tratan. Las excepciones a esto parecen ser cánceres latentes que pueden permanecer clínicamente indetectables (o *in situ*), permitiendo que el huésped tenga una expectativa de vida estándar (Ruddon, 2007).

## 2. Huellas del Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representó 7.6 millones (13% de todas las muertes) en el 2008 (Ferlay *et al.*, 2008). En los Estados Unidos, por ejemplo, las probabilidades de padecer cáncer oscilan entre 44% para los hombres y 38% para las mujeres (Jemal *et al.*, 2010). La determinación de las causas del cáncer es un tema complejo, pero los factores de riesgo conocidos son el abuso del alcohol y el tabaco, las infecciones, la radiación, la obesidad y la falta de actividad física (Gutschner & Diederichs, 2012).

Aunque el cáncer comprende un grupo heterogéneo de enfermedades, una característica que las relaciona, es la creación de células anormales que crecen más allá de sus límites naturales. En 2000, Hanahan y Weinberg propusieron seis características del cáncer que en conjunto forman el principio fundamental de esta transformación maligna, las cuales fueron actualizadas en 2011 (Figura 3).

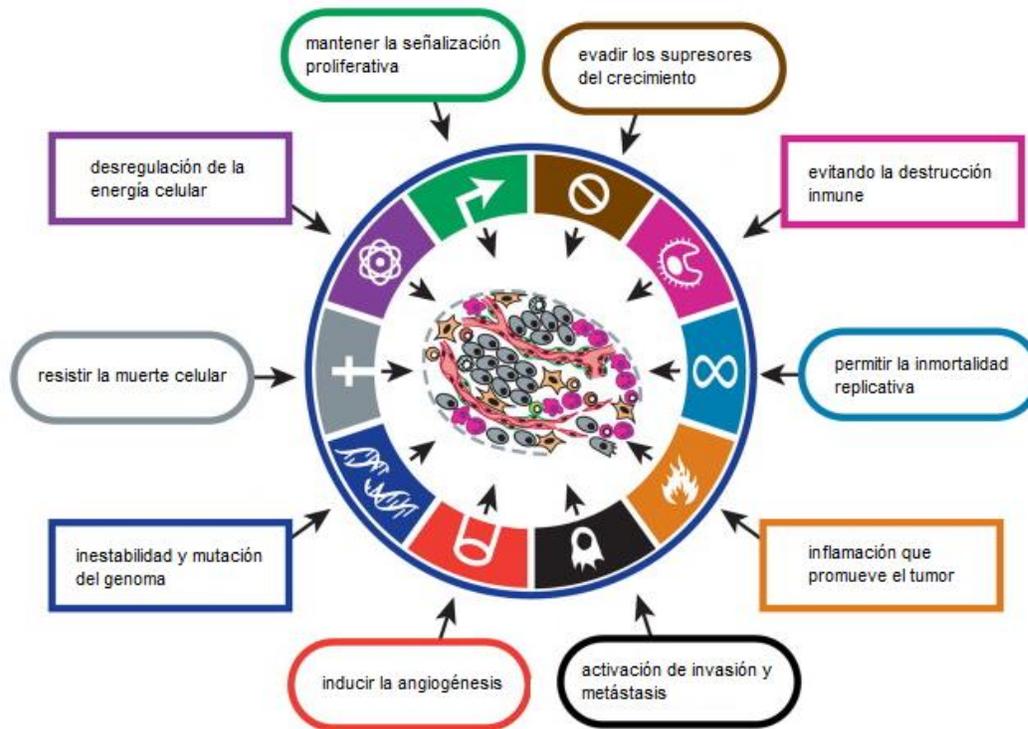


Figura 3. Actualización de las características y ventajas adquiridas por las células tumorales durante el desarrollo del cáncer descrito por Hanahan Weinberg en 2000 (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

Dado que la formación de tumores es un proceso de múltiples etapas, las células normales evolucionan progresivamente hasta el estadio neoplásico y, a lo largo de su recorrido, adquieren capacidades particulares que les permiten volverse tumorigénicas. Estas características básicas distintivas son:

- mantener la señalización proliferativa
- evadir los supresores del crecimiento
- evitando la destrucción inmune
- permitir la inmortalidad replicativa
- inflamación que promueve el tumor
- activación de invasión y metástasis



- g) inducir la angiogénesis
- h) inestabilidad, mutación del genoma
- i) resistir la muerte celular
- j) desregulación de la energía celular

### **3. Clasificación del Cáncer**

Existen dos formas actuales de clasificar el tipo de cáncer, la primera es por el sitio donde se originó, y el segundo es por el tipo histológico o del tejido (de la Torre, 2008). En la primera clasificación de sitios primarios de origen, el cáncer se puede clasificar por tipos específicos, ya sea cáncer de pecho, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinoma renal, etc. (Figura 4). En cuanto a la segunda clasificación se utiliza la Clasificación Internacional de las Enfermedades para la Oncología 3ed (ICD-O-3).

De acuerdo con la ICD-O-3 el cáncer se clasifica en seis diferentes categorías, Carcinoma, Sarcoma, Mieloma, Leucemia, Linfoma y combinado.

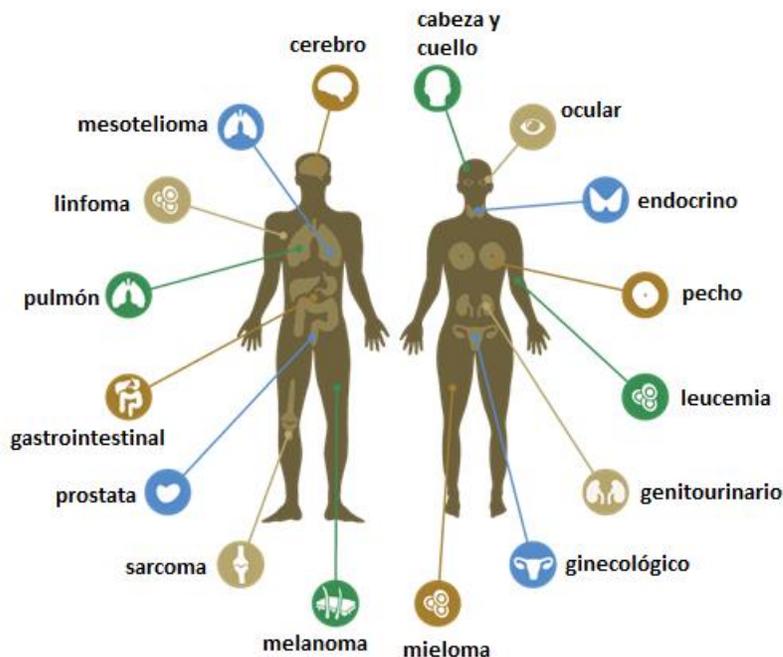


Figura 4. Tipos de Cáncer más comunes (Tomado de PMF, University Health Network” 2017)

El Carcinoma es el tipo de cáncer más común, y este se origina en las células epiteliales que forman las capas más externas del cuerpo o en los tejidos que recubren a los órganos internos. Los carcinomas pueden clasificarse en tres tipos, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma. El carcinoma de células basales es la forma más común de todos los cánceres. Ocurre en las células que recubren la región profunda de la capa externa de la piel. El carcinoma de células escamosas es el segundo tipo más común de cáncer, este se desarrolla a partir de las células planas y escamosas que son el tipo de célula primaria que forman la capa más externa de la piel (la epidermis). El Adenocarcinoma da origen en las células glandulares, las cuales producen moco y otros fluidos, por lo que se encuentran en diferentes órganos de cuerpo (SEER Training, 2018).



El Sarcoma es el tipo de cáncer que se origina en los tejidos conectivos y de apoyo, órganos entre los que se encuentran todos los músculos, huesos, cartílagos y tejidos adiposos. El sarcoma del esqueleto se clasifica en osteosarcoma (se origina de tejido óseo), condrosarcoma (se origina de los cartílagos) y fibrosarcoma (del componente fibroso del hueso) (SEER Training, 2018).

El mieloma es el tipo de cáncer que se origina a partir de células del plasma de la médula. Las células del plasma son capaces de producir los diversos anticuerpos en respuesta a infecciones, pero durante esta afección se forman anticuerpos deficientes, convirtiendo al organismo en blanco vulnerable a infecciones (Low, 2011).

La Leucemia es un grupo de tipos de Cáncer que se agrupan dentro los tipos de cáncer de la sangre, afectando a la médula ósea como sitio de producción de glóbulos. La leucemia provoca que la médula produzca glóbulos blancos inmaduros, en exceso y completamente no funcionales. La Leucemia se puede clasificar en Leucemia Mielocítica Aguda (AML), Leucemia Mielocítica Crónica (CML), Leucemia Linfática o Linfocítica, Leucemia linfática o Linfoblástica Crónica (CLL), y Eritremia (Verma & Singh, 2014).

El Linfoma se origina en sistema linfático y a diferencia de la leucemia, este tipo de cáncer involucra el crecimiento de tumores sólidos. Este cáncer afecta directamente a los ganglios linfáticos y en sitios extranodales como son el estómago, cerebro e intestinos.

Cuando se habla de un cáncer combinado se refiere a que el origen de este puede ser en dos órganos de naturaleza diferente (Mandal, 2012).



#### **4. Estadificación del Cáncer**

Cuando se determina la extensión en que el cáncer se ha propagado, se habla de estadios o estadificación del cáncer. Esto es fundamental para conocer la gravedad de la enfermedad en cuestión, y así hacer una exhaustiva evaluación de tratamientos para lograr la sobrevivencia del paciente (ACS, 2016; NIH, 2015).

Existen muchos sistemas que clasifican la estadificación, uno de ellos es el sistema “TNM de estratificación”, el cual se usa de forma poco específica para diferentes tipos de Cáncer. Sin embargo, existen otras clasificaciones más específicas las cuales incluyen ubicaciones, tipo de células, tamaño del tumor y grado de metástasis (NIH, 2015).

El Instituto Nacional del Cáncer NIH, menciona que el sistema más versátil a utilizar para clasificar el estadio del cáncer es el “TNM”, la T hace referencia a la evaluación del tamaño y extensión del tumor principal o tumor primario; la letra N hacer referencia a la evaluación de la extensión del cáncer que se ha diseminado a los ganglios o nódulos linfáticos cercanos; la letra M hace referencia a si el cáncer se ha diseminado desde el tumor primario a otras partes del cuerpo, en otras palabras, si el cáncer ha logrado la metástasis.

#### **5. Clasificación del CaCe**

Cuando se habla de CaCe, se puede emplear dos tipos de clasificaciones, el sistema TNM, que es común para describir a los distintos tipos de cáncer en general, y el sistema de la “International Federation of Gynecology and Obstetrics” (FIGO). El sistema FIGO clasifica la enfermedad en etapas comprendidas entre 0 y IV, y las etapas descritas por este sistema son similares al sistema TNM, excepto por que este sistema no incluye la información que respecta a los ganglios linfáticos hasta después de la etapa III (Figura 5) (ACS, 2016).

**Estadios del cáncer cervicouterino**

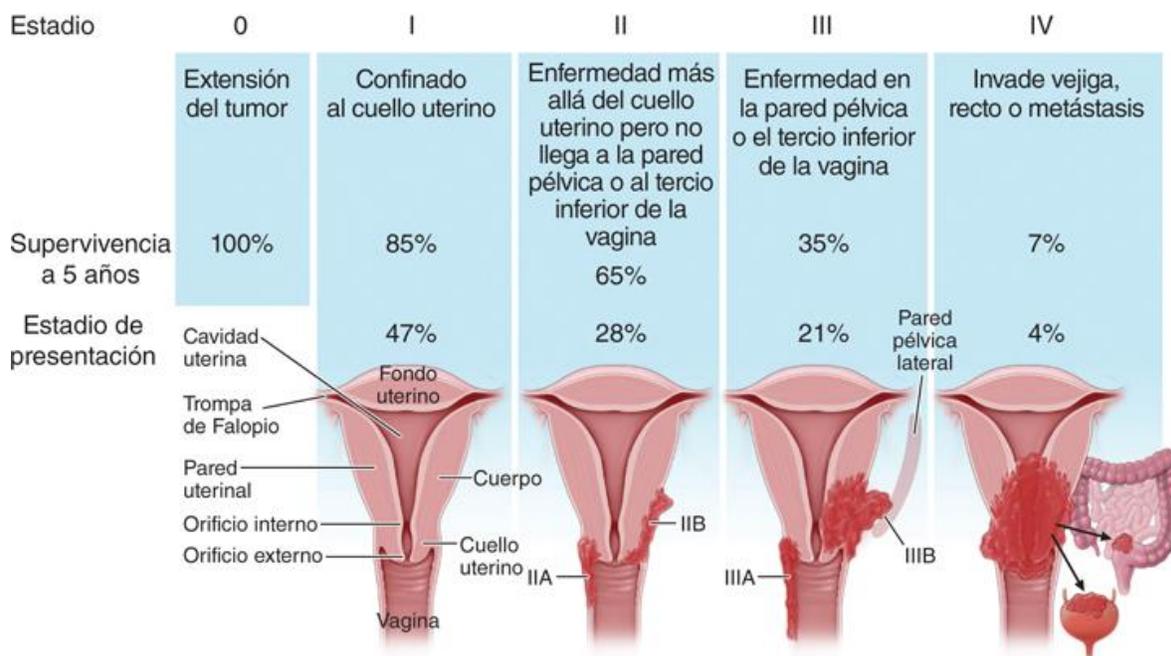


Figura 5. Estadios del cáncer. (Tomado de Kasper *et al.*, 2016).

-Etapa 0 (Tis, N0, M0): las células cancerosas sólo se encuentran en las células de la superficie del cuello uterino sin invadir los tejidos más profundos del cuello uterino. Esta etapa también se llama carcinoma *in situ* (CIS), y es parte de neoplasia intraepitelial cervical en grado 3 (CIN3). La etapa 0 no está incluida en el sistema de FIGO.

-Etapa I (T1, N0, M0): en esta etapa el cáncer ha invadido el cuello uterino, pero no fuera del útero. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IA (T1a, N0, M0): forma temprana de la etapa I. Hay una cantidad pequeña células cancerosas que solo son visibles bajo el microscopio. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).



Etapa IA1 (T1a1, N0, M0): el cáncer es de menos de 3 de profundidad y de menos de 7 mm de ancho. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

Etapa IA2 (T1a2, N0, M0): el cáncer es entre 3 mm y 5 mm de profundidad y de menos de 7 mm de ancho. El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IB (T1b, N0, M0): hay un crecimiento de células cancerosas capaces de visualizarse a simple vista y bajo el microscopio; si se han propagado a más de 5 mm de profundidad dentro del tejido conectivo del cuello uterino y tienen más de 7 mm de ancho. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IB1 (T1b1, N0, M0): la masa cancerosa se puede apreciar a simple vista pero este no logra superar los 4 cm. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IB2 (T1b2, N0, M0): el cáncer se puede ver y mide más de 4 cm. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

-Etapa II (T2, N0, M0): en esta etapa, el cáncer ha crecido más allá del cuello uterino y el útero, pero no se ha propagado a las paredes de la pelvis o a la parte inferior de la vagina.

Etapa IIA (T2a, N0, M0): el cáncer se ha propagado a los tejidos próximos al cuello uterino (Parametrio). Puede que el cáncer haya crecido hacia la parte superior de la vagina. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).



IIA1 (T2a1, N0, M0): la masa cancerosa se puede observar a simple vista, pero no tiene más de 4 cm. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IIA2 (T2a2, N0, M0): la masa cancerosa se puede observar a simple vista y tiene más de 4 centímetros.

IIB (T2b, N0, M0): el cáncer se ha propagado a los tejidos adyacentes al cuello uterino.

-Etapa III (T3, N0, M0): el cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas. El cáncer puede estar bloqueando los uréteres. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IIIA (T3a, N0, M0): el cáncer se ha propagado al tercio inferior de la vagina, pero no a las paredes pélvicas. El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IIIB (T3b, N0, M0; O T1-3, N1, M0): el cáncer ha crecido hacia las paredes de la pelvis y ha bloqueado uno o ambos uréteres provocando una hidronefrosis. El cáncer se propagó a los ganglios linfáticos en la pelvis (N1), pero no a sitios distantes (M0). El tumor puede ser de cualquier tamaño y pudo haberse propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas (T1a T3).

-Etapa IV: ésta es la etapa más avanzada del carcinoma de cérvix. El cáncer se ha propagado a órganos adyacentes o a otras partes del cuerpo.

IVA (T4, N0, M0): el cáncer se propagó a la vejiga o al recto (T4). El cáncer no se propagó a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).

IVB (cualquier T, cualquier N, M1): el cáncer se propagó a órganos distantes más allá del área pélvica, tales como los pulmones o el hígado (ACS, 2016).



## 6. Neoplasia Intraepitelial Cervical

La neoplasia intraepitelial cervical (NIC) se describe como una lesión precursora del cáncer del cuello uterino, la cual se caracteriza por presentar alteraciones de la maduración y anomalías nucleares (Arends *et al.*, 1998). En diferentes estudios se ha demostrado que la NIC evoluciona al estado de carcinoma *in situ* en tan solo 5 años aproximadamente, y para el desarrollo de un cáncer invasor, solo se requieren 10 años (Mercado & Avilés, 2016).

La infección por VPH promueve la formación de la lesión precancerosa conocida como neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Esta infección, parece ser la causa fundamental en el génesis del carcinoma de cérvix (De Palo & Vecchione, 1992; Sarduy, 2008).

En la mayor parte de los carcinomas analizados se encuentra ADN viral integrado en los cromosomas de las células huésped (De Palo *et al.*, 2001). Esta no es la única causa, pero si la principal en el proceso de carcinogénesis (Buckley *et al.*, 1982).

El VPH, en particular, los llamados “de alto riesgo”, son los serotipos 16 y 18, a través de sus oncoproteínas E6 y E7 degradan el p53 supresor tumoral y pRb, favoreciendo la transformación maligna de las células (Muñoz *et al.*, 2003). El VPH es una enfermedad de transmisión sexual que se encuentra muy extendida en mujeres y hombre, sin embargo, las condiciones anatómicas del varón y otros factores hacen que esta se pueda desarrollar en forma subclínica o latente y evolucione en pocas ocasiones a cáncer de pene u otra localización genital. Sin embargo, en la mujer ocurre con mayor frecuencia en la región del cérvix, la vagina, la vulva o el perineo (Sarduy, 2008).



La neoplasia intraepitelial cervical y su vinculación con la infección del VPH precede a la aparición del Carcinoma de Cérvix, por lo que resulta importante detectarla y tratarla para evitar su evolución hacia etapas invasoras (Sarduy, 2008).

## 7. Carcinoma de Cérvix

El CaCe es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado y la tercera causa de muerte por cáncer entre las mujeres en los países menos desarrollados. Se han diagnosticado alrededor de 527,600 nuevos casos y 265,700 muertes en todo el mundo en el 2012 (Torre *et al.*, 2012).

El CaCe es una de las formas de cáncer más frecuente en mujeres con edades desde los 25 hasta los 50 años, siendo los 35 años la edad con más incidencia (Mercado & Avilés, 2016), y es el cuarto cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo (Siegel *et al.*, 2016). Actualmente es el principal problema de Salud Pública en las mujeres en edad reproductiva (Mercado & Avilés, 2016). El 90% de las muertes por CaCe ocurren en países en desarrollo.

Gracias al desarrollo de la Biología Molecular se ha identificado una estrecha relación entre la infección persistente de algunas cepas del Virus del Papiloma humano (VPH) como factor etiológico del CaCe (Mercado & Avilés, 2016). Esto convierte a la infección por VPH la causa más significativa, ya que se detecta en el 99% de los casos (Trottier & Franco, 2006).

Por otro lado, la introducción de una vacuna específica contra el VPH en la práctica clínica, la incidencia de CaCe está disminuyendo gradualmente (Herrero *et al.*, 2015). A pesar de los avances logrados en la prevención del CaCe, cuando la enfermedad recae o se diagnostica en una etapa tardía, el pronóstico es



extremadamente pobre y es por esto por lo que este tipo de cáncer sigue siendo la causa más frecuente de muerte en mujeres de todo el mundo (Lin *et al.*, 2010).

La infección es extremadamente común en mujeres jóvenes en su primera década de actividad sexual. Se establecen infecciones persistentes y precáncer, generalmente dentro de 5-10 años, de menos del 10% de las nuevas infecciones. El cáncer invasivo surge durante muchos años, incluso décadas, en una minoría de mujeres con precáncer, con un pico o meseta en riesgo a aproximadamente 35-55 años (Schiffman *et al.*, 2007).

Hay cuatro pasos principales en el desarrollo del CaCe, la infección del epitelio metaplásico en la zona de transformación cervical, persistencia viral, progresión del epitelio infectado persistente al precáncer cervical e invasión a través de la membrana basal del epitelio (schiffman *et al.*, 2007).

El CaCe por lo general surge de un anillo de mucosa llamado zona de transformación cervical. El VPH promueve la neoplasia en las zonas de transformación entre los diferentes tipos de epitelio que recubren al cuello uterino, ya sea a las células escamosas que componen al ectocérvix (epitelio escamoso), o a las células glandulares que componen al endocérvix (epitelio Columnar) (Prkin & Bray, 2006) (Figura 6). La posición de la zona de transformación es dinámica, donde el epitelio escamoso estratificado del ectocérvix penetra progresivamente y reemplaza el epitelio glandular del endocérvix (Castle *et al.*, 2006; Jacobson *at al.*, 1999).

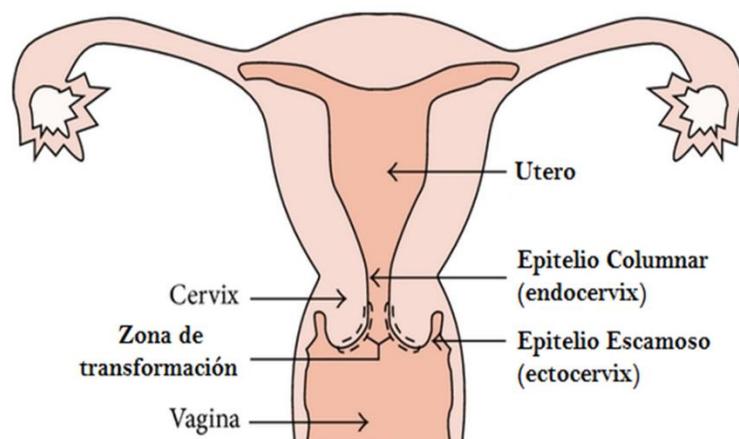


Figura 6. El Carcinoma de Cérvix comienza en las células que recubren la parte inferior del útero llamado cuello uterino, justo en la zona de transformación. (Modificado de Bengtsson & Malm. 2014)

## 8. El cáncer en México

En México, a partir de 1922 a 2001 la mortalidad creció exponencialmente de 0.60 a 13%, ocupando el tercer puesto de en las causas de muerte en este periodo (Fernández, *et al.*, 2011). En 2017, la Secretaría de Salud pública de México, recalcó nuevamente que el cáncer ocupa el tercer puesto de las causas de muerte en el país, en donde 14 de cada 100 habitantes padecen esta enfermedad, con mayor incidencia en Nuevo León y el Distrito Federal (Sosa & García, 2013). Según los reportes del proyecto GLOBOCAN en 2012 de la World Health Organisation, la morbilidad del cáncer en México se distribuye principalmente en: pecho (13.8%), próstata (9.5%), colon-rectal (5.8%), pulmón (5.7%), estómago (5.2%), hígado (4.3%), en una población total de 147,985 personas. El mismo reporte señala que el cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar en morbilidad con un 16.9% de incidencia, y en mortalidad con un 11.9% por cada 6,657,718 mujeres.

La mortalidad por cáncer en México representa el 13% del total de las muertes, ocupando el tercer lugar (Tabla 1) con una tasa de 62.8 por cada 100,000 habitantes; en orden de frecuencia por localización en ambos sexos, se localiza en pulmón y bronquios, estómago, próstata (Sosa & García, 2013).

Diez principales causas de mortalidad en México, 1960-2008

	1960	1970	1980	1990	2000*	2008*
1	Gastroenteritis y colitis	Neumonía e influenza	Accidentes	Enfermedades del corazón	Enfermedades del corazón	Enfermedades del corazón
2	Neumonía e influenza	Enteritis y otras enfermedades diarreicas	Enfermedades infecciosas intestinales	Tumores malignos	Tumores malignos	Diabetes mellitus
3	Enfermedades propias de la infancia	Accidentes, envenenamiento y violencia	Neumonía e influenza	Accidentes	Diabetes mellitus	Tumores malignos
4	Enfermedades del corazón	Enfermedades del corazón	Enfermedades del corazón	Diabetes mellitus	Accidentes	Accidentes
5	Accidentes	Causas perinatales	Tumores malignos	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	Enfermedades del hígado	Enfermedades del hígado
6	Tumores malignos	Tumores malignos	Enfermedades cerebrovasculares	Neumonía e influenza	Enfermedades cerebrovasculares	Enfermedades cerebrovasculares
7	Homicidios	Enfermedades cerebrovasculares	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	Enfermedades infecciosas intestinales	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas
8	Bronquitis	Sarampión	Diabetes mellitus	Enfermedades cerebrovasculares	Neumonía e influenza	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal
9	Tuberculosis	Cirrosis hepática	Homicidio y lesiones infligidas intencionalmente por otras personas	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	Agresiones (homicidios)
10	Cirrosis hepática	Tuberculosis en todas sus formas	Bronquitis crónica y la no especificada, enfisema y asma	Homicidio y lesiones infligidas intencionalmente por otras personas	Agresiones (homicidios)	Neumonía e influenza

Tabla 1. Evolución de las 10 principales causas de mortalidad en México en el periodo comprendido entre el año 1960 y 2008. Modificado de Sosa & García, 2013



## 9. Importancia del Carcinoma de Cérvix

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), determinan que en la década en la que estamos actualmente se espera una incidencia en aumento de cáncer de 22 millones por año, así mismo la mortalidad que será de 13 millones al año (Stewart & Kleihues, 2003).

América Latina y la región del Caribe, se encuentran el segundo puesto de incidencia de cáncer con 242 casos por cada 100 mil habitantes, y en tercer puesto de mortalidad con 101 decesos por cada 100 mil habitantes (Torres *et al.*, 2014). Sin embargo, los datos arrojados por las investigaciones de la World Health Organization en su proyecto Globocan 2012, arrojan que México tiene una menor incidencia con 131 casos por cada 100 mil habitantes y por lo tanto la mortalidad es de 68 por cada 100 mil habitantes.

## 10. Tratamiento contra el cáncer

La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son las principales opciones terapéuticas para tratar el Cáncer en general, siendo la quimioterapia el más ampliamente utilizado como el más importante tratamiento contra el cáncer (Padma, 2015).

La efectividad de estas terapias es limitada, debido a la poca selectividad de estos tratamientos para las células tumorales sobre las normales. Esto resulta en una terapia en donde la dosis del fármaco suele ser insuficiente, además de la toxicidad sistémica y la aparición de células tumorales resistentes a fármacos (Xu & McLeod, 2001).

Uno de los defectos moleculares de estas terapias en las células cancerosas radica en el aumento de la sensibilidad a los agentes terapéuticos y esto puede conllevar a la resistencia de estos. La muerte celular inducida por el daño al ADN



resulta en una muerte celular por apoptosis, por lo que las células cancerosas que albergan defectos en su programa normal de muerte celular en ocasiones pueden escapar de los efectos de la terapia citotóxica (Alberts *et al.*, 2002).

Las células cancerígenas varían en su respuesta a la radiación y a los diferentes tipos de fármacos citotóxicos, y es probable que esta diferencia se vea reflejada en los defectos particulares que están presentes en la reparación del ADN, los puntos de control del ciclo celular y las vías de apoptosis.

La inestabilidad genética en si misma puede ser tanto un punto negativo como positivo para la terapia contra el cáncer, la inestabilidad genética también puede dificultar la erradicación del cáncer. La tasa de mutación anormalmente alta de las muchas células cancerígenas conlleva a una heterogeneidad alta en la población en diferentes aspectos, lo cual dificulta la erradicación de la enfermedad con un único tratamiento. Además, esta alta variedad genética permite que las células cancerosas desarrollen resistencia a los fármacos terapéuticos a un ritmo acelerado (Alberts *et al.*, 2002)

## **11. Alternativas terapéuticas, Inmunoterapia**

Gracias a la continua investigación en la biología molecular de las células cancerosas y la progresión tumoral, se están desarrollando mejores métodos para tratar esta enfermedad, ya no solo atacando los defectos en el ciclo celular y los procesos de reparación del ADN (Alberts *et al.*, 2002).

En los últimos años, se ha sugerido una gran variedad de nuevas formas de atacar a las células tumorales, muchas de las cuales han demostrado funcionar en sistemas modelos, reduciendo o previniendo el crecimiento tumoral. Muchos de estos protocolos aún no pueden tener un uso clínico, debido a que no



funcionan en humanos debido a los numerosos efectos secundarios negativos o simplemente son complicados de implementar (Alberts *et al.*, 2002).

Algunas de estas terapias alternativas, son la terapia hormonal, la cual consiste en el uso de inhibidores hormonales (inhibidores de la aromatasas, análogos de LHRH) para tratar al cáncer, aprovechando la característica de ciertos tipos de cáncer que dependen de algunas hormonas, como es el caso del Cáncer de Mama. Otras de las estrategias empleadas, es el uso de inhibidores de crecimiento, ya que se ha descubierto que la presencia de niveles anormales de factores de crecimiento contribuye a la formación de las células cancerígenas (Sudhakar, 2009).

Existen diferentes alternativas para tratar al Cáncer, pero la que destaca de estas, es la Inmunoterapia, la cual consisten en el uso de agentes biológicos que imitan algunas de las señales naturales que el cuerpo usa para controlar el crecimiento del tumor. Estos agentes biológicos naturales ahora se pueden producir en un laboratorio, en los que se incluyen, interferones, interleucinas, citocinas, angiainhibidores endógenos y antígenos (Sudhakar, 2009).

Las citocinas que se liberan en respuesta a la infección, la inflamación y la inmunidad pueden funcionar para inhibir el desarrollo y la progresión del tumor. Alternativamente, las células cancerosas pueden responder a citocinas derivadas del huésped que promueven el crecimiento, atenúan la apoptosis y facilitan la invasión y metástasis (Dranoff, 2004).

Investigaciones recientes sobre la relación entre el sistema inmune y el cáncer han esclarecido los mecanismos moleculares mediante los cuales las células cancerosas aprovecha algunos mecanismos de los linfocitos T, con función inhibitoria de la respuesta citotóxica, para defenderse del ataque del sistema inmune desarrollado frente a estas (Messerschmidt, *et al.*, 2016).



En la inmunoterapia el CaCe desempeña un papel aún más importante que en otros tumores malignos, en primer lugar, por la restauración de la respuesta inmune contra las células cancerosas, ya que tal vez sea una estrategia exitosa para detener el crecimiento del cáncer, y, en segundo lugar, en las anormalidades precancerosas y los tumores tempranos, se mejore la reacción inmune contra el VPH, resultando en la inhibición de la progresión del cáncer (Liao, 2016; Lee *et al.*, 2016).

## 12. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas que son producidas por diferentes tipos de células reguladoras de la respuesta inmune, respuesta inflamatoria, e intervienen como factores de crecimiento de las células hematopoyéticas. Estas citocinas se clasifican en interleucinas (IL), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (INF), los factores estimuladores de colonias (CSF) y las quimiocinas.

## 13. Interleucina 2 (IL-2)

LA IL-2 es una citocina que promueve la proliferación de células linfocíticas T, siendo sintetizada por estas células principalmente. Esta citocina ejerce su acción biológica a través de su receptor de membrana específico constituido por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  a través de la vía de señalización JAK/STAT para estimular el crecimiento y la proliferación de linfocitos T y células B (Figura 7) (Filella *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2011). La citocina IL-2 contribuye en la generación y propagación de la respuesta inmune del antígeno. Por lo que esta citocina es estudiada ampliamente para aplicaciones clínicas, tales como las terapias contra el cáncer, síndromes de inmunodeficiencia y para tratar el rechazo de implantes (Ali *et al.*, 2009).

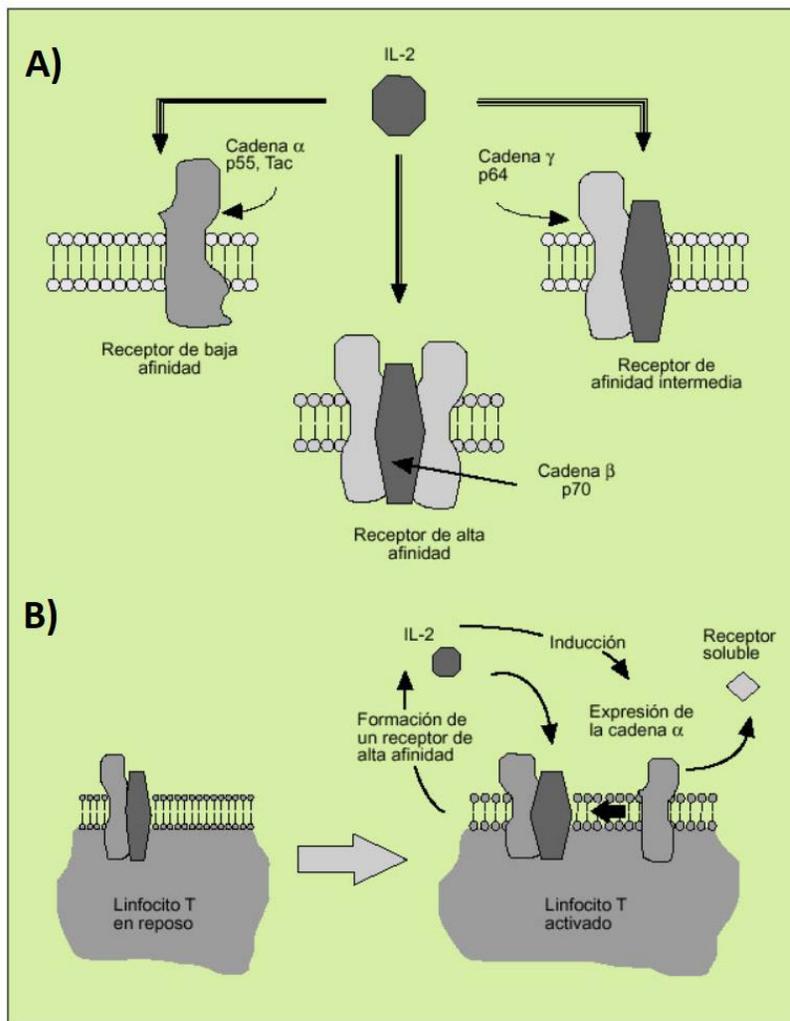


Figura 7. A: Receptor de membrana de la IL-2; B) Activación de linfocitos T por IL-2. Modificado de Filella *et al.*, 2002.



## 14. Apoptosis

Las células de los organismos multicelulares están ampliamente reguladas para garantizar un equilibrio homeostático para que estas funcionen de manera óptima. Esta regulación por lo general es a través de la proliferación y la apoptosis. La muerte celular programada o apoptosis, se caracteriza como un elemento crítico en la eliminación de células después de la exposición de estas a compuestos tóxicos, en determinados eventos durante el desarrollo embrionario y como síntoma en algunos trastornos degenerativos (Ashe & Berry, 2003).

Los eventos bioquímicos apoptóticos conducen a cambios morfológicos y bioquímicos celulares, con el fin de tener una respuesta controlada y no obtener una respuesta inflamatoria dañina. Entre estos cambios se encuentran, la reducción del tamaño celular, la apertura de las mitocondrias y la salida del citocromo c, la formación de ampollas en la superficie celular, la degradación de la cromatina (ADN y proteínas) del núcleo, formación de cuerpos apoptóticos, el fosfolípido fosfatidilserina que se encuentra en la cara interna de la membrana se expone en la superficie, la fosfatidilserina se une al receptor de células fagocíticas. Los mecanismos necesarios para que se lleve a cabo la apoptosis implica vías de señalización de gran complejidad que se encuentran reguladas principalmente por las proteasas llamadas caspasas (Porrás & Marzo, 2010; Cascales, 2003)

## 15. Vía Intrínseca

La vía de muerte celular intrínseca inicia como resultado de una alteración de la homeostasis intracelular. En esta vía, también denominada mitocondrial, es fundamental para la ejecución de la muerte celular, por lo que en ocasiones a esta vía se le denomina también vía de muerte celular mitocondrial (Elmore, 2007).



La vía de señalización intrínseca implica una amplia gama de estímulos iniciados por las mitocondrias produciendo señales intracelulares que actúan directamente sobre objetivos dentro de la célula. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares que causan cambios en la membrana mitocondrial interna que da como resultado una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, la pérdida del potencial mitocondrial y la liberación de grupos de proteínas proapoptóticas (Saelens *et al.*, 2004), entre las cuales se encuentra el citocromo C, que se une y activa a Apaf-1 y a caspasa 9, formando el apoptosoma (Hill *et al.*, 2004). La formación de este agrupamiento resulta en la activación de caspasa 9 y así se da inicio la vía dependiente de caspasas (Figura 8).

La regulación de los eventos apoptóticos mitocondriales se da gracias a los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 y esta a su vez, es regulada por la proteína supresora de tumores p53. (Schuler & Green, 2001).

## 16. Vía extrínseca

La vía de señalización extrínseca inicia por la interacción mediada por receptores transmembranales denominados receptores de muerte con su ligando. Estos receptores son miembros de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Los miembros de esta superfamilia comparten dominios extracelulares ricos en cisteína con un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos que forman el dominio de muerte (Locksley *et al.*, 2001).

Los ligandos y receptores mejor caracterizados y que mejor definen el modelo extrínseco de señalización son FasL/FasR y TNF $\alpha$ /TNFR1. La unión del ligando Fas al receptor Fas da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD, la cual se asocia con caspasa 8 por la dimerización del dominio efector de muerte



formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), resultando en la activación autocatalítica de caspasa 8 (Wajant, 2002). Cuando caspasa 8 se encuentra activa, se desencadena la fase de ejecución apoptosis, en donde se da lugar a la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Figura 8).

A pesar de los diferentes mecanismos de iniciación de estas vías, ambas convergen para dar lugar finalmente a alteraciones morfológicas y bioquímicas celulares características de la apoptosis. Además de la convergencia final, también es evidente que existe una relación cruzada considerable entre las rutas de señalización, siendo así que las células tienen un cierto grado de redundancia en sus vías apoptóticas (Ashe & Berry, 2003; Igney and Krammer, 2002). El ejemplo más estudiado de esta convergencia es en el que la vía de Fas a través de caspasa 8 activa, escinde a BID y su fragmento C terminal (tBID) actúa sobre la mitocondria para facilitar la salida del citocromo C (Figura 8) (Yang *et al.*, 1997).

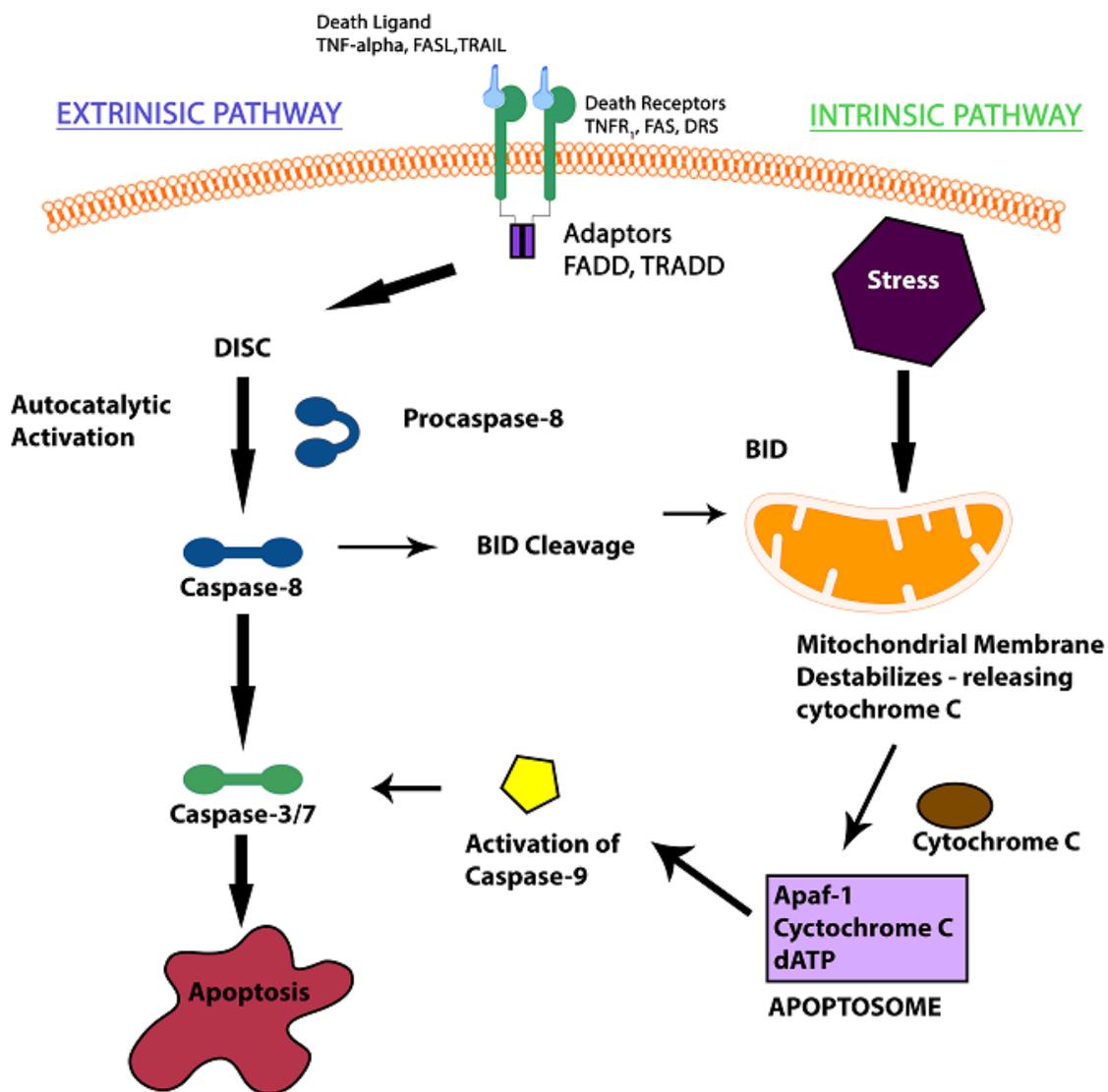


Figura 8. Modelo clásico de la vía de señalización apoptótica extrínseca e intrínseca. Tomado de Elmore 2007.



## 17. Fase de ejecución de la apoptosis

Las vías intrínseca y extrínseca culminan en la activación de las caspasas efectoras, las cuales tienen como papel principal la activación de la endonucleasa citoplasmática que degrada el material nuclear, y las proteasas que degradan las proteínas nucleares y citoesqueléticas. Las caspasas efectoras 3, 6 y 7 escinden varios sustratos que causan la morfología y los cambios bioquímicos observados en células apoptóticas (Slee *et al.*, 2001).

Caspasa 3 se considera la más importante de las caspasas efectoras, esta es capaz de ser activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa 8, 9 y 10)

## 18. Caspasas

Las caspasas son proteasas específicas de cisteína-aspartato, son una familia de proteínas intracelulares involucradas en el inicio y la ejecución de la apoptosis. La activación de las caspasas de ejecución a menudo se denomina como un punto sin retorno que conduce a apoptosis. En la actualidad, se ha identificado al menos 14 caspasas en mamíferos, de las cuales se conoce que ciertas caspasas desempeñan papeles importantes en la apoptosis y la inflamación.

Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos denominados como procaspasas, que luego se procesan proteolíticamente en residuos críticos de aspartato, para obtener sus formas activas. Todas las procaspasas contienen un dominio de proteasa altamente homóloga en su amino (NH<sub>2</sub>) terminal. El dominio proteasa (prodominio) contiene dos subunidades de aproximadamente 20 y 10 kDa respectivamente (Figura 9), que se asocian para formar un heterodímero después de la escisión proteolítica del prodominio. La caspasa en su forma activa consta de dos heterodímeros que se asocian para formar un tetradímero (Walker *et al.*, 1994).

El dominio terminal NH<sub>2</sub> es de longitud variable dependiente de la categoría funcional de la caspasa. Las caspasas iniciadoras e inflamatorias poseen productos largos de más de 100 aminoácidos, mientras que las caspasas efectoras tienen productos cortos de menos de 30 aminoácidos. Los prodominios contienen un elemento conservado en la secuencia de aminoácidos o motivo, esencial para la actividad de la caspasa. Estos motivos pueden ser dominios efectores de muerte (DED) como en caspasa 8 y 10, o dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) como en las caspasas 1,2,4,5,9,11,12,13 y 14 (Figura 9) (Ashe & Berry, 2003; Troy *et al.*, 2011). Estos dominios median las interacciones entre las caspasas y una variedad de moléculas adaptadoras implicadas en la señalización celular.

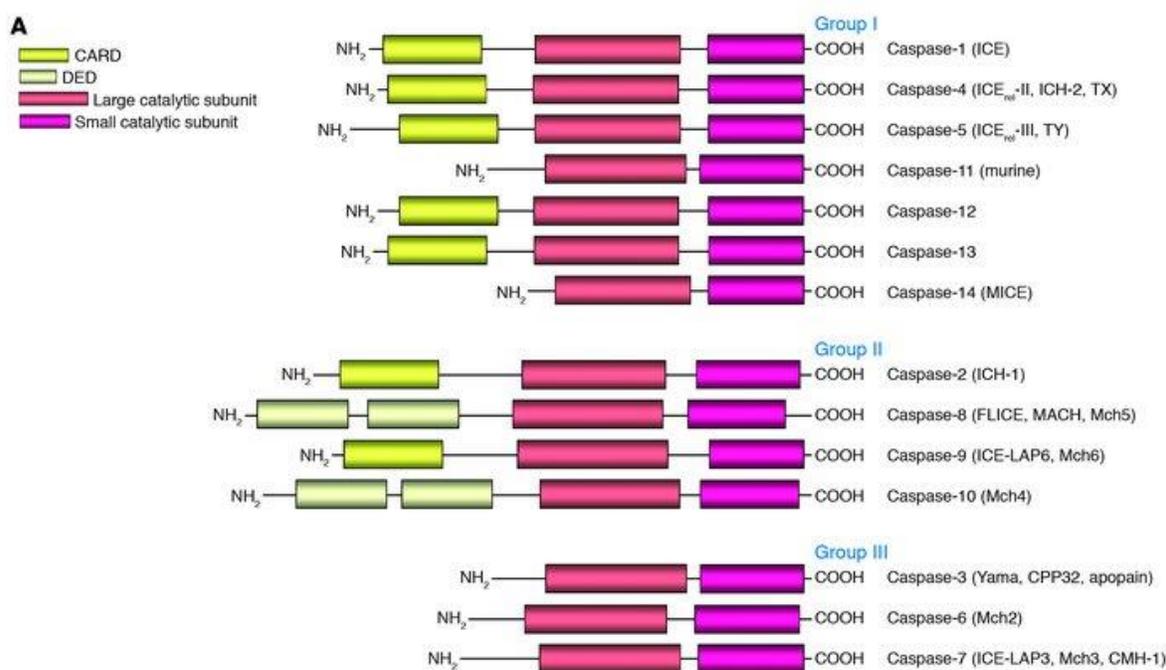


Figura 9. Estructura de las caspasas (A) Grupo I: caspasas inflamatorias; grupo II: caspasas iniciadoras; grupo III: caspasas efectoras. Subunidades catalíticas CARD, DED, subunidad grande (p20) y pequeña (p10). Tomado de Lavrik *et al.*, 2005.



La inducción de la apoptosis a través de mecanismos de muerte intrínsecos o extrínsecos, dan como resultado la activación de las caspasas iniciadoras. Los receptores de muerte a través de moléculas adaptadoras es que se reclutan las caspasas iniciadoras 2, 8 o 10, mientras que la señalización de muerte intrínseca da como resultado la activación de caspasa 9. La activación de las caspasas iniciadoras es el primer paso que se da en la vía proteolítica altamente regulada.

Las caspasas iniciadoras pueden escindir procaspasas y, por lo tanto, pueden activar por proteólisis a las caspasas efectoras como la 3, 6 y 7. Las caspasas efectoras son comunes tanto a las vías de muerte extrínseca como intrínseca, y, por lo tanto, son los principales rasgos bioquímicos de la apoptosis (Chang & Yang, 2000). Por ejemplo, la caspasa 8 en la vía de señalización extrínseca, activa proteolíticamente a caspasa 3 y 7, además es capaz de activar la vía mitocondrial y por consecuencia a caspasas 9, la cual activa las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Cascales, 2003)

A través del procesamiento proteolítico, las caspasas activan o inhiben proteínas diana que exhiben papeles en el mantenimiento de la morfología celular, muerte celular, metabolismo, regulación del ciclo celular y en la transducción de señales (Cardone *et al.*, 1997). La especificidad de las caspasas para estos objetivos da como resultado una eliminación altamente controlada y eficiente de las células dañadas o no deseadas.

De forma general, las caspasas con productos largos se someten a dimerización con un cambio estructural que proporciona la formación de un sitio activo (Pop & Salvese, 2009). La mayoría de las caspasas iniciadoras existen como monómeros en forma de zimógeno, por lo que se necesitan de la interacción de la proteína adaptadora específica con el prodominio para formar un dímero y activarse. Ya activo el zimógeno, hay una proteólisis limitada del interdominio (Troy *et al.*, 2011). La activación de las caspasas efectoras depende de la escisión en un

residuo de aspartato situada en el enlace de las subunidades (Figura 10.) (Boatright & Salvesen, 2003).

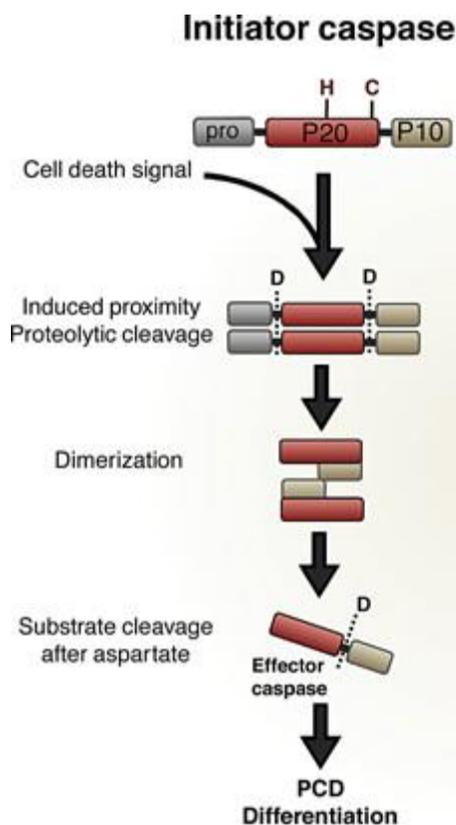


Figura 10. La caspasa iniciadora consta de un prodominio N-terminal y un dominio de caspasa que consiste en dos subunidades, p20 y p10, con la díada His-Cys conservada localizada en el dominio p20. La activación de las caspasas iniciadoras requiere la escisión proteolítica después de dos residuos de aspartato diferentes, por lo tanto, separa las dos subunidades y elimina el prodominio, seguido por la dimerización de dos subunidades p20 y dos subunidades p10, formando la caspasa iniciadora completamente activada. Las caspasas iniciadoras activan las caspasas efectoras mediante escisión dirigida por aspartato, y las caspasas efectoras conducen a la muerte celular. Modificado de Hill & Nyström 2015



## 19. Camptotecina

La camptotecina fue aislada por primera vez en 1963 por Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani de un árbol de origen asiático *Camptotheca acuminata* (Wall *et al.*, 1966). Después de ser sometida a procesos de extracción y purificación, mostró tener actividad antitumoral sobre la línea celular L1210 de leucemia, pero no fue hasta 1985 que se dilucidó su mecanismo de acción de este alcaloide sobre la Topoisomerasa I como blanco de acción en su actividad farmacológica (Hsiang *et al.*, 1989).

Las Topoisomerasas son enzimas isomerasas que regulan la topología de ADN mediante la ruptura, relajación y reensamble de las hebras siendo una de las enzimas esenciales en la replicación del ADN. En específico la Topoisomerasa I (Topo I) corta una de las dos hebras de la doble hélice mediante la formación de un enlace fosforosil, permitiendo que un bucle de la hebra intacta pase a través de la hendidura resultante por la fractura, donde posteriormente la formación del intermedio covalente, enzima-ADN, conserva la energía libre del enlace fosfodiéster roto, por lo que no se necesita ATP libre para reparar la rotura en el ADN (Champoux, 2001; Devlin, 2006).

La actividad citotóxica de la camptotecina se debe a la formación de un complejo no covalente y reversible formado por la Topo I y el ADN llamado complejo ternario (Topo I-ADN-Camptotecina) (Pommier *et al.*, 1994), en donde la camptotecina se une y estabiliza el estado de transición, en el punto en que el grupo hidroxilo de la tirosina 723 de la Topo I se une covalentemente al ADN a través de su grupo fosfodiéster causando la ruptura de la hebra y formando el intermedio fosfortirosina, llamado complejo binario covalente (Figura 11) (Rodríguez, 2016). La formación de este complejo ternario entre camptotecina resulta en la disminución de los porcentajes de religación de la doble hélice del ADN y por último la falta de la síntesis del ADN concluye en la muerte de la célula blanco (Hsiang *et al.*, 1989).

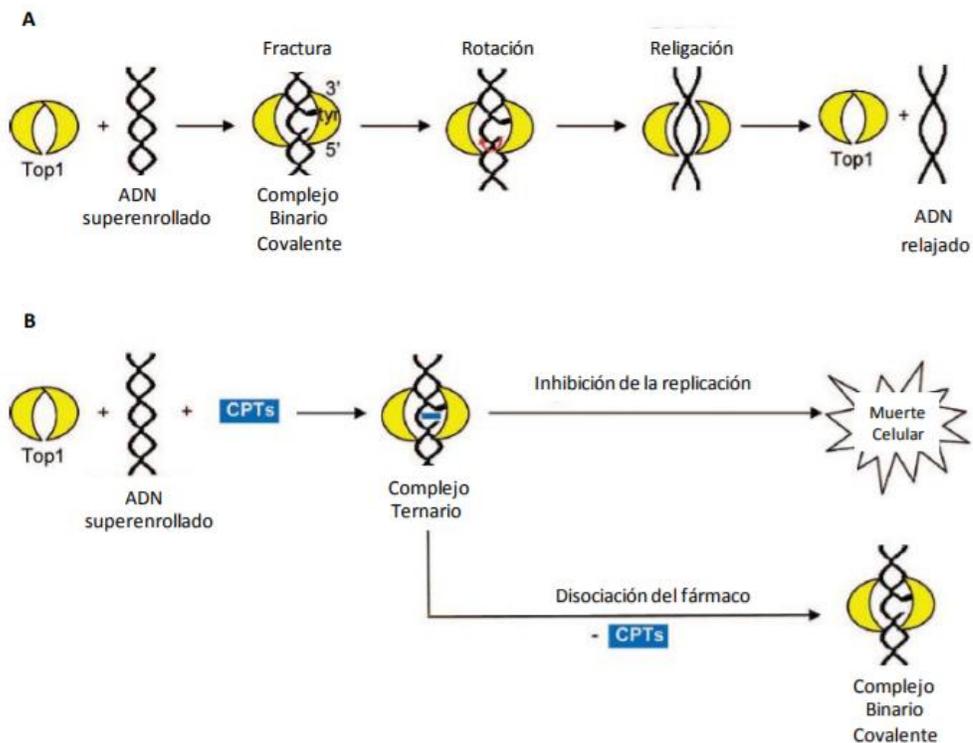


Figura 11. A) Proceso de relajación de ADN superenrollado por Topo 1; b) Modo de acción de la camptotecina; en ausencia del fármaco el enlace fosfodiéster es reparado por la relajación y la liberación de Topo I. Tomado de (Rodríguez, 2016).

#### IV. Antecedentes

En el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ FES, Zaragoza se ha empleado la citocina IL-2 como modelo de estudio para el tratamiento de CaCe debido a la importancia clínica de este tumor y su alta incidencia en países en vías de desarrollo como México.

Entre los hallazgos del grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular se encuentran: la confirmación de la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas celulares de CaCe INBL y CALO, establecidas en el Laboratorio de Oncología Celular a partir de biopsias provenientes de pacientes mexicanas (Rocha et al., 2004); el receptor IL-2R está presente en las células de CaCe y tiene una función que depende de la concentración de IL-2 utilizada (Rangel et al., 1998), 10 UI/ml induce a la proliferación y



100 UI/ml provoca la muerte en células CALO e INBL (Alvarado, 1997; Rangel et al., 1998); 100 UI/ml de IL-2 induce un aumento en la expresión del ARNm para caspasa 8 (Sierra, 2011), aumenta la expresión del ARNm para caspasa 9 (Martínez, 2011), aumenta la presencia de caspasa 3 activa en diferentes líneas de CaCe (Torres, 2012), aumenta de forma considerable el ARNm de BiDt en INBL (Masse, 2013), aumenta el ARNm para Citocromo C y su liberación medio citoplasmático (Del Río, 2013).

Estos reportes proporcionan evidencias de que la muerte inducida por 100 UI/ml de IL-2, en las células de CaCe, es a través de apoptosis. Sin embargo, para esclarecer este proceso, es importante analizar la participación de las caspasas efectoras 6 y 7 en la muerte por apoptosis observada en células de CaCe.

Particularmente, en este trabajo, se empleó el fármaco camptotecina, por sus antecedentes como agente citotóxico, donde se ha demostrado que induce apoptosis en la línea celular SiHa y HeLa de CaCe a través de la activación de caspasa 3 entre otras moléculas proapoptóticas (Sang et al., 2009; Zeng et al., 2012; Zare et al., 2012), por esta razón es que el fármaco es ideal como control positivo para evaluar apoptosis en la línea celular INBL.

## **V. Justificación**

La detección del cáncer de manera oportuna y en estadios poco avanzados, representa hasta ahora la mejor oportunidad para las pacientes de sobrevivir frente a este agravado problema.

Sin embargo, para las pacientes con estadios más avanzados, es muy difícil lograr una recuperación total evitando fuertes repercusiones sobre la salud. Es por este motivo que es necesario desarrollar nuevas terapias alternativas, con las cuales se propone el uso de citocinas.

Con respecto a ello, en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer se han obtenido resultados



favorables respecto a la proliferación de las líneas celulares de carcinoma de cérvix. Se ha determinado que 100 UI de IL-2 induce la muerte celular a través de la vía apoptótica a través de la inducción de la activación de caspasas efectoras por un mecanismo aún no esclarecido, en donde caspasa 3 es la molécula más importante en este proceso, pero no la única.

Es por esto que el objetivo del presente trabajo es determinar si la vía apoptótica inducida por las altas dosis de IL-2 en la línea celular de CaCe INBL es sólo y exclusivamente regulada por caspasa 3.

## **VI.Hipótesis**

Se ha comprobado que 100 UI/ml de IL-2 exógena induce la muerte celular por apoptosis de las células de la línea de CaCe INBL regulando positivamente diferentes moléculas proapoptóticas como las caspasas efectoras 3, 6 y 7. Por tanto si cultivamos las células de la línea INBL en presencia de 100 UI/ml de IL-2, y un inhibidor específico de caspasa 3, se reducirá la expresión de caspasa 6 y 7.

## **VII.Objetivos**

General:

- Contribuir a esclarecer el papel de IL-2 en la inducción de caspasa 3, 6 y 7 en células de CaCe. Así como proporcionar información para detallar los mecanismos moleculares de la vía apoptótica para inducir la muerte de células de la línea de CaCe INBL.



Particulares:

- Realizar cultivo celular de la línea de CaCe, INBL, en presencia de IL-2 o camptotecina.
- Realizar cultivo celular de la línea de CaCe INBL en presencia del inhibidor específico de caspasa 3 (Z-DEVD-fmk) e IL-2 o camptotecina.
- Determinar la presencia de caspasa 3, 6 y 7 por citometría de flujo, en células de la línea de CaCe INBL estimuladas con IL-2 o camptotecina cultivadas por 24 horas.
- Determinar la presencia de caspasa 3, 6 y 7 por citometría de flujo, en células de la línea de CaCe INBL estimuladas con IL-2 e inhibidor Z-DEVD-FMK cultivadas por 24 horas.
- Determinar la presencia de caspasa 3, 6 y 7 por Citometría de flujo, en células de la línea de CaCe INBL estimuladas con Camptotecina e inhibidor Z-DEVD-FMK cultivadas por 24 horas.
- Determinar cambios en la simetría por la presencia de Fosfatidilserina a través de la técnica de Anexina V de citometría de flujo en la línea celular INBL después de ser cultivadas en presencia de IL-2 o Camptotecina.
- Determinar cambios en la simetría por la presencia de Fosfatidilserina a través de la técnica de Anexina V de citometría de flujo en la línea celular INBL después de ser cultivadas en presencia de IL-2 e inhibidor Z-DEVD-fmk.
- Determinar cambios en la simetría por la presencia de Fosfatidilserina a través de la técnica de Anexina V de citometría de flujo en la línea celular INBL después de ser cultivadas en presencia de Camptotecina e inhibidor Z-DEVD-fmk



## VIII.Procedimiento

### Material Biológico

El material biológico empleado, consistió en la línea celular de CaCe: INBL (Carcinoma epidermoide metastásico, estadio clínico IV B, positivo a VPH 18), las cuales fueron obtenidas del banco de criopreservación de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

### Condiciones de Cultivo y Proliferación Celular

La línea celular INBL, se cultivó en medio RPMI-1640 (Microlab), suplementado al 10% con suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones constantes a 37°C de temperatura, con un pH de 7.0-7.5, con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora (Form Scientific EE. UU.).

La línea celular se cultivó en cajas Petri de 75cm<sup>3</sup> (Corning) hasta alcanzar una proliferación no mayor al 80% para asegura el uso de estas cuanto estén en su fase exponencial de crecimiento. Las células por sus propiedades adherentes fueron recuperadas del sustrato adicionando 8ml de solución de Verseno (consultar Anexo) por 5 minutos en la incubadora, posteriormente se transfirieron a tubos cónicos de centrifugación de 15ml (Corning), y se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos en una centrífuga clínica (BIOHAZARD) para recuperar el botón celular por decantación, este se resuspendió en 1 ml de medio RPMI-1640. Se evaluó la viabilidad celular por exclusión con Azul Tripano (SIGMA) en una cámara Neubauer, además de determinar el volumen necesario para obtener 1x10<sup>6</sup> de células para cada condición a evaluar por Citometría de flujo.



Las células fueron transferidas a cajas Petri de 60mm x 15mm tratadas para cultivo en monocapa (Corning) con medio RPMI-1640 en ausencia de SFB, incubadas durante 24 horas, con el fin de arrestar la población celular en la fase G<sub>0</sub>.

### Tratamiento celular

Los ensayos experimentales en total consistieron en 4 variables. La primera variable partió de  $1 \times 10^6$  células, estas fueron cultivadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2 recombinante Humana (IL-2) (R&D system). La segunda variable partió de  $1 \times 10^6$  células, las cuales fueron cultivadas en presencia de 20  $\mu$ M de Z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa 3 Activa) por 30 minutos, posteriormente, se adicionó por 24 horas 100 UI/ml de IL-2 (R&D system). La tercera variable partió de  $1 \times 10^6$  células, estas fueron cultivadas en presencia de 5  $\mu$ g/ml de camptotecina por 24 horas. La cuarta y última variable partió de  $1 \times 10^6$  células, las cuales fueron cultivadas en presencia de 20  $\mu$ M de Z-DEVD-fmk por 30 minutos, posteriormente, se adicionó por 24 horas 5  $\mu$ g/ml de camptotecina. Estas cuatro variables se realizaron por triplicado para poder analizar tres caspasas diferentes.

Los tiempos de estímulo de estos ensayos se establecieron gracias a trabajos previos, donde se demuestra que la línea celular INBL, al ser estimulada a 24 horas con 100 UI/ml de IL-2, se induce la activación de las vías de señalización de las caspasas efectoras (Torres, 2012).

### Citometría de flujo, determinación de caspasas efectoras

Las células fueron separadas de su sustrato adicionando Verseno y colocándolas en tubos de 15ml, posteriormente fueron centrifugadas a 1,500 rpm durante 5



minutos. Se descartó la fase acuosa quedando solo el botón celular, al que se le adiciono 500µl de Etanol al 70% filtrado para permear y fijar las células. Una vez fijadas las células, se adiciono 1ml de PBS a cada tubo y se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos. Se descartó la fase acuosa, y al botón celular se le adiciono 100µl de Anticuerpo Primario Anti caspasa 3 Activa (Sigma) en una concentración 1:1000 con PBS.

El mismo procedimiento se realizó, pero con los Anticuerpos primarios Anti caspasa 6 Activa (GeneTex) en una concentración 1:25 con PBS, y Anti caspasa 7 Activa (GeneTex) en una concentración 1:25 con PBS. Una vez colocado el anticuerpo primario se incubó en refrigeración por 24 horas.

Una vez concluido el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se adicionó 1ml de PBS y se centrifugó a 1,500 rpm con el fin de lavar las células y eliminar el exceso de anticuerpo. Este último paso se repitió 2 veces. Una vez lavadas las células, se adicionó a todos los tubos 100µl de anticuerpo secundario Anti Igg conjugado con FIT-C en una concentración 2:1000 en PBS. Las muestras fueron incubadas por un periodo de 45 minutos dentro de la incubadora a 37°C.

Concluido el tiempo de incubación, se lavaron las muestras 3 veces con PBS como se describió anteriormente adicionando 500µl de PBS filtrado al final. Las células fueron transferidas a celdas facs para citometría (Falcon).

Las muestras fueron evaluadas en un citómetro de Flujo "FacsAria II" (BD) en donde fueron adquiridos  $1 \times 10^4$  eventos por cada muestra. Los datos adquiridos fueron analizados con el software Flowing Software.



### Citometría de Flujo, Determinación de Apoptosis por Anexina V

Utilizando las cuatro variables descritas anteriormente, junto con las condiciones descritas anteriormente, una vez terminados los plazos de estímulo con IL-2, IL-2 e inhibidor, camptotecina y camptotecina e inhibidor, se recuperó el medio usado de los cultivos para así obtener las células muertas en tubos de centrifuga de 15ml, posteriormente se despegaron las células del sustrato adicionando Verseno y colocando el resuspendido en sus respectivos tubos junto al medio recuperado, se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 minutos. Ya centrifugadas las células, se descartó la fase acuosa quedando solo el botón celular. Se adicionó 200µl de Anexina V conjugado con FIT-C (Santa Cruz Biotechnology) en una concentración 1:200 de PBS durante 35 minutos. Después, las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS, para finalmente adicionar 500µl de PBS y ser transferidas a tubos facs para citometría.

Se adquirieron  $1 \times 10^4$  eventos en el citómetro y posteriormente, los datos fueron analizados con el software Flowing Software.



## IX.Resultados

### Determinación de Caspasa 3, 6 y 7 Activas

Con el objetivo de analizar el efecto de la IL-2 exógena sobre la regulación de la expresión de caspasa 3, 6 y 7 activas en la línea celular de carcinoma de cérvix (CaCe) INBL; se realizaron cultivos por 24 horas de células INBL en presencia de IL-2 e IL-2 más el inhibidor específico de caspasa 3 activa (Z-DEVD-fmk).

En cada experimento se utilizó camptotecina como control positivo a apoptosis, obteniendo en cada determinación una referencia para comparar el número de células positivas obtenidas cuando se cultivó con IL-2 e IL-2 + Z-DEVD-fmk. En otras palabras, el número de células positivas obtenidas con Camptotecina nos indica que las células están sintetizando caspasa 3,6 y 7 activa, además de mostrar una pérdida de la simetría de la membrana celular. El control negativo en cada experimento consistió en células cultivadas con medio RPMI 1640 y suero fetal bovino.

Los experimentos se realizaron por triplicado, y los histogramas presentados, fueron tomados de un solo experimento representativo. No se realizó un análisis estadístico, solo se compararon los promedios del número de células positivas mayores al estado basal.

### Presencia de caspasa 3 activa en células de la línea INBL

Los resultados obtenidos muestran que, cuando las células de la línea INBL son cultivadas en presencia de camptotecina, se observa un aumento en la expresión de caspasa 3 activa en comparación a las células cultivadas en medio RPMI; mientras que en las células cultivadas con camptotecina + Z-DEVD-fmk existe una disminución importante de las células positivas a caspasa 3 activa. Por otro lado, las células cultivadas en presencia del IL-2, se obtiene un número de células positivas a caspasa 3 activa, semejante al de las células cultivadas con camptotecina, la cual disminuye cuando las células son cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk. (Figura 12).

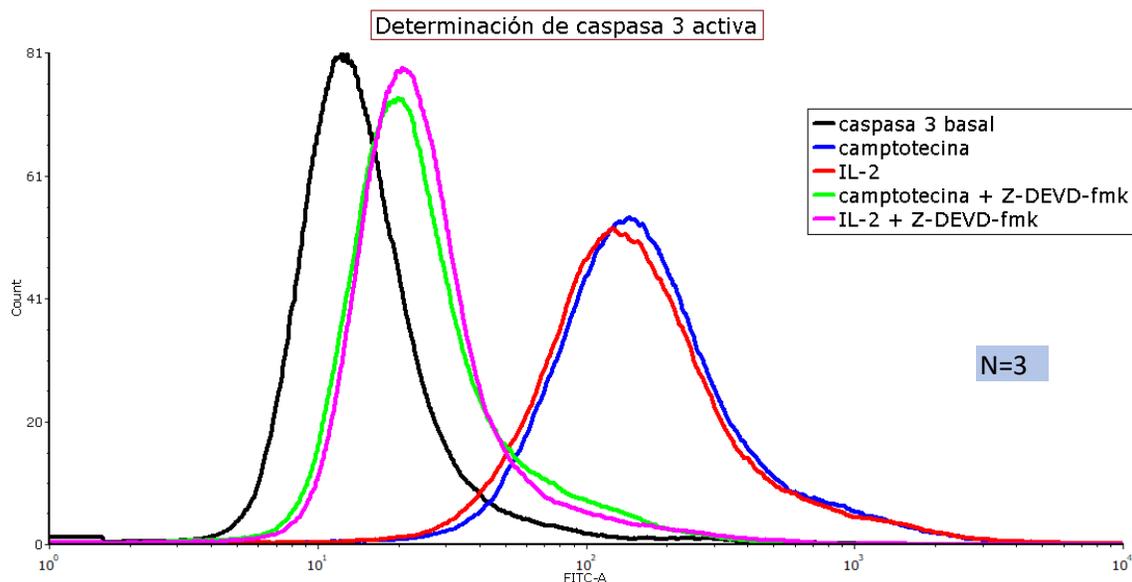


Figura 12. Determinación de caspasa 3 activa en células de la línea INBL cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). Las células cultivadas con camptotecina e IL-2 presentan el mayor número de células positivas a caspasa 3 activa. La reducción de células positivas a caspasa 3 activa es similar en los cultivos con camptotecina + Z-DEVD-fmk e IL-2 + Z-DEVD-fmk.

N: número de experimentos realizados.



Con respecto al porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa después de 24 horas de cultivo en diferentes condiciones, podemos decir que de forma general la presencia de las combinaciones de camptotecina y IL-2 con el inhibidor Z-DEVD-fmk, reduce en 90% las células positivas a caspasa 3 activa. En el caso específico de las células cultivadas en presencia de camptotecina + Z-DEVD-fmk, se observa solo el 10% de células positivas, mientras que para las células cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk tenemos solo el 9% de células positivas (Figura 13).

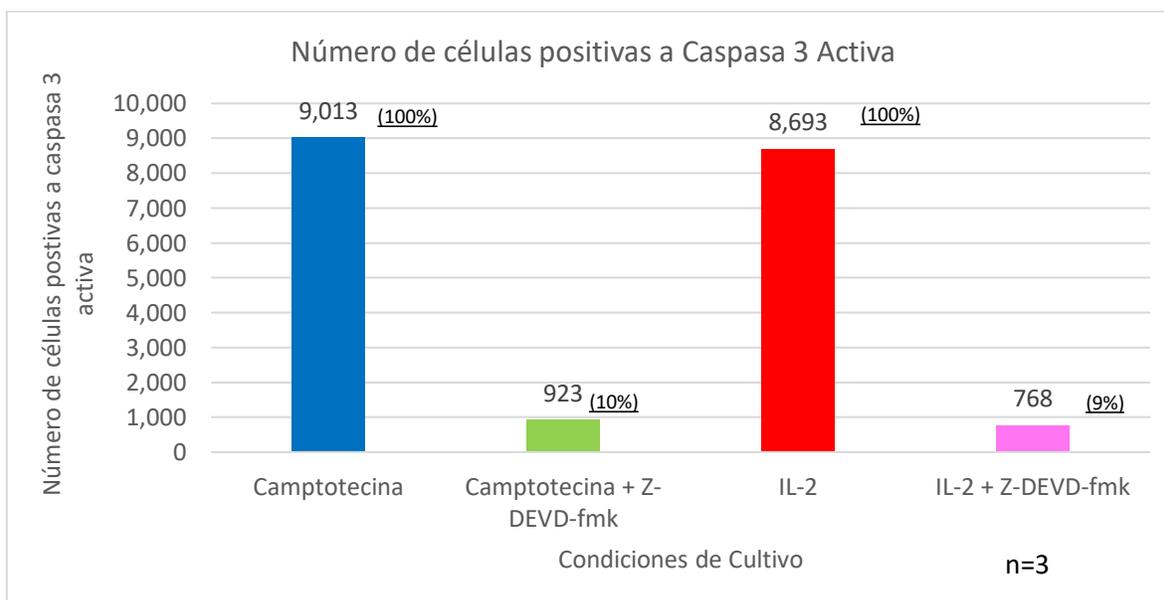


Figura 13. Número de células positivas a caspasa 3 activa cultivada presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). Hay una reducción de células positivas del 90% en las células cultivada con Camptotecina + Z-DEVD-fmk y IL-2 + Z-DEVD-fmk.

### Presencia de Caspasa 6 activa en células de la línea INBL

En cuanto a los resultados obtenidos para la determinación de caspasa 6 activa, se observó que, las células de la línea INBL cultivadas en presencia de camptotecina, muestran un aumento en la expresión de caspasa 6 activa, en comparación a las células

cultivadas en medio RPMI. Por otro lado, en las células cultivadas con camptotecina + Z-DEVD-fmk no existe un cambio aparente en el número de células positivas a caspasa 6 activa. En cuanto a las células cultivadas en presencia de IL-2, se obtuvo un número de células positivas a caspasa 6 activa, menor al de las células cultivadas con camptotecina, el cual no cambia cuando las células son cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk (Figura 14).

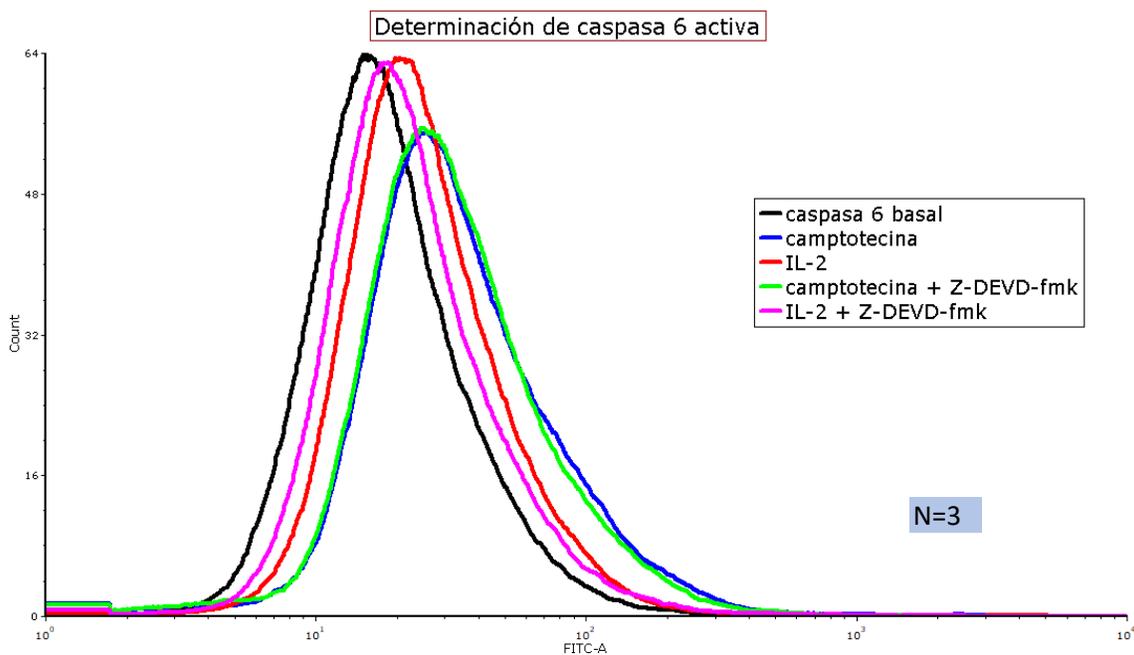


Figura 14. Determinación de caspasa 6 Activa en células de la línea INBL cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). En las diferentes condiciones no se observa un aparente cambio en el número de células positivas a caspasa 6 Activa aun en presencia de Z-DEVD-fmk.

N: número de experimentos realizados

El porcentaje de células positivas a caspasa 6 activa después de 24 horas de cultivo en diferentes condiciones muestran de forma general que camptotecina e IL-2 + Z-DEVD-fmk reduce el porcentaje de células positivas a caspasa 6 activa. En el caso específico de las células cultivadas en presencia de Camptotecina + Z-DEVD-fmk, el número de células

positivas (1,278 células) se redujo en un 14%. En las células cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk, el número de células positivas (467 células) se redujo en un 3% (Figura 15).

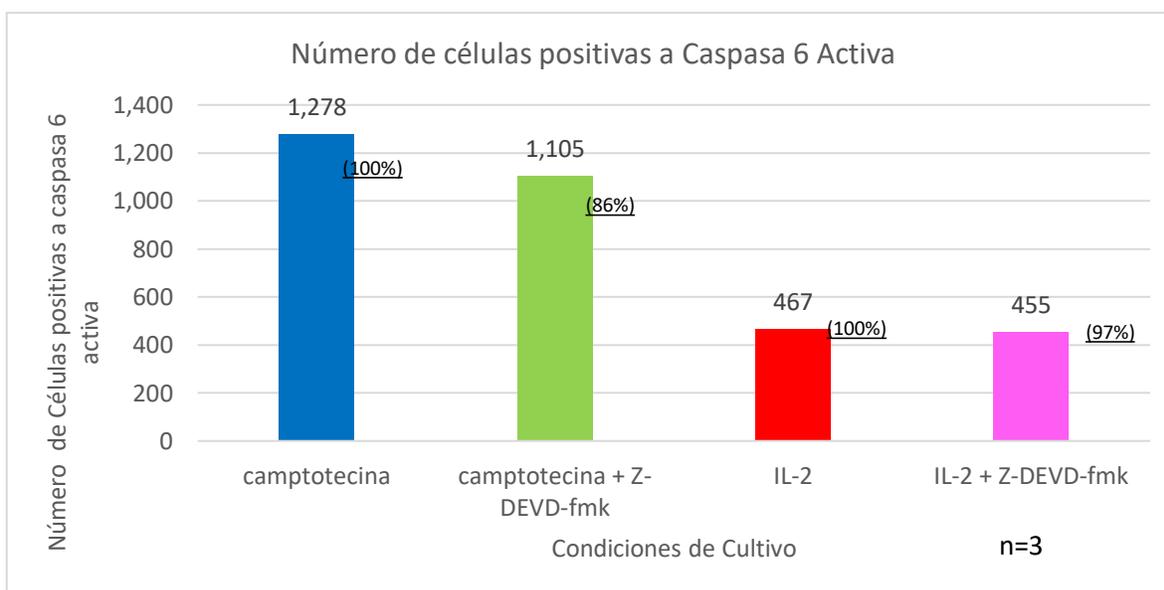


Figura 15. Número de células positivas a caspasa 6 Activa cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). La mayor reducción de células positivas a caspasa 6 Activa se observa en los cultivos con camptotecina + Z-DEVD-fmk, con un 13% de diferencia respecto a las cultivadas con camptotecina.

### Presencia de caspasa 7 activa en células de la línea INBL

En este tercer caso, los resultados obtenidos muestran que, cuando las células de la línea INBL son cultivadas en presencia de camptotecina, se observa un aumento en la expresión de caspasa 7 activa en comparación a las células cultivadas en medio RPMI. Por otro lado, las células cultivadas con camptotecina + Z-DEVD-fmk no exhiben un cambio significativo del número de células positivas a caspasa 7 activa. En cuanto a las

células cultivadas en presencia de IL-2, se obtuvo un mayor número de células positivas a caspasa 7 activa, en comparación a las células cultivadas con camptotecina, la cual sigue constante cuando las células son cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk (Figura 16).

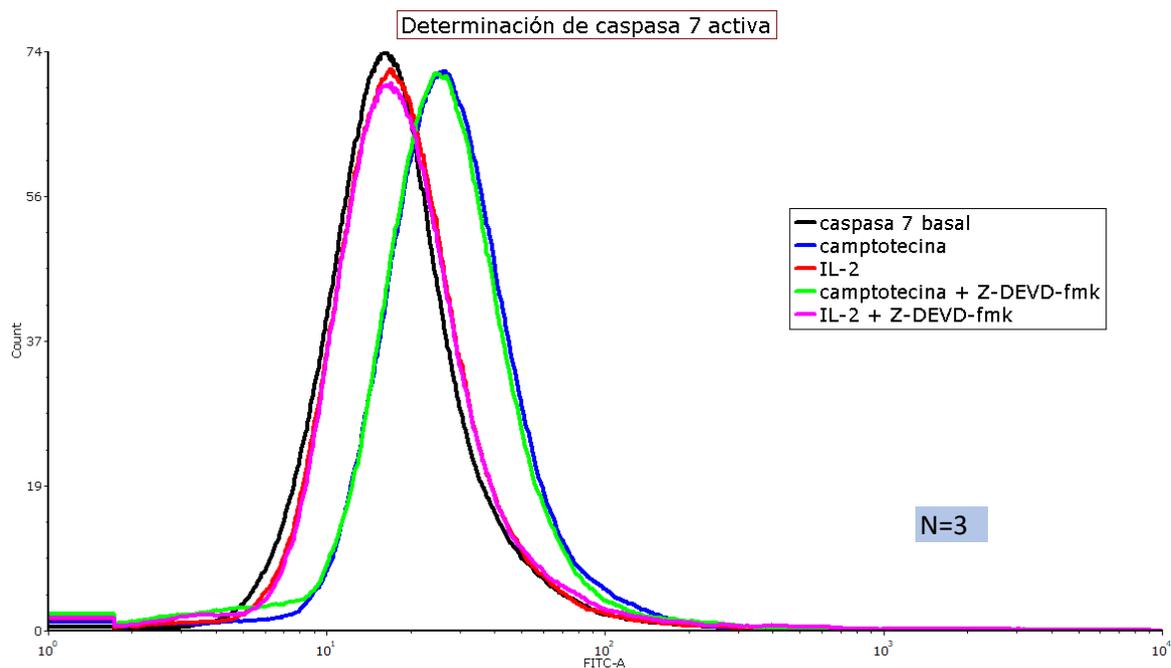


Figura 16. Determinación de caspasa 7 activa en células de la línea INBL cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). No se observa un aparente cambio de células positivas a caspasa 7 activa con el uso de Z-DEVD-fmk.

N: número de experimentos realizados.

El porcentaje de células positivas a caspasa 7 activa después de 24 horas de cultivo en diferentes condiciones, en el caso específico de las células cultivadas en presencia de camptotecina con el inhibidor Z-DEVD-fmk, se observa 92% de células positivas, mientras que las células cultivadas con IL-2 y el inhibidor Z-DEVD-fmk se observa un incremento de células positivas en un del 37% (Figura 17).

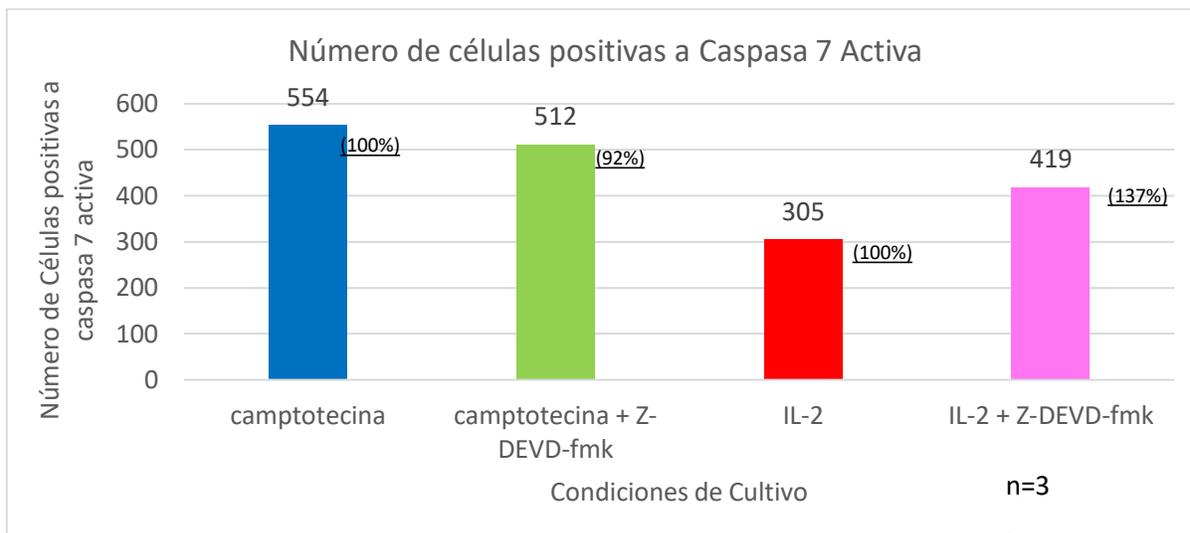


Figura 17. Número de células positivas a caspasa 7 Activa cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). El aumento que se observa de células positivas a caspasa 7 Activa se observa en los cultivos con IL-2 + Z-DEVD-fmk, con un 37% de aumento respecto a las cultivadas con IL-2.

### Determinación de Anexina V

Por último, los resultados obtenidos en esta determinación muestran que cuando las células de la línea INBL son cultivadas en presencia de camptotecina, se observa un aumento en la exposición de anexina V en comparación a las células cultivadas en medio RPMI. Las células cultivadas con camptotecina + Z-DEVD-fmk muestran una disminución importante de células positivas a anexina V. Por otro lado, en las células cultivadas en presencia del IL-2, se obtiene un número de células positivas a anexina V, semejante al valor obtenido en las células cultivadas con camptotecina, por su parte cuando las células son cultivadas con IL-2 + el inhibidor Z-DEVD-fmk, se obtiene el menor número de células positivas (Figura 18).

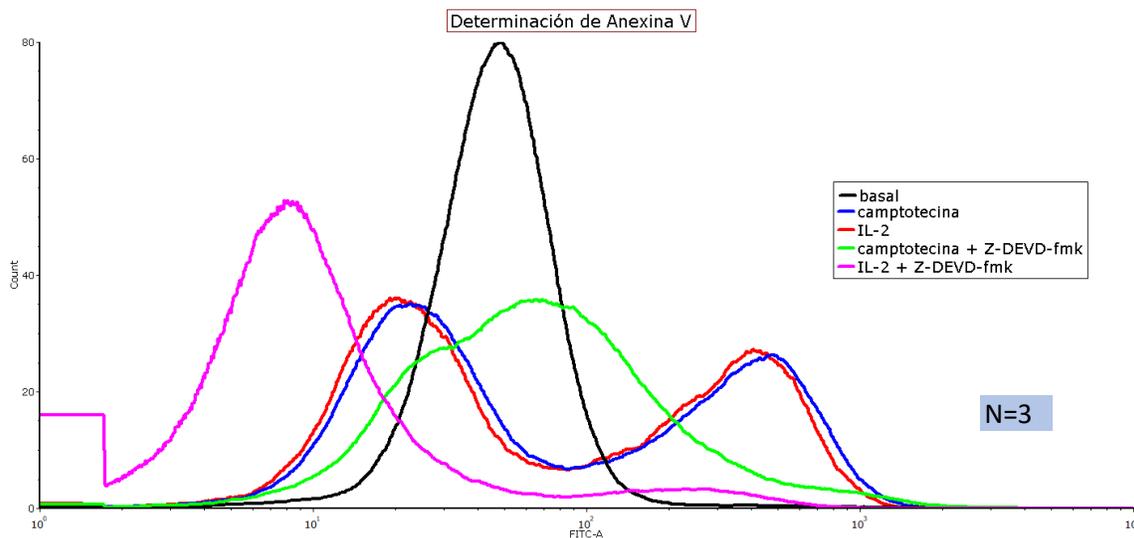


Figura 18. Determinación de Anexina V en células de la línea INBL cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). Las células cultivadas con Camptotecina e IL-2 presentan el mayor número de células positivas a Anexina V. La mayor reducción de células positivas a Anexina V se obtiene cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 + Z-DEVD-fmk.

N=número de experimentos realizados.

En este último experimento, el porcentaje de células positivas a Anexina V después de 24 horas de cultivo en diferentes condiciones, podemos decir de forma general que la presencia de las combinaciones de Camptotecina e IL-2 con el inhibidor Z-DEVD-fmk, reduce significativamente el número de células positivas a Anexina V. En el caso específico de las células cultivadas en presencia de Camptotecina + Z-DEVD-fmk, se observa 47% de células positivas, mientras que para las células cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk se tiene 12% de células positivas (Figura 19).

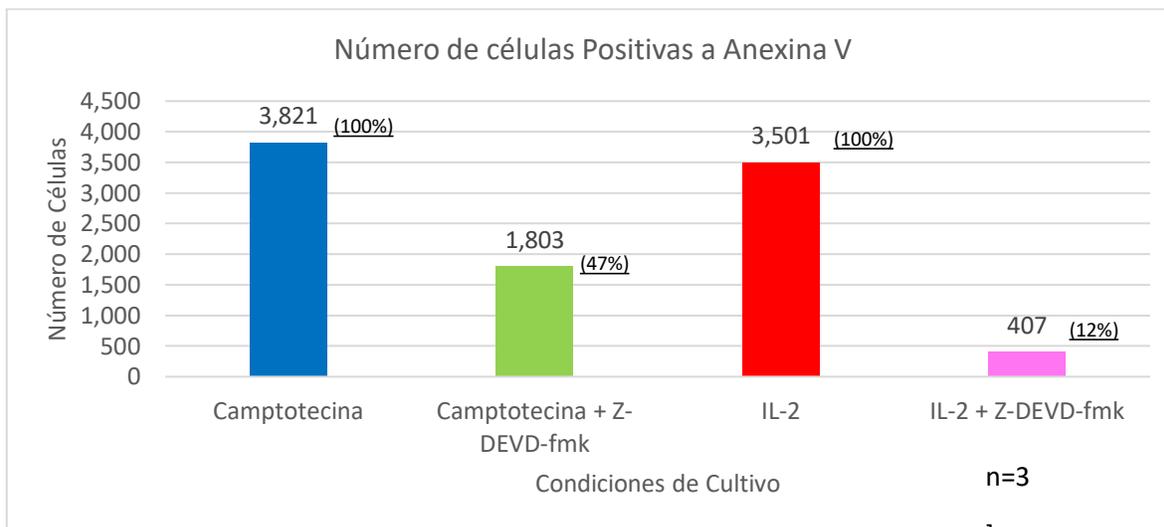


Figura 19. Número de células positivas a Anexina V cultivadas en presencia de camptotecina (azul), camptotecina + Z-DEVD-fmk (verde), IL-2 (rojo), IL-2 + Z-DEVD-fmk (rosa). La mayor reducción de células positivas a Anexina V se observa en los cultivos con IL-2 + DEVD-fmk, con un 80% de diferencia respecto a las células cultivadas con IL-2.

## X. Discusión de Resultados

La citocina IL-2 es un potente mediador y activador de diversas células del sistema inmune, como linfocitos T, Células NK, macrófagos y linfocitos B, entre otros. El uso de esta citocina como terapia contra el cáncer, ha sido utilizada en diversos modelos tumorales preclínicos, ya sea para tratar el carcinoma hepatocelular o melanoma.

En el Laboratorio de Oncología Celular de la UMIEZ FES, Zaragoza se ha empleado esta citocina como modelo de estudio para el tratamiento de CaCe debido a la importancia clínica de este tumor y su alta incidencia en países en vías de desarrollo como México.



Entre los hallazgos del grupo de trabajo del Laboratorio de Oncología Celular se encuentran: la confirmación de la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas celulares de CaCe INBL y CALO, establecidas en el Laboratorio de Oncología Celular a partir de biopsias provenientes de pacientes mexicanas (Rocha *et al.*, 2004). Asimismo, se ha descrito que el RIL-2 presente en las células de CaCe tiene un efecto sobre la proliferación de las células tumorales que depende de la concentración de IL-2 utilizada, y 100 UI/ml provoca la muerte en células CALO e INBL (Alvarado, 1997; Rangel *et al.*, 1998).

Actualmente, se desconoce el mecanismo exacto por el cual esta citocina induce la muerte de las células de CaCe. En trabajos previos se ha reportado que 100 UI/ml de IL-2 induce un aumento en la expresión del ARNm para caspasa 8, conocida como iniciadora de la vía de muerte por apoptosis a través de receptor (Sierra, 2011);

Sabemos que la apoptosis es el resultado de una serie de procesos bioquímicos que conducen a cambios morfológicos y estructurales que finalmente conducen a la muerte celular. Entre los cambios que ocurren están; la formación de poros en la membrana celular, pérdida del potencial mitocondrial, contracción celular, fragmentación del núcleo, condensación de la cromatina y la fragmentación de ADN (Siegel & Lenardo, 2001). Etapas, en donde las caspasas iniciadoras y efectoras, juegan un papel clave. La bibliografía indica que la apoptosis puede darse a través de la vía intrínseca o de la extrínseca. La vía intrínseca se desencadena como resultado del daño al ADN, en donde p53 activa a las proteínas de la familia Bcl-2 y estas a su vez provocan la salida de Citocromo c de la mitocondria que al unirse a caspasa 9 forma el apoptosoma que escinde a caspasa 3. Por su parte, la vía extrínseca esta mediada por receptores transmembranales, los cuales son capaces de activar a caspasa 8 por medio de factores intermedios, y una vez activa caspasa 8 escinde directamente a caspasa 3 ó actúa sobre la mitocondria para promover la vía mitocondrial en un proceso similar al de la vía intrínseca (Pérez & Lie. 2003; Siegel & Lenardo, 2001).



Es por ello que los resultados de Martínez en el 2011 que indican el aumento de la expresión del RNAm para caspasa 9, nos permite proponer que IL-2 favorece la formación del apoptosoma para activar a caspasa 3. Por su parte Torres en 2012, establece que existe un aumento en la presencia de caspasa 3 activa en células de diferentes líneas de CaCe. Masse en 2013, observa que en la línea INBL, en presencia de IL-2, aumenta de forma considerable el RNAm de BIDt, cuya expresión es normalmente regulada por caspasa 8 durante la cascada de señalización de la apoptosis mediada por receptor (Billen et al., 2008). Ya que su papel principal es permeabilizar la membrana mitocondrial externa al formar un dímero con Bax o Bak (Westphal et al., 2010). Evento que IL-2 parece regular según los datos de Del río Ortiz 2013, quien demostró en células INBL cultivadas con IL-2, un incremento significativo del RNAm para Citocromo c, y la liberación de éste en el medio citoplasmático, evento importante en la activación de la apoptosis mitocondrial (Billen et al., 2008).

Estos reportes, arriba mencionados, proporcionan evidencias de que la muerte inducida por 100 UI/ml de IL-2, en las células de CaCe, es a través de apoptosis. Sin embargo, para hacer una descripción detallada de la vía de señalización de muerte inducida por IL-2 en estas células, es importante esclarecer la participación de las caspasas efectoras 6 y 7 en este proceso. Por esta razón, en el presente trabajo se utilizaron células de la línea de CaCe INBL, cultivadas en presencia de IL-2, IL-2 + inhibidor específico de caspasa 3 activa (Z-DEVD-fmk), para determinar si la inhibición de caspasa 3 activa, afecta la expresión de Caspasas 6 y 7.

La literatura indica que caspasa 3 es una proteasa del ácido cisteína-aspártico que desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular, por lo que la convierte en la enzima más estudiada (Seervi & Xue 2015). Las caspasas efectoras en general se encuentran en un estado zimógeno denominado procaspasas las cuales al recibir un estímulo apoptótico sufren una proteólisis, perdiendo así su prodominio "N-terminal" formando dos subunidades, la p20 y p10,



que constituyen la enzima activa también llamada caspasa activa (Báez et al., 2003). Dado que caspasa 3 puede ser activada a través de las vías extrínseca a través de caspasa 8, e intrínseca a través de Caspasa 9. Normalmente es considerada la caspasa ejecutora más importante (Perry et al., 1997; Porter & Jänicke, 1999).

Por lo antes mencionado en este trabajo de investigación se empleó el fármaco Camptotecina, como control positivo de muerte por apoptosis ya que es conocida como agente citotóxico inductor de apoptosis a través de la activación de caspasa 3 (Sang et al, 2009; Zeng et al, 2012; Zare et al, 2012).

Nuestros resultados muestran la presencia de caspasa 3 activa, en células de la línea INBL, cultivadas tanto en presencia de Camptotecina como de IL-2 tal como lo ha reportado Torres en 2012. Es decir que IL-2 es una citocina que induce un mecanismo de muerte celular por apoptosis, en una vía semejante a la desencadenada por Camptotecina, en donde caspasa 3 es la molécula principal que la ejecuta.

Por ello, al utilizar el inhibidor de caspasa 3 activa (Z-DEVD-FMK), esperábamos eliminar, en su totalidad, a la caspasa 3 inducida por IL-2 y Camptotecina. De acuerdo con lo esperado nuestros resultados muestran que, cuando las células fueron cultivadas en presencia de camptotecina + Z-DEVD-FMK ó IL-2 + Z-DEVD-fmk, se redujo el porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa, ya que el inhibidor utilizado en esta investigación se une de forma específica, permanente e irreversible al sustrato de la caspasa 3 activa, metilando la cisteína del centro activo, provocando la supresión de la apoptosis.

Por otro lado, se sabe que la activación de caspasa 6 es comúnmente a través de la proteólisis de residuos de ácido aspártico por acción de Caspasa 3, 7 ó 9, esta última a través de la vía mitocondrial (Klaiman et al., 2009; Cowling & Downwars, 2002). Como menciona la literatura que caspasa 3 activa puede mediar la activación de caspasa 6, y nosotros hemos observado que IL-2 aumenta la



presencia de caspasa 3 en células de CaCe, pensamos que al inhibir caspasa 3 con Z-DEVD-fmk también inhibiríamos o reduciríamos el número de células positivas a caspasa 6, sin embargo, esto no ocurrió. Nuestros resultados muestran que el número de células positivas a caspasa 6 es semejante al control de muerte con camptotecina. Este evento sugiere que en las células de CaCe, caspasa 6 no es activada por caspasa 3 como lo sugiere la literatura, es decir que en células de CaCe cultivadas con IL-2, caspasa 6 podría estar siendo activada por caspasa 9 ó caspasa 7, en una vía alterna de inducción de apoptosis. Evidentemente habría que utilizar inhibidores para caspasa 9 y 7 para demostrarlo.

En lo que se refiere a caspasa 7, ésta se activa a través de la vía mediada por receptores de muerte por caspasa 8 y por la vía mitocondrial a través de caspasa 9, tal como sucede con caspasa 3. No obstante, en este trabajo observamos que al cultivar células de CaCe INBL con IL-2 + Z-DEVD-fmk, los niveles de caspasa 7 aumentan en comparación a las células cultivadas con IL-2. Estos datos son muy relevantes ya que sugieren que IL-2 puede estar activando a caspasa 7 a través de caspasa 8 y 9. Proponemos que este aumento de caspasa 7, en células cultivadas con IL-2 e inhibidor a caspasa 3, parece ser un mecanismo alterno para relevar a caspasa 3. Aunado a esto cabe resaltar que el aumento de células positivas a caspasa 7, en las muestras cultivadas con IL-2 + Z-DEVD-fmk, debería promover un aumento de células positivas a caspasa 6 como lo indica la literatura, sin embargo, en nuestras condiciones de cultivo no se observó esto, es decir caspasa 7 no activa a caspasa 6.

Tomando en cuenta lo arriba descrito, así como los antecedentes directos del efecto de IL-2 en células de CaCe, como son: el aumento del mensajero para caspasa 8 y 9, Citocromo C y BIDt, podemos proponer un nuevo modelo de señalización de apoptosis, regulada por 100 UI/ml de IL-2 en células de la línea de CaCe INBL (Figura 20). En donde caspasa 8 jugaría un papel protagónico activando dos vías de muerte. Una a través del receptor de IL-2, cuando éste se une a su ligando, promoviendo la activación de caspasa 8 que activaría a caspasa



3 y 7 de forma directa, regulando la vía extrínseca de la apoptosis; y la segunda a través de la vía mitocondrial, que estaría regulada por la activación de caspasa 9 que a su vez activaría a caspasa 3, 6 y 7. Así, activadas las caspasas efectoras 3, 6 y 7, estas dirigirán a la célula a apoptosis, siendo caspasa 3 la más eficiente, mientras que caspasa 7, de acuerdo a nuestros resultados, parece relevar la ausencia de caspasa 3.

Por último, para analizar la actividad Apoptótica de caspasa 6 y 7 en presencia del inhibidor de caspasa 3 activa, se determinó la exposición del lípido fosfatidilserina en la membrana plasmática a través de Anexina-V para identificar la apoptosis en su estadio más temprano (Cederholm & Frostegård, 2007). Los resultados obtenidos, muestran que cuando caspasa 3 es bloqueada con Z-DEVD-fmk, la actividad de la apoptosis se ve atenuada, pero no en su totalidad lo cual respaldan lo antes mencionado, donde caspasa 6 y 7 inducen independientemente apoptosis, aunque caspasa 3 es más eficiente.

Para concluir, cabe resaltar que la actividad de IL-2 en células de CaCe INBL parece desencadena una vía de señalización apoptótica múltiple que culmina con la inducción de una apoptosis más eficiente.

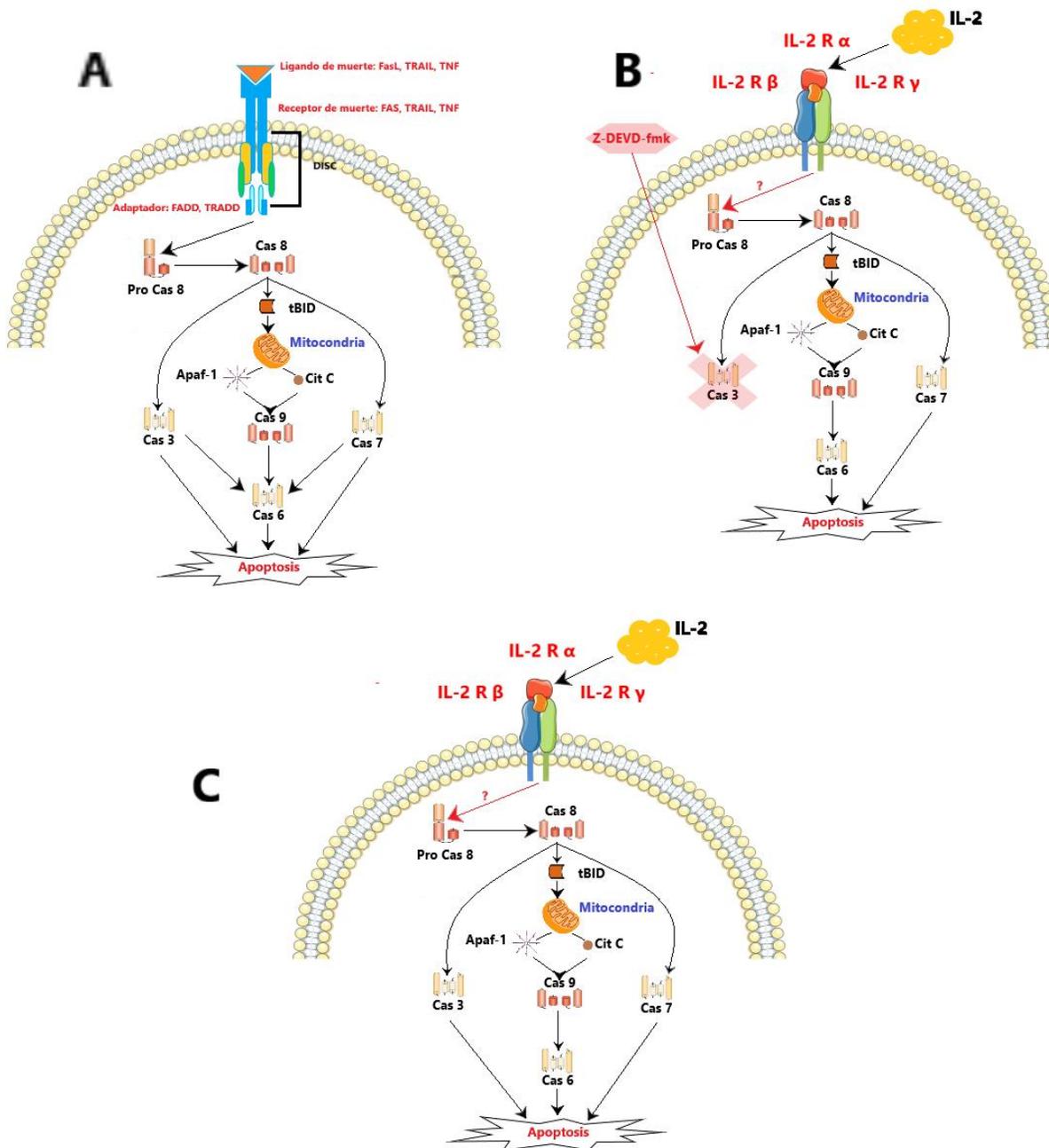


Figura 20. A) Vía clásica de apoptosis mediada por receptor; el ligando se une a un receptor de muerte que mediante la formación de complejo DISC, escinde a caspasa 8 y este a su vez es capaz de activar a caspasa 3 y 7, además de iniciar la vía mitocondrial con la escisión de BID que resulta en la activación de caspasa 9. caspasa 3, 7 y 9 son capaces de activar a caspasa 6; B) Vía de señalización resultante de inhibir caspasa 3 en células de CaCe INBL con IL-2, donde aparentemente se sigue un ruta similar a la vía clásica; C) Modelo propuesto para la apoptosis mediada por IL-2 en células de carcinoma de cérvix INBL, en donde IL-2 se une a su receptor activando caspasa 8 y ésta activa directamente a caspasa 3, 7, y a caspasa 6 a través de la vía mitocondrial.



## **XI.Conclusiones**

- IL-2 regula la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 en la línea de CaCe INBL.
- IL-2 regula la apoptosis principalmente por la inducción de caspasa 3 activa en células de CaCe INBL.
- En células de CaCe INBL cultivadas con IL-2, la activación de caspasa 6 no es resultado del aumento de caspasa 3 activa.
- Los niveles de caspasa 6 no cambian al inhibir caspasa 3 en células de CaCe INBL cultivadas e presencia de IL-2
- Los niveles de caspasa 7 aumentan al inhibir caspasa 3 en células de CaCe INBL cultivadas e presencia de IL-2
- Los niveles de anexina V no se abaten en su totalidad al inhibir a caspasa 3 en células de CaCe INBL cultivadas con IL-2
- caspasa 7 y 6 son capaces de mantener la actividad apoptótica en el proceso de apoptosis en células de CaCe INBL cultivadas con IL-2 y Z-DEVD-fmk.

## **XII.Perspectivas**

- Evaluar la presencia de caspasa 3, 6 y 7 usando un inhibidor específico de caspasa 9 activa (Z-LEHD-fmk)
- Evaluar la presencia de caspasa 3, 6 y 7 usando un inhibidor específico de caspasa 8 activa (Z-IETD-fmk)



### XIII.Referencias

- ACS. American Cancer Society. 2016. ¿Cómo se clasifica por etapas el cáncer de cuello uterino? Consultado el 24 de octubre de 2017 de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science.
- Ali G, Boldrini L, Lucchi M, Picchi A, Dell'Omodarme M, Prati MC, Mussi A, Corsi V, Fontanini G. 2009. Treatment with interleukin-2 in malignant pleural mesothelioma: immunological and angiogenetic assessment and prognostic impact. *Br J Cancer*. 101: 1869-1875.
- Alvarado MJ. 1997. Presencia de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferativo inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura de FES Zaragoza UNAM.
- Arends MJ, Buckley CH, Wells M. 1998. Aetiology, pathogenesis and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol.*;51:96-103
- Ashe CP & Berry DM. 2003. Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological Psychiatry*. 27: 199-214
- Báez ECE, Maldonado V, Meléndez ZJ. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx Vol.139 No. 5, 2003*.
- Barros OCM, Kimiko SR, Machado IA, Gerola LR, Salomão R. 2011. Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología*. 61 (2): 137-142.
- Bengtsson Ewert & Malm Patrik. 2014. Screening for Cervical Cancer Using Automated Analysis of PAP-Smears. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2014: 12. DOI:10.1155/2014/842037
- Billen LP, Shamas DA, Andrews DW. 2008. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*. 27 (1): s93-s104. Doi: 10.1038/onc.2009.47.
- Boatright KM & Salvesen GS. 2003. Caspase activation. *Biochem Soc Symp*. 70 (2003): 233-242.
- Buckley CH, Burler EB, Fox H. 1982. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*. 35:1-13.
- Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. 1997. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. 90 (1997): 315-323.
- Cascales AM. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Anal. Real Acad. Nal. Farm*. 61 (1)
- Castle PE, Jeronimo J, Schiffman M, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, Hildesheim A, Wacholder S, Long LR, Neve L, Pfeiffer R, Burk RD. 2006. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res*, 66: 1218-1224
- Cederholm A. & Frostegård J. 2007. Annexin A5 Multitasking: A Potentially Novel Antiatherothrombotic Agent. *Drug News & Perspectives*. 20(5): 321
- Champoux JJ. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem* 70: 369-413.



- Chang HY, Yang X. 2000. Proteasas para el suicidio celular: funciones y regulación de las caspasas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000): 821 – 846.
- 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.* 9: 1046–1056. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401065.
- de la Torre IG. 2008. Cuidados enfermeros al paciente oncológico. Editorial Vértice.
- De Palo G, Chanen W, Dexeus S. 2001. Infección del cuello uterino por el papilomavirus humano En: *Patología y tratamiento del tracto genital inferior.* Editorial Masson, Barcelona.
- De Palo G. & Vecchione A. 1992. Neoplasia Intraepitelial del cuello uterino. *Colposcopia y patología del tracto genital inferior.* Buenos Aires: Edit. Méd. Panamericana. 235-271.
- Del Rio O. 2013. 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.
- Devlin TM. 2006. “Bioquímica”. Reverté, 4ta Ed. P.60.
- Dranoff G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 4, 11–22. DOI: 10.1038/nrc1252.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.”*Toxicologic Pathology.* 4 (2007): 495-516.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2008. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN. *Int. J Cancer* 2010. 127: 2893 – 917.
- Fernández CS, León AG, Herrera TM, Salazar SE, Sánchez DM, Alcalá OR. 2011. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. México: SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. Consultado el 12 de enero de 2018 de: [https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p\\_epi\\_de\\_los\\_tumores\\_malignos\\_mc3a9xico.pdf](https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_de_los_tumores_malignos_mc3a9xico.pdf)
- Gupta GP & Massagué J. 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Journal Cell.* 127 (4): 679-695. Doi: 10.1016/j.cell.2006.11.001
- Gutschner T & Diederichs S. 2012. The hallmarks of cancer, *RNA Biology,* 9:6, 703-719. DOI: 10.4161/rna.20481
- Hanahan D & Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57 – 70; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9); PMID: 10647931
- Hanahan D & Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646 – 74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>; PMID: 21376230
- Herrero R, Gonzalez P, Markowitz LE. 2015. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation. *Lancet Oncol,* 16: e206-e216.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J.* 23(10): 2134-2145.
- Hill S & Nyström T. 2015. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 37 (5): 525-531.
- Hsiang YH, Lihou MG, Liu LF. 1989. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 49: 5077-5082.
- Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2(4): 277-288.



- Jacobson DL, Peralta L, Farmer M, Graham NM, Wright TC, Zenilman J. 1999. Cervical ectopy and the transformation zone measured by computerized planimetry in adolescents. *Int J Gynaecol Obstet*, 66: 7-17
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward. 2010. Cancer statistics. *CA Cancer. J. Clin.* 60: 277 – 300; <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20073>; PMID: 20610543
- Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo Joseph. 2016. *Principios de Medicina Interna*, 19 ed, Mc.Graw Hill.
- Klaiman G, Champagne N, LeBlanc AC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2009. Self-activation of Caspase-6 in vitro and in vivo: Caspase-6 activation does not induce cell death in HEK293T cells. 1793 (3): 592-601.
- Lavrik NI, Golks A, Krammer HP. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 115 (10): 2665-2672. DOI:10.1172/JCI26252.
- Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. 2016. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *J Gynecol Oncol*, 27: e51
- Liao JB. 2016. Immunotherapy for gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*. 142: 3-5.
- Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu Tc. 2010. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res*, 47: 86-112.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 104(4): 487-501.
- Low E. 2011. *Myeloma Your Essential guide*. Asociación Española de Afectados por Linfoma, mieloma y leucemia. Segunda edición. Consultado el 3 de enero de 2018, de: <http://www.sehh.es/images/stories/recursos/2013/pacientes/documentos-y-videos/Mieloma.pdf>
- Macarulla MT & Ramos PFJ. 2009. *Comprender el Cáncer*. Editorial Amat. España. Pp. 7-23
- Mandal A. 2012. Clasificación del Cáncer. *News Medical Life Sciences*. Consultado el 24 de octubre de 2017 de: [https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification-(Spanish).aspx)
- 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
- Mase A. (2012) Il-2 regula la expresión del RNAm de la proteína BID en células de las líneas de cáncer de cérvix INBL y CALO. Tesis de licenciatura, Fes Zaragoza UNAM.
- Mercado R, Vielka J, Avilés TAE. 2016. *Cáncer cervico uterino*. Otra thesis, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.
- Messerschmidt, J. L., Prendergast, G. C., Messerschmidt, G. L. (2016). How Cancers Escape Immune Destruction and Mechanisms of Action for the New Significantly Active Immune Therapies: Helping Nonimmunologists Decipher Recent Advances. *The Oncologist*. 21(2), 233–243. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0282>.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical 64cumin. *N Engl J Med*. 348: 518-527
- NIH Instituto Nacional del Cáncer (2015) *Estadificación del Cancer*. Consultado el 24 de octubre de 2017 de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>
- Padma VV. 2015. An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4): 19. DOI: 10.7603/s40681-015-0019-4



- Parkin DM & Bray F. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24: S11-S25.
- Pérez MJ & Lie CAE. 2003. Apoptosis, mecanismo de acción. *Revista de Ciencias Médicas La Habana*. 2012; 18 (2)
- Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. 1997. Zinc Is a Potent Inhibitor of the Apoptotic Protease, Caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 18530-18533. DOI: 10.1074/jbc.272.30.18530
- PMF. Princess Margaret Cancer Foundation, University Health Network. 2017. All Cancers [Figura]. Recuperado de: [http://to16.onewalk.ca/site/PageServer?pagename=to16\\_aboutcancer#](http://to16.onewalk.ca/site/PageServer?pagename=to16_aboutcancer#) consultado el 24/10/2017
- Pommier Y, Tanizawa A, Kohn KW. 1994. Mechanisms of topoisomerase I inhibition by anticancer drugs. *Adv. Pharmacol.* 29B: 73-92.
- Pop C & Salvesen GS. 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*. 284: 21777–21781.
- Porras A & Marzo I. 2010. Apoptosis: una forma controlada de muerte celular. DOI: [http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_RPC.2010.05.1](http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2010.05.1)
- Porter AG & Jänicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 6: 99–104.
- Rangel CL, Rodríguez CG, Flores FC, Gómez RI, Soto CJF, Mendoza RB, Weiss SB. 1998. Differential expression of the three components of the interleukin 2 receptor in cervical 65cumin cell. *Monduzzie Editors*.
- Rocha ZL, Huitron C, Cáceres CJ, Alvarado MA, Valle MA, Soto CI, Weiss SB, Rangel CR. 2004. Interleukin-2 (IL-2) Receptor-bg 65cumin is 65cumin by c-kit in the absence of IL-2, or by 65cumin IL-2 via JAK37 STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling* 16:1239-1247.
- Rodríguez BG. 2016. Estudios Semisintéticos y Biológicos de 20-(S)-Camptotecina en Terapia Entitumoral y Obtención de Materiales Porosos en Condiciones Biomiméticas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de València.
- Ruddon RW. 2007. *Cancer Biology*. Cuarta edición. Oxford University press. New York. PP. 3-14.
- Saelens X, Festjens N, Vande WL, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from 65cumin 65a in cell death. *Oncogene*. 2004: (23) 2861–2874.
- 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*. 13: 115–121.
- Sarduy NMR. 2008. Neoplasia intraepitelial Cervical. Preámbulo del Cáncer Cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. Revisión. Rev cubana Obstet Ginecol*. 34,2
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. 2007. Human papillomavirus and cervical 65cumin. *Lancet* 370: 890–907. DOI:10.1016/S0140-6736(07)61416-0.
- Secretaría de Salud [web] 2017. Cáncer, tercera causa de muerte en México. Consultado e, 21 de marzo de 2018, de: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
- SEER Training. 2018. Cancer Classification. Consultado el 21 de marzo de 2018, de: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Seervi M. & Xue D. 2015. Chapter Two – Mitochondrial Cell Death Pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Current Topics in Developmental Biology*. 114: 43-65.



- Siegel RM & Lenardo MJ. 2002. Apoptosis Signaling Pathways. *Current Protocols in Immunology*. 44:11.9C:11.9C.1–11.9C.10.
- Sierra ME. 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 de Fes Zaragoza-UNAM.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 276 (10): 7320-7326.
- Sosa DEE & García RFM. 2013. Panorama epimológico del cáncer en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 36: 130-1332.
- Stewart BW & Kleihues P. 2003. *World cancer report Vol. 57*. Lyon: IARC press.
- Stewart BW & Wild CP. 2014. *World Cancer Report 2014*, "IARC" International Agency for Research on Cancer
- Sudhakar A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 1(2), 1–4. DOI: 10.4172/1948-5956.100000e2.
- TBTC. The Brain Tumour Charity. 2014. Normal cell division and growth: Abnormal cell division and growth, leading to the development of a tumour [Figura]. Recuperado de: <https://www.thebraintumourcharity.org/understanding-brain-tumours/symptoms-and-information/what-is-a-brain-tumour/>. Consultado el 20 de agosto de 2017.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. 2012. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 65: 87–108.
- 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.
- Torres SLE, Rojas MR Escamilla Nconsuelo, Vara SE, Lazcano PE. 2014. Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011. *Salud Pública de México*, 56(5), 473-491. Recuperado en 14 de agosto de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342014000500015&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000500015&lng=es&tlng=es).
- Troy CM, Akpan N, Jean YY. 2011. Chapter 7 – Regulation of Caspases in the Nervous System: Implications for Functions in Health and Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 99: 265-305.
- UHN University Health Network. 2017. FUNDING BY CANCER TYPE. Consultado el 24 de octubre de 2017 de: <http://ibelieveit.thepmcf.ca/Personalized-Cancer-Medicine/Funding-by-Cancer-Type>.
- Verma A & Singh A. 2014. *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Academic Press. United States.
- Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 296 (5573): 1635-1636.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme: a (p20/p10) $_2$  homodimer. *Cell* 78: 343-352.
- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. 1966. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca 66cuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88 (16): 3888-3890.



- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluc RM. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1813 (4): 521-531.
- World Health Organization. 2012. Proyecto Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Consultado el 21 de marzo de 2018, de: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
- Xu G & McLeod HL. 2001. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 7(11): 3314–3324.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997; 275:112932.
- Zare MA, Sarzaeem A, Moradhaseli S, Sayad A, Negahdary M. 2012. Necrotic Effect versus Apoptotic Nature of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells. *Iran J Cancer Prev*. 5 (3): 109–116.
- Zeng CW, Zhang XJ, Lin KY, Ye H, Feng SY, Zhang H, Chen YQ. 2012. Camptothecin Induces Apoptosis in Cancer Cells via MicroRNA-125b-Mediated Mitochondrial Pathways. *Molecular Pharmacology*. 81 (4): 578-586. DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.111.076794>.
- Trottier H & Franco E. 2006. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24(1): 51–15.