



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE 100UI DE IL-2 SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS

EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÉRVIX

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CD. MX. Noviembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE 100UI DE IL-2 SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS

EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÉRVIX

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CD. MX. Noviembre, 2019

OFICIO CPCB/1004/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 02 de septiembre de 2019, aprobó el jurado para la presentación del examen a la alumna **LAGUNAS CRUZ MARÍA DEL CARMEN**, con No. de Cta. **403016116**, para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, con la tesis titulada **"EFECTO DE 100UI DE IL-2 SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS EN CÉLULAS CARCINOMA DE CÉRVIX"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**:

Presidente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Vocal: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de septiembre de 2019.



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO
Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

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

Al programa de becas para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo. CVU 412919/269820

El trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (L9, planta baja, UMIEZ), y se desarrolló gracias al financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (proyectos IN222218, IN222915) y del CONACYT (proyecto CB253262).

A los miembros del Comité Tutor

DRA. ISABEL SOTO CRUZ

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Isabel Soto

**A mis compañeros y amigos Mayra I, Pedro F, Beatriz H, Rosario G, Nubia C,
O, Evelyn E, Adriana G.**

Dedicatoria

A mi madre, Maurilia Cruz

A mi padre, Isidro Lagunas

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

A mi esposo Arturo Valle Mendiola

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	4
El cáncer.....	4
El cáncer de cérvix.....	4
Interleucina 2	5
Receptor de IL2	7
Muerte celular; apoptosis.....	7
Senescencia celular.....	12
Ciclo celular. Arresto del ciclo celular.....	13
Papel de IL-2 en células de cáncer de cérvix.....	17
Planteamiento del problema.....	19
Hipótesis	20
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Materiales y métodos.....	22
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	54
PERSPECTIVAS	55
BIBLIOGRAFÍA	56

Efecto de IL-2 sobre el ciclo celular y la apoptosis en células de carcinoma de cérvix

Resumen

El cáncer es una enfermedad multifactorial y representa un problema de salud pública a nivel mundial. En México el cáncer de cérvix, ocupa el segundo lugar en incidencia precedido por el cáncer mama. Algunos tipos de cáncer como cáncer de riñón, melanoma, han sido tratados con interleucina 2. Considerando que en México el cáncer de cérvix es un grave problema de salud pública, se buscan terapias que permitan disminuir la proliferación de las células malignas, por lo que se ha considerado a la interleucina 2 como un posible candidato.

La interleucina 2 (IL-2) se ha utilizado para tratar diferentes tipos de cáncer que expresan el receptor de IL-2 (IL2-R). Sin embargo, el efecto de IL-2 en las células de cáncer de cérvix no ha sido totalmente dilucidado. El IL-2R está presente en las células normales del sistema inmune, pero no en el cérvix normal. Nuestro equipo de trabajo ha reportado que diferentes concentraciones de IL-2 tienen efecto diferencial en las células de cáncer de cérvix. También ha reportado que el IL-2R se expresa en células de cáncer de cérvix. Sin embargo se desconoce el papel de la IL-2 sobre la inhibición de la proliferación en células de cáncer de cérvix. Para responder a esta pregunta analizamos el papel de IL-2 sobre la proliferación y la inducción de apoptosis en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL. Nuestros resultados muestran que las tres subunidades del receptor son inducibles y que el tratamiento con IL-2 induce disminución de la proliferación en ambas líneas celulares. Mediante una curva de proliferación con diferentes concentraciones de IL-2 obtuvimos la dosis necesaria para inhibir la proliferación. El tratamiento con 100 UI de IL-2 indujo apoptosis en una pequeña porción de la población de ambas líneas celulares; tampoco indujo senescencia en ninguna de las líneas celulares. La IL-2 indujo un arresto en la fase G1 del ciclo celular de la línea INBL. El arresto celular puede ser debido al aumento de las proteínas reguladoras del ciclo celular

p53, p21 y a la disminución de ciclina D. Considerando que el arresto celular haría sensibles a las células a morir por apoptosis, las células se arrestaron en la fase G1 del ciclo y se incubaron con cisplatino. Nosotros reportamos que tanto en las células HeLa como INBL, disminuye el efecto apoptótico del cisplatino cuando las células son previamente tratadas con IL-2.

Teniendo en cuenta estos resultados, concluimos que la IL-2 podría conferir protección a las células contra la apoptosis.

Abstract

Cancer is a multifactorial disease and is a public health problem worldwide. In Mexico, cervical cancer ranks second in incidence preceded by breast cancer. Some types of cancer, such as kidney cancer, melanoma, among others, have been treated with interleukin 2. Considering that cervical cancer is a severe public health problem in Mexico, therapies are sought to reduce the proliferation of malignant cells. Interleukin-2 is a possible candidate for such treatments. Interleukin-2 (IL-2) has been used to treat different types of cancer that express the IL-2 receptor (IL-2R). However, the effect of IL-2 on cervical cancer cells is not clear. IL-2R is present in healthy cells of the immune system, but not in the normal cervix. Our workgroup has reported that IL-2R is expressed in cervical cancer cells and the role of IL-2 on cell proliferation. In this study, we demonstrate that the three subunits of the receptor are inducible and that the treatment with 100 IU of IL-2 inhibits cell proliferation. We found that treatment with IL-2 induced apoptosis in a small portion of the cell population and did not induce senescence in any of the cell lines. Also, the IL-2 induced a cell cycle arrest in G1. The cellular arrest may be due to an increase of the cell cycle regulatory proteins p53, p21 and the decrease of cyclin D. In subsequent experiments, cells were arrested in G1 phase and incubated with cisplatin. We observed that IL-2 decreases the apoptotic effect induced by cisplatin when the cells arrested in G1. Considering these results, we conclude that IL-2 could be conferring protection to cells against apoptosis.

Introducción

El cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada por el crecimiento y la proliferación celular descontrolada (American Cancer Society, 2018). En 2018, se registraron 569 847 nuevos casos de cáncer de cérvix en todo el mundo, el registro de mortalidad fue de 311 365 casos. En México en el 2018, se presentaron 7869 nuevos casos de cáncer de cérvix (Globocan 2018).

El cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix es una enfermedad en la que las células del cuello uterino se vuelven anormales y comienzan a crecer sin control. Es causada principalmente por la infección persistente con tipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH) (Zur, 2002) Aunque el cáncer de cérvix en etapa temprana es altamente curable, las etapas avanzadas o metastásicas aún son difíciles de tratar; por lo tanto, el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas es una tarea urgente (Tamura *et al.*, 2018).

El tratamiento del cáncer de cérvix depende de la etapa o estadio del cáncer, el tamaño y forma del tumor, la edad y salud general de la mujer y su deseo de tener hijos en el futuro. Los tratamientos incluyen cirugía, radioterapia, terapia hormonal y quimioterapia (Steed *et al.*, 2004; Thomas, 1999; Boice *et al.*, 1995). La posibilidad de la radioterapia para curar el cáncer de cérvix localmente avanzado está limitada por el tamaño del tumor, ya que las dosis requeridas para tratar tumores grandes superan el límite de toxicidad en el tejido normal (Rose *et al.*, 1999). El efecto de la radioterapia o quimioterapia, con tratamiento concomitante con cisplatino, ha aumentado la tasa de control local en un 35 por ciento de un grupo de estudio de 45 pacientes con cáncer de cérvix, en comparación con la radioterapia y la quimioterapia utilizadas de manera independiente (Rose *et al.*, 1999). Se ha propuesto aumentar la tasa de respuesta al introducir citocinas en los regímenes terapéuticos, como el interferón alfa o la interleucina 2 (IL-2).

Interleucina 2 (IL-2)

La IL-2 es una citocina de bajo peso molecular producida principalmente por células T CD4+ estimuladas por antígeno (Keene y Forman, 1982) y en menor cantidad por células T CD8+ (Paliard *et al.*, 1988), células NKT (Yui *et al.*, 2004), monocitos (Hershko *et al.*, 2011) y células dendríticas mieloides (Granucci, 2001). La IL-2 se expresa en células hematopoyéticas, así como en una amplia variedad de células no hematopoyéticas, incluyendo células normales y malignas de origen epitelial (Saneto *et al.*, 1986).

La IL-2 está constituida por alfa-hélices (Figura 1), está constituida de 153 aminoácidos con un peso molecular de 15.5 KDa (Taniguchi *et al.*, 1983). En humanos el gen que la especifica se localiza en el cromosoma 4 (Sykora *et al.*, 1984).

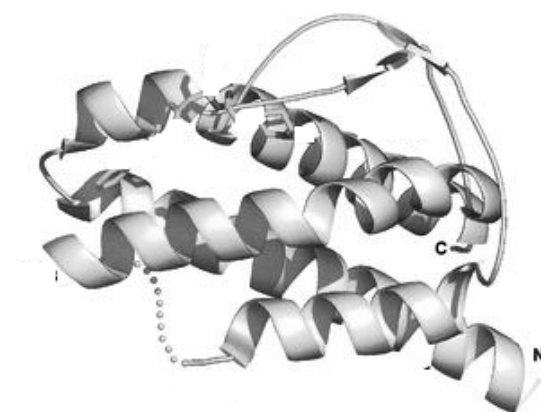


Figura 1. Representación esquemática de la interleucina 2 (IL-2) determinada por cristalografía en rayos X. Constituida por alfa hélices. Tomada y modificada de Arkin *et al.*, 2003.

La IL-2 es sintetizada tanto por células normales (7.5-8 UI/ml encontrada en suero) (González *et al.*, 2007), como por células tumorales (40-50 UI/ml, CALO e INBL) (Rangel *et al.*, 2010). La IL-2 fue aprobada por la FDA (del inglés Food and Drug Administration) para uso clínico en Estados Unidos desde 1992 (Safar y Junghans 2000), desde entonces la IL-2 se ha utilizado como tratamiento contra diversos tipos de cáncer que presentan el receptor para interleucina 2 (IL-2R) (cuadro 1).

Presencia del IL-2R en diferentes tipos celulares

Sistema inmune	No S. Inmune	Tumorales
<ul style="list-style-type: none"> • Alfa: Treg¹, NK², CD³ • Alfa inducible: LB⁴ • Beta: Treg, LB, CD, monocitos⁵ • Gamma: Treg, LB, monocitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Alfa: FH⁶, tejido adiposo⁷ • Alfa inducible: No reportado • Beta: epitelio intestinal⁸ fibroblastos tipo sinoviocitos⁹ • Gamma: Epitelio intestinal 	<ul style="list-style-type: none"> • Alfa: cérvix (INBL¹⁰, CALO¹⁰) • Alfa inducible: No reportado • Beta: cérvix (CALO^{10,11}, HeLa¹² e INBL^{10,11}) • Gamma: cérvix (CALO^{10,11}, HeLa¹² e INBL^{10,11})

Sakaguchi et al., 1995¹; Rudnicka et al., 2015²; Balachander et al., 2015³; Berglund et al., 2013⁴; Bosco et al., 1994⁵; Gruss et al., 1996⁶; Martínez y García 2016⁷; Reinecker et al., 1995⁸; Corrigan et al., 2001⁹; Rangel et al., 1998¹⁰; Rocha et al., 2004¹¹; Otero et al., 1995¹².

Cuadro 1. Se muestran las diferentes células en que está presente el receptor de IL-2. Treg, células T reguladoras. NK, natural killer. CD, células dendríticas. LB, linfocitos B. Células de cáncer de cérvix: CALO, HeLa e INBL.

Receptor de IL-2

El receptor para IL-2 (IL-2R) es un complejo de tres subunidades denominadas alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La cadena IL-2R α (p55) se une a la IL-2 con baja afinidad ($K_d=10^{-8}M$), mientras las cadena IL-2R β (p70/75) en asociación con la cadena IL-2R γ (p64) se unen a la IL-2 con afinidad intermedia ($K_d=10^{-9}M$). La asociación no covalente de la IL-2R α , IL-2R β e IL-2R γ conforma al receptor de alta afinidad ($K_d=10^{-11}M$) (Taniguchi and Minami, 1993). En células normales del sistema inmune, la formación del receptor de alta afinidad inicia con el reclutamiento de la subunidad alfa, seguido de la subunidad beta y finalmente la subunidad gamma (Stauber et al., 2006; Wang et al., 2005). La unión con afinidad intermedia entre el ligando IL-2 y el IL-2R dada por la presencia de la subunidades

β y γ activa vías de señalización como PI3K/AKT, Ras-MAP cinasas y JAK/STAT. En esta última vía se activan JAK1, JAK3, STAT3, STAT5A Y STAT5B, las cuales median crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular (Kim *et al.*, 2006; Friedmann *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha reportado que en algunos tipos de cáncer está presente el IL-2R asociado con el aumento de la proliferación, resistencia a fármacos y a la capacidad de transformación; por ejemplo en cáncer de cabeza y cuello (Kuhn *et al* 2003; Reichert *et al.*, 1998). En tejido de pacientes con displasia intraepitelial cervical (NIC) se ha reportado que el RIL-2 aumenta conforme avanza la lesión ya que hay mayor expresión en neoplasia intraepitelial cervical etapas 2 y 3 (NIC 2 y NIC3) (Mindiola *et al.*,2008).

Muerte celular. Apoptosis

En organismos multicelulares, la muerte celular es un proceso crítico y activo que mantiene la homeostasis del tejido y elimina las células potencialmente dañinas. Existen tres tipos principales de muerte celular morfológicamente distinta: apoptosis (muerte celular tipo I), muerte celular autofágica (tipo II) y necrosis (tipo III). Los tres pueden ejecutarse a través de vías de señalización distintas, su activación puede ser independiente o cruzada de acuerdo a la respuesta a estímulos específicos (Green y Llambi, 2015).

La apoptosis es un proceso de muerte celular, morfológicamente caracterizado por condensación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, pérdida de la distribución asimétrica de lípidos de membrana, el fraccionamiento del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos (Maldonado *et al.*, 1997; Zhang y Xu, 2000).

Una característica de las células normales es la distribución asimétrica de los fosfolípidos, entre el interior y el exterior de la membrana plasmática. En condiciones fisiológicas los fosfolípidos de colina (fosfatidilcolina y esfingomielina) están expuestos en la cara externa de la membrana, mientras que los aminofosfolípidos (fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina) se localizan exclusivamente hacia el citoplasma. La fosfatidilserina constituye menos del 10%

de los fosfolípidos totales de membrana, y en el proceso de apoptosis se transloca hacia el exterior de la membrana celular. La exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular proporciona señalización a los macrófagos, debido a los receptores de PS (PSRs) presentes en los macrófagos, aunado a la quimiotaxis (Arias *et al.*, 1999), lo cual permite la fagocitosis de células apoptóticas y cuerpos apoptóticos. La detección de fosfatidilserina expuesta permite la estimación del inicio de apoptosis (Wlodkowic *et al.*, 2011). Otra característica de la apoptosis es la formación de distintos fragmentos de DNA de oligonucleosomas con tamaños que oscilan entre 180 a 200 pares de bases (Maldonado *et al.*, 1997).

La apoptosis tiene dos procesos de activación la intrínseca y la extrínseca. Ambos tipos de activación consisten en una cascada de señales que activan la muerte celular. La apoptosis extrínseca consiste en la activación vía receptores celulares de membrana por su ligando. Hay evidencia de que las dos vías se unen y que las moléculas de cada vía influyen en la otra (Igney y Krammer, 2002).

Las caspasas tienen actividad proteolítica y son capaces de cortar proteínas, de residuos de ácido aspártico. Las caspasas se dividen en caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10), caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) y en caspasas inflamatorias (1, 4, 5) (Cohen, 1991; Rai *et al.*, 2005).

Vía extrínseca: las vías de señalización extrínseca que inician la apoptosis involucran interacciones mediadas por receptores transmembrana. Estos implican receptores de muerte que son miembros de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley *et al.*, 2001). Los miembros de la familia de receptores de TNF comparten dominios extracelulares ricos en cisteína y tienen un dominio citoplásmico de aproximadamente 80 aminoácidos llamado dominio de muerte (Ashkenazi y Dixit, 1998). Este dominio de muerte desempeña un papel crítico en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular hacia las vías de señalización intracelular. Hasta la fecha, los ligandos y receptores mejor caracterizados incluyen FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Chicheportiche *et al.*, 1997; Ashkenazi *et al.*, 1998; Peter y Kramer, 1998; Suliman *et al.*, 2001; Rubio-Moscardo *et al.*, 2005).

Vía intrínseca: las vías de señalización intrínseca que inician la apoptosis implican un conjunto de estímulos no mediados por receptores que producen señales intracelulares que actúan directamente sobre objetivos dentro de la célula y son eventos iniciados por daño a la mitocondria. Los estímulos que inician la ruta intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar de forma positiva o negativa. Las señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas que pueden conducir a la activación de apoptosis. Los estímulos que actúan de manera positiva son: radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres (Elmore, 2007).

La apoptosis es un proceso regulado por genes específicos, como p53. La proteína p53 es una proteína de unión a DNA específica de secuencia, que actúa como un factor de transcripción. Se ha propuesto que p53 puede estar involucrado en la respuesta celular de daño a DNA, produciendo arresto en la fase G1 del ciclo celular para permitir la reparación eficiente del DNA antes de entrar en la fase S o activar muerte celular si el daño no se repara (Prives y Manfresi, 1993).

El gen supresor de tumores p53 es el integrador central de la respuesta celular al daño del ADN, la transformación oncogénica y la disminución del factor de crecimiento. La regulación del ciclo celular y las funciones de reparación del ADN se ejecutan en gran medida mediante la transactivación de los genes de respuesta de p53, como p21/WAF1/CIP1 (Nozell *et al.*, 2002). El supresor de tumores p53 ejerce efecto antiproliferativo a través de su capacidad para funcionar como un factor de transcripción de unión a ADN específico de secuencia. p53 puede ser modificado por acetilación. Sorprendentemente, el sitio de p53 que está acetilado por su coactivador, p300, reside en un dominio C-terminal que se sabe es crítico para la regulación de la unión del ADN de p53. Además, la acetilación de p53 puede estimular dramáticamente su actividad de unión a ADN específica de secuencia, posiblemente como resultado de un cambio conformacional inducido por acetilación.

Se ha reportado que p53 induce la apoptosis regulando el balance entre proteínas pro y anti-apoptóticas como Bax y Bcl-2 (Miyashita, 1995; Budhram-Mahadeo *et*

al., 1999). Bax es una proteína central en la cascada apoptótica encargada de promover la muerte celular (Oltvai *et al.*, 1993). Bax puede heterodimerizar con Bcl-2, la cual tiene función antiapoptótica; el radio Bcl-2-Bax determina la susceptibilidad a la muerte celular seguida del estímulo apoptótico (Oltvai *et al.*, 1993). Los efectores pro-apoptóticos residen en células en formas inactivas ancladas a la membrana mitocondrial externa (Bak) o solubles en el citosol (Bax). Tras la activación, Bax y Bak se oligomerizan y se insertan en la membrana, lo que provoca la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y, por lo tanto, la apoptosis (Green y Llambi, 2015).

Bax puede formar canales iónicos en la membrana lipídica externa bajo condiciones neutrales y fisiológicas (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). La localización mitocondrial de la proteína Bax es esencial en su función, promoviendo la muerte celular al liberar del interior de la mitocondria al citocromo c (Jürgensmeier *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 1998). La liberación del citocromo c al citosol es un paso clave en la cascada apoptótica. El citocromo c una vez liberado se une al factor de activación de la proteasa apoptótica 1 (Apaf-1) formando el apoptosoma (Wang, 2001). El apoptosoma recluta a la procaspasa-9 y promueve su escisión a una forma activa, conocida como iniciadora de la apoptosis. La caspasa-9 unida al apoptosoma actúa como el factor de escisión de caspasa-3 lo cual permite la ejecución de la apoptosis (Green, 2000; Wang, 2001).

La apoptosis juega un papel muy importante en gran número de enfermedades. Se ha sugerido que los medicamentos antineoplásicos pueden ejercer efecto por inducción de muerte celular por apoptosis. Al respecto, se ha reportado que el cisplatino induce apoptosis en diversas líneas celulares. El cisplatino [*cis*-diclorodiamino-platino (II)] es un efectivo agente entrecruzador entre cadenas de DNA o entre cadenas de DNA y proteínas. En el caso del cisplatino se lleva a cabo un entrecruzamiento entre el cisplatino, el DNA y el glutatión formando mono aductos que causan arresto del ciclo celular en la fase G2/M, que es reconocido como daño irreparable del DNA lo cual induce la activación de la apoptosis (Maldonado *et al.*, 1997; He *et al.*, 2005; Blankenberg, 2004; Čipak *et al.*, 2003). El

cisplatino es un importante agente quimioterapéutico ampliamente usado en el tratamiento clínico de distintos tipos de cáncer, tales como cáncer de ovario, testicular, vejiga, pulmón, gástrico, cabeza y cuello y cervical (Blankenberg., 2004; Čipak *et al.*, 2003). En el caso del cáncer de cérvix en etapa inicial, se ha reportado que la quimio-radioterapia concurrente con cisplatino puede usarse como terapia adyuvante principalmente en los casos positivos para metástasis ganglionar debido a la clara inducción a apoptosis en estos casos. (Kato *et al.*, 2015).

Senescencia celular

A lo largo de su vida las células experimentan continuamente estrés y daño por fuentes exógenas y endógenas, y sus respuestas van desde la recuperación completa hasta la muerte celular. Las células proliferativas pueden iniciar una respuesta adicional adoptando un estado de senescencia celular. Comprender las causas y consecuencias de la senescencia celular ha proporcionado nuevos conocimientos sobre cómo las células reaccionan ante el estrés, especialmente el estrés genotóxico, y cómo esta respuesta celular puede afectar procesos complejos como el desarrollo del cáncer y el envejecimiento (Campisi *et al.*, 2007).

La expresión de varios genes es alterada por senescencia celular y varias citocinas como el interferon β (Moisseva *et al.*, 2006), IL-6, IL-8 (Lee y Lee., 2014), factores de crecimiento, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Coppé *et al.*, 2006) y algunas enzimas tienen función de biomarcadores para determinar senescencia celular. El primer marcador de senescencia identificado fue la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal). Los reguladores negativos del ciclo celular, por ejemplo p15, p16, ARF y p21, han sido identificados como inductores de senescencia (Lee y Lee, 2014)

Las células senescentes tienen altos niveles de inhibición de cinasas dependientes de ciclinas así como de las ciclinas D y E en respuesta al estímulo de crecimiento. La inducción de la senescencia también puede ser el resultado

celular del daño en el ADN, el cual está determinado por la duración y la extensión del estímulo de una manera dependiente de p53. En respuesta a los niveles transitorios o bajos de daño en el ADN, la p53 desencadena la detención reversible de la fase G2 del ciclo celular, mientras que con niveles prolongados o altos de daño en el ADN se extiende la detención del ciclo celular dependientes de p53 (Lukin *et al.*, 2015). En organismos adultos, la mayoría de las células pueden ser arrestadas en alguna fase del ciclo celular pero no entrar en senescencia.

Ciclo celular. Arresto del ciclo celular

En células normales durante la fase G1, la célula se prepara para la síntesis de ADN, la célula está creciendo y su carga cromosómica es diploide (2n). (Collins y Garrett, 2005; Vermeulen *et al.*, 2003). En la subsiguiente etapa, Fase S, se produce duplicación de ADN y al final de la fase el contenido de ADN ha alcanzado 4n. En la fase G2, las células están en crecimiento y por lo tanto están preparadas para la división celular. Durante la mitosis se produce la separación en dos células hijas. Existe otra etapa llamada fase G0 (quiescencia) donde las células no están en ciclo activo (Collins y Garrett, 2005). Para evitar la proliferación celular inadecuada, existen mecanismos de control. Las proteínas reguladoras clave que permiten la transición de una fase del ciclo celular a otra se llaman cinasas dependientes de ciclina (CDK), una familia de proteínas cinasas serina/treonina que se activan en puntos específicos durante el ciclo celular (Collins y Garrett, 2005; Vermeulen *et al.*, 2003).

La regulación positiva de la actividad de CDK se produce mediante la asociación con una segunda subunidad, la ciclina. Se producen ciclinas en cada una de las fases del ciclo celular y forman un complejo con su CDK. Los niveles de activación de ciclinas en diferentes etapas del ciclo celular difieren, mientras que los niveles de proteína CDK permanecen estables (Vermeulen *et al.*, 2003). Durante la transición de las fases de G0 a S se activan las ciclinas D1, D2 y D3. Las ciclinas D1, D2 y D3 se unen a CDK4 y CDK6.

La progresión a través de G1 está mediada por el complejo ciclina D/CDK2, CDK4 y CDK6 (Schwartz y Shah, 2005; Vermeulen et al., 2003). La ciclina E se asocia durante la transición de G1 a la fase S y activa CDK2. Ciclina A se activa durante la transición de la fase S y se une a CDK1 y CDK2. Las ciclinas de tipo B están presentes durante la salida de G2 y la fase de mitosis está asociada con CDK1 (Coqueret, 2003).

Una célula normal replica el ADN y se duplica a sí misma influenciada por la señalización extracelular. Una vez iniciada la replicación del ADN debe estar terminada. Por lo tanto, las señales extracelulares como los factores de crecimiento no deben controlar la progresión de la fase S. Después de completar con éxito la síntesis de ADN, las células entran en la fase G2 en preparación para la mitosis. La mayoría de los tipos de células de mamíferos son diploides, por lo que después de la duplicación del ADN, una célula debe dividirse. Por lo tanto, el control por factores de crecimiento también es innecesario en la fase G2. Este es un momento para verificar los eventos de señalización interna, como el daño al ADN (Vermeulen et al., 2003).

Las lesiones al ADN causadas por diferentes agentes pueden activar puntos de control e inhibición de cinasas dependientes de ciclinas (CDK): CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E para el punto de control en la fase G1 del ciclo celular; CDK2/ciclina A para el punto de control S y CDK2/ciclina A y CDK2/ciclina B para el punto de control de la fase G2 (Attardi *et al.*, 2004; Buscemi *et al.*, 2004; Sancar et al., 2004; He et al., 2005).

La desregulación del ciclo celular en cáncer de cérvix se debe principalmente a las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano, estas proteínas son oncogenes virales importantes que promueven la proliferación de células hospederas y la disminución de la apoptosis celular, y aumentan la inestabilidad genómica para facilitar la migración de células infectadas por VPH. Las proteínas E6 y E7 forman complejos con p53 y Rb, respectivamente, lo que conduce a la desregulación de los mecanismos de control del ciclo celular y la liberación del factor de transcripción E2F, que posteriormente activa la expresión de genes asociados al

ciclo celular. Los oncogenes virales E6 y E7 son esenciales para la carcinogénesis cervical inducida por el VPH y apoyan el ciclo de vida viral (Govan, 2005; Wu et al., 2017). Se ha reportado que las células de cáncer de cérvix contienen baja cantidad de proteína p53 normal como resultado de la degradación inducida por el virus del papiloma humano, o células que expresan p53 mutado, por lo tanto se pierde la capacidad de arrestar la progresión del ciclo celular y continuar la proliferación permitiendo la inestabilidad genética y eventualmente malignidad (Maldonado et al., 1997).

El gen supresor de tumores p53 activa puntos de revisión en el ciclo celular en respuesta al daño en el DNA produciendo arresto en la fase G1 del ciclo celular para permitir la reparación eficiente del DNA antes de entrar a la fase S, o muerte celular si el daño no puede ser reparado (Barnum y O'connell, 2014). En contraste, se ha reportado que p53 puede ser requerido para la supervivencia celular (Lukin et al., 2015). Tras el tratamiento transitorio con agentes que dañan el ADN, las células p53 de tipo silvestre detienen y reparan el daño de forma reversible, mientras que las células knockout para p53 no lo hacen y mueren. Estos datos indican que p53 puede promover la supervivencia celular al inducir la detención reversible del ciclo celular, lo que permite la reparación del ADN. Por lo tanto, los tratamientos transitorios pueden explotar las diferencias entre p53 de tipo silvestre y células carentes de p53 (Maldonado et al., 1997).

En diversos tipos de tumores humanos el gen supresor tumoral p53, funciona como un factor de transcripción específico del gen y como un inhibidor específico de la transcripción de ciertos genes como, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), c-fos, c-jun, mdm2, IL-2, Bcl, entre otros (López *et al.*, 2001). Los dos resultados fisiológicos de la re-expresión de p53 de tipo silvestre en células tumorales, que no expresan p53 de tipo silvestre, son la detención de G1 y la apoptosis. El mecanismo de detención de G1 por p53 está mucho mejor documentado que su capacidad para desencadenar la apoptosis. p53 como factor de transcripción induce la expresión de p21WAF1/CIP1/Sdi1, un inhibidor de las CDK tipo 2, 3, 4 y 6. Por lo tanto, el arresto en G1 puede resultar simplemente por

la expresión inducida por p53 de p21WAF1/CIP1/Sdi1. p53 también regula la expresión de ciclina A, al proporcionar una ruptura secundaria en la progresión del ciclo celular en la fase S (Shaw, 1996).

Las células humanas individuales varían en su capacidad para mantener la detención del ciclo celular, en el transcurso de la primera semana después del daño al ADN. Las fluctuaciones en las dinámicas oscilatorias del gen supresor de tumores p53 puede desencadenar el cambio de un estado detenido a un estado proliferativo (Reyes et al., 2018). La proteína p53 regula río abajo a la proteína p21 la cual es capaz de arrestar la fase G1 al inhibir específicamente la actividad CDK2 mediada por la proteína del retinoblastoma pRb (Miettinen et al., 2001).

Como ya se ha mencionado, las células cancerosas tienen muchas características particulares que las distinguen de sus contrapartes normales (Hanahan y Weinberg, 2011). Dos características destacadas de las células cancerosas son la capacidad de sobrevivir y proliferar en circunstancias inapropiadas y la capacidad de migrar de su ubicación original de tejido a lugares distantes, y allí continúan proliferando. Se cree que esta migración celular depende de la capacidad de las células cancerosas para cambiar sus propiedades adhesivas de célula a célula y célula a matriz y para sobrevivir durante el proceso. La acumulación de evidencias sugiere que el gen supresor tumoral RB puede regular estas dos características clave del cáncer, lo que explica su importancia como supresor tumoral (Engel et al., 2015).

La caracterización inicial de la función pRb fue guiada por estudios de virus tumorales de ADN (Chellappan et al., 1991; Cress y Nevins, 1996) que apuntaban al papel de pRb como un regulador de la transición G1/S (Sellers y Kaelin, 1997). Ahora se sabe que tanto las fases G1/S como G2/M del ciclo celular de los mamíferos está controlado por una vía molecular compleja y redundante que involucra miembros del factor de unión del promotor E2 (E2F) (Kovesdi et al., 1987; Engel et al., 2015), pRb4, cinasas dependientes de ciclina (CDK), ciclinas (Ewen et al., 1993) e inhibidores de familias de CDK (CDKN) (Sherr y Roberts, 1999). Esta vía se ve alterada en la mayoría de los tumores sólidos (Kaelin, 1999).

La fosforilación que inactiva a Rb, es inducida por subunidades catalíticas de las CDK en combinación con subunidades reguladoras específicas de la ciclina D y E (Okinaga, 2013).

El arresto celular puede ser causado por privación de factores de crecimiento y nutrientes. Sin factores de crecimiento las células llegan a ser quiescentes, disminuye su metabolismo, síntesis de proteínas, función y crecimiento celular (Blagosklonny, 2011). La ausencia de nutrientes no es el único factor que permite el arresto del ciclo celular, también se puede inducir mediante la inhibición de CDK p21, p16, p57, aún en presencia de suero (Blagosklonny, 2011).

Papel de IL-2 en células de cáncer de cérvix

Existen evidencias que anticuerpos contra el IL-2R inhiben la proliferación de células de cáncer de cérvix (Rocha *et al.*, 2004; Rangel *et al.*, 2010). También, se ha reportado que bajas dosis de IL-2 (10UI/ml) inducen proliferación de las células tumorales, sin embargo, altas dosis de IL-2 (100UI/ml) inducen disminución en la proliferación de células de cáncer de cérvix, es importante señalar que esta concentración induce mayor proliferación de linfocitos normales (Valle *et al.*, 2014). Altas dosis de IL-2 inducen la inactivación de JAK3, esto lleva a la disminución de la fosforilación de STAT5, la cual es capaz de regular la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo cual probablemente podría favorecer la muerte celular por apoptosis (Valle *et al.*, 2014).

Estudios recientes demuestran que la regulación de la apoptosis por las proteínas STAT es muy importante debido a la activación transcripcional de genes que codifican para proteínas que desencadenan el proceso de muerte celular programada conocido como apoptosis. Por ejemplo BCL-xL, caspasas, Fas y TRAIL (Battle y Frank, 2002), así como proteínas que regulan progresión del ciclo celular como: p21waf1, p53, p16kip, las ciclinas D y E, entre otras (Taylor *et al.*, 2008).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que líneas celulares provenientes de cáncer cervical, establecidas a partir de biopsias de pacientes mexicanas, expresan el receptor para IL-2 (IL-2R), y que la activación del receptor por IL-2 exógena activa la cascada de señalización que lleva a la proliferación (Rocha *et al.*, 2004). Además, se ha encontrado que la expresión del IL-2R se incrementa con la severidad de la lesión. Se ha observado una expresión muy baja del IL-2R en lesiones pre-cancerosas, mientras que la expresión en los tumores metastásicos es mayor (Rangel *et al.*, 1998). También han demostrado que el tratamiento con IL-2 induce una disminución en la fosforilación de proteínas involucradas en la proliferación de células cancerosas del cuello uterino, lo que podría inducir la disminución en la proliferación celular. Sin embargo, en las células de cáncer de cuello uterino, se desconoce por qué la IL-2 inhibe la proliferación de células de cáncer de cérvix.

Planteamiento del problema

Actualmente en México, el cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar de los principales tumores malignos que afectan a la población femenina. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la etiología, diagnóstico y tratamiento del cáncer de cérvix, sin embargo, aún no es claro el papel de la IL-2 en la proliferación, senescencia, ciclo celular y muerte en células de cáncer de cérvix. Desde hace varios años se han llevado a cabo estudios *in vitro* con líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix, como HeLa e INBL (línea celular derivada de cáncer de cérvix de una paciente mexicana); ambas líneas celulares expresan el receptor funcional para IL-2, una vez activado este receptor participa en la activación de vías de señalización, como la vía JAK-STAT, involucradas en proliferación, diferenciación y muerte celular.

Se ha reportado que el tratamiento con 100 UI de IL-2 induce inhibición de la proliferación de células INBL tanto *in vivo* como *in vitro* y, por el contrario aumenta la proliferación de linfocitos de sangre periférica *in vitro*. Pero aun se desconoce el mecanismo de acción de esta citocina para inhibir la proliferación de células de cáncer de cérvix.

Por tal motivo, en este trabajo se plantea analizar el efecto de IL-2 sobre la proliferación, apoptosis, senescencia y el ciclo celular de las líneas de cáncer de cérvix INBL y HeLa.

Hipótesis

El tratamiento con IL-2 sobre las células de cáncer de cérvix HeLa e INBL detendrá la proliferación celular e inducirá apoptosis.

Objetivo general

Analizar el efecto de IL-2 sobre la proliferación y apoptosis en las líneas de carcinoma de cérvix HeLa e INBL.

Objetivos particulares

1. Determinar la presencia de las cadenas alfa, beta y gama del receptor de IL-2 en la línea celular de carcinoma de cérvix HeLa.
2. Determinar la concentración de IL-2 inhibitoria de la proliferación celular.
3. Determinar si el tratamiento con IL-2
 - a) Induce apoptosis de las líneas celulares HeLa e INBL
 - b) Induce senescencia de las líneas celulares HeLa e INBL
 - c) Afecta el ciclo celular en HeLa e INBL
4. Determinar el efecto del tratamiento con IL-2 sobre la expresión de ciclina D1, p21, p53 y Bax en las líneas celulares HeLa e INBL.

Materiales y métodos

Material biológico: La línea celular HeLa (HPV 18, derivada de un adenocarcinoma), y la línea celular INBL (HPV 18, derivada de un carcinoma escamoso invasor estadio IVB), se cultivaron en medio RPMI-1640 (Microlab, México) suplementado con 5% suero fetal de bovino (SFB; Invitrogen, USA). Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C y humedad saturante.

Detección de proteínas de superficie

Para detectar proteínas de superficie se sembraron 3×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en cajas petri de 60mm (Nunc, Denmark), se incubaron en presencia y ausencia 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Transcurrido este tiempo las células se cosecharon, se realizó un lavado con 1ml de PBS y se pasaron a tubos eppendorf. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído (1%) por 20 minutos. La incubación con el anticuerpo primario anti-IL-2R α (BD Biosciences) acoplado con PE se incubó por hora y media a 4°C en agitación. La incubación con el anticuerpo anti-IL-2R γ (Santa Cruz Biotechnology) (1:100), se llevó a cabo por hora y media a 4°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células, se adicionó el anticuerpo secundario conjugado con FITC (Santa Cruz Biotechnology) (1:500) y se incubaron por 45 minutos a 4°C en agitación. La presencia de las proteínas se determinó por citometría de flujo en un citómetro FACSAria II de BD, USA. Los datos se analizaron con el programa Flowing Software versión 2.5.1.

Detección de proteínas intracelulares

Para detectar proteínas intracelulares se sembraron 3×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en cajas petri de 60mm, se incubaron en presencia y ausencia 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Transcurrido este tiempo las células se cosecharon, se realizó un lavado con 1ml de PBS y se pasaron a tubos eppendof. Las células se fijaron con paraformaldehído (1%) por 20 minutos. Se adicionó el anticuerpo primario (1:100) anti-IL-2R β , Anticuerpos: IL-2R α acoplado a PE, monoclonal antihumano CD25, clon M-A251, (Catálogo 555432, BD, EE. UU.). IL-2R β CD122 FITC anticuerpo monoclonal de ratón, clon TU27, (Catálogo 11-1228-42, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). IL-2R γ CD98 anticuerpo monoclonal, clon E-5, (Catálogo sc-376815, Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.). Anticuerpo secundario policlonal, cabra anti-ratón IgG1-FITC (Sigma Aldrich). Control de isotipos; anticuerpo monoclonal anti-IgG3-FITC ratón anti humano, clon HP-6050, (Catálogo F4641, Sigma Aldrich). Se incubaron por hora y media a 4°C en agitación. Pasado el tiempo de incubación se lavaron las células, se adicionó el anticuerpo secundario acoplado a FITC (Santa Cruz Biotechnology) (1:1500) y se incubaron por 45 minutos. Se utilizaron controles de isotipo para medir el nivel de señal de fondo no específica causada por anticuerpos primarios. Las células fueron incubadas con anticuerpos de control de isotipo (1:100) durante 1.5 horas a 4°C. PE Mouse IgG1, control de isotipo κ , clon MOPC-31C, (Catálogo 555749, BD Pharmingen) la mezcla se incubó durante 45 minutos. Los resultados se obtuvieron por citometría de flujo en un citómetro FACSAria II (BD, EE. UU.). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Flowing Software versión 2.5.1.

Tinción con cristal violeta.

El ensayo de proliferación celular se llevó a cabo sembrando 2×10^3 células de la línea celular de cáncer de cérvix HeLa e INBL en placas de 96 pozos y se incubaron en presencia de 10, 50 y 100UI/ml de IL-2 (R&D Systems) por 24 y 48 horas a 37° C. Se considero el control negativo incubando a las células a los mismos tiempos pero sin tratamiento. Una vez transcurrido el tiempo, se desechó el medio y las células fueron fijadas con glutaraldehído (SIGMA, USA) al 1.1% por

20 minutos. Posteriormente, fueron teñidas con cristal violeta (SIGMA, USA) al 0.1%, el cual se incorporó a los ácidos nucleicos. Finalmente, se agregó ácido acético al 10% y se leyó en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 750nm.

Ensayo de anexina-V

Para determinar la apoptosis celular se sembraron 1×10^5 células en cajas Petri de 60mm, se incubaron en presencia y ausencia 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Como control positivo para apoptosis se utilizaron células tratadas con puromicina (2 μ g/mL) durante 24 horas. Como control positivo para necrosis, las células se incubaron con 200 μ l de etanol por 20 minutos. La detección de apoptosis se realizó mediante la tinción con Annexina-V, usando el kit PE Annexin-V apoptosis Detection Kit de (BD Pharmingen, USA). Pasadas las 48 horas se despegaron las células y se tiñeron con PE Annexin V Apoptosis Detection Kit, siguiendo el protocolo del fabricante. El porcentaje de células apoptóticas se evaluó mediante citometría de flujo usando un citómetro FACSAria II de BD. Los datos se analizaron utilizando el software Flowing Software 2.5.1.

Fragmentación de ADN

Para determinar la fragmentación del ADN se sembraron 1×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en presencia de 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Las células fueron cosechadas, lavadas una vez con PBS y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1ml de DNAzol (Invitrogen), se resuspendió suavemente por inversión y se dejó reposar por 15 minutos a 4°C. Después, se agregó 1ml de etanol absoluto a cada muestra y se agitaron suavemente por inversión, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 12 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidando de no retirar el ADN. Se lavaron dos veces con etanol al 75% centrifugando a 12,000 rpm por 5 minutos. Se retiró el etanol con una micropipeta. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se rehidrató con agua libre de DNAsas

y RNAsas. Finalmente, los productos fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis con TBE 0.5% a 90 volts por 90 minutos. Las bandas se observan en el Digi-DOCIT imaging system (UVP High performance, USA).

Extracción de ARN

Para llevar a cabo la extracción de ARN se sembraron 1×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL con y sin 100UI/ml de IL-2 por 24 y 48 horas. Las células fueron lavadas con PBS y se agregó 1mL de trizol (Life Technologies). Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitaron suavemente y se centrifugaron a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa y se agregaron 500 μ L de isopropanol al 100%, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante, se realizaron lavados con etanol al 75% y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se secaron a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μ L de agua libre de nucleasas y se disolvió el ARN. Se cuantificó el contenido de ARN disolviendo 1 μ L en 199 μ L agua libre de nucleasas para tener una concentración de 1:200. Se determinó la concentración de ARN en un biofotómetro a una absorbancia de 260/280 nm (Biorad, California).

Retrotranscripción (RT-PCR)

El ADNc fue sintetizado con 3 μ g de ARNm usando por reacción enzima RevertAid M-MuLVRT 1 μ L, 5X First Strand Buffer 4 μ L, Oligo (dT) 4 μ L, 10 mM dNTP mix 2 μ L, RiboLockRnase Inhibitor 1 μ L (20 U/ μ L, llevado a un volumen de 20 μ L con agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción en el termociclador fueron 37°C por 1 hora.

PCR

Primer	Forward	Reverse	bp
BAX	GTGGTTGGGTGAGACTCCTC	GCAGGGTAGATGAATCGGGG	216
p53	GACACGCTTCCCTGGATTGG	GCTGCCCTGGTAGGTTTTCT	240
Ciclina D1	GCTGCGAAGTGGAAACCATC	CCTCCTTCTGCACACATTTGA	135
p21	ACTTCCTCCTCCCCACTTGT	CACCCTGCCCAACCTTAGAG	228
GAPDH	TTCTTTTGCCTCGCCAGCC	GATGACCCTTTTGGCTCCCC	500

El ADNc se amplifica con TaqPolimerasa usando los primers correspondientes:

Cada reacción se preparó con 3 μ L de Taq Buffer de reacción 10X, 2.5 μ L de $MgCl_2$, 0.1 μ L de Taq Polimerasa, 0.5 μ L de dNTPs 10 mM, 0.2 μ L del cebador de interés y 1,5 μ L de ADNc para un volumen final de 20 μ L con agua libre de RNasas. La amplificación se realizó en un termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler ALO28386) como sigue: 2 minutos a 94 °C; seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 30s, 55 °C por 30s, y 72 °C por 60s; y 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% a 90 a 100 voltios.

Determinación de senescencia

Se determinó la senescencia utilizando el kit Senescence Detection Kit (Biovisión, USA). Se sembraron 2.5×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en placas de 12 pozos, incubadas en presencia de 100UI/ml IL-2 por 96 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron con 1ml de PBS y se incubaron de 10 a 15 minutos con 500 μ L de solución de fijación a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS, se adicionaron 500 μ L de mezcla de solución de tinción (470 μ L de solución de tinción, 5 μ L de suplemento de tinción y 25 μ L de una solución 20mg/ml de X-gal) por cada pozo. Como control positivo de senescencia se utilizaron células incubadas en presencia de H₂O₂. El peróxido induce la presencia de radicales libres que activan la senescencia. Pasado el tiempo de incubación, se observaron las células al microscopio para determinar el desarrollo de color azul. Se contaron células en 10 campos según las instrucciones del fabricante para determinar el porcentaje de células senescentes.

Análisis del ciclo celular

La determinación del ciclo celular se realizó mediante la técnica de incorporación de yoduro de propidio (Sigma, USA). Se sembraron 1×10^6 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en cajas Petri de 60mm y se incubaron con y sin 100UI/ml de IL-2 por 24 y 48 horas. Las células se fijaron usando etanol (JT Baker, USA) al 70% por 12 horas y luego se eliminó el RNA incubando con RNAsa (Sigma, USA) durante una hora a 37°C. Las células se incubaron por 10 min con 3 μ L de yoduro de propidio (50mg/mL). Las fases del ciclo se determinaron usando citometría de flujo en un citómetro FACSAria II de BD, USA.

Efecto de IL-2 con cisplatino

Para determinar la cantidad de cisplatino necesaria para matar la mitad de la población celular (IC₅₀) se llevo a cabo una curva dosis respuesta. Se sembraron 1×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en cajas Petri de 60mm y se incubaron con y sin 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 μ g de cisplatino. Las células se incubaron por 48 horas.

Para determinar el efecto del cisplatino sobre células arrestadas en la fase G1 del ciclo celular se sembraron 1×10^5 células de cáncer de cérvix HeLa e INBL en cajas Petri de 60mm y se incubaron con y sin 100UI/ml de IL-2 por 48 horas. Pasado el tiempo se agregó cisplatino ($5 \mu\text{g/ml}$) por 24 y 48 horas. La detección de apoptosis se realizó mediante la tinción con Annexina-V, usando el kit PE Annexin-V apoptosis Detection Kit de (BD Pharmingen, USA). Se despegaron las células y se tiñeron con PE Annexin V Apoptosis Detection Kit, siguiendo el protocolo del fabricante. El porcentaje de células apoptóticas se evaluó mediante citometría de flujo usando un citómetro FACSaria II de BD. Los datos se analizaron utilizando el software Flowing Software 2.5.1.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5. Las comparaciones estadísticas de los resultados se evaluaron utilizando la prueba t de Student.

Resultados

Las líneas HeLa e INBL presentan las subunidades alfa, beta y gamma del receptor de IL-2 y su expresión aumenta con el tratamiento de IL-2

Con el fin de determinar si las células HeLa e INBL son sensibles al tratamiento con IL-2, se analizó la presencia del IL-2R en la membrana celular (Figura 2).

Los resultados muestran que las tres subunidades, tanto la cadena alfa, beta y gamma del receptor para IL-2 están presentes constitutivamente en las líneas celulares HeLa e INBL. Cuando las células se incuban en presencia de IL-2 aumenta la expresión de las subunidades. En la figura 2 se muestran los histogramas de las subunidades del receptor, A) HeLa y B) INBL.

En la figura 2C, se muestran las gráficas del promedio de tres ensayos independientes. La subunidad alfa de IL-2R es inducible con tratamiento con IL-2 en ambas líneas celulares, aunque se ve un aumento claro, éste no es significativo. La expresión basal de la subunidad alfa en las células HeLa aumenta del 6.07% al 16.36% en comparación con la expresión en las células INBL que aumentan del 7.32% al 16.8%. La expresión de la subunidad beta aumenta de 3.24% a 15.87% en células HeLa y de 5.08% a 17.69% en células INBL. La expresión de la subunidad gamma aumenta de 24.61% a 41.03% en las células HeLa, y en las células INBL, se observa un aumento de 4.48% a 34.25%.

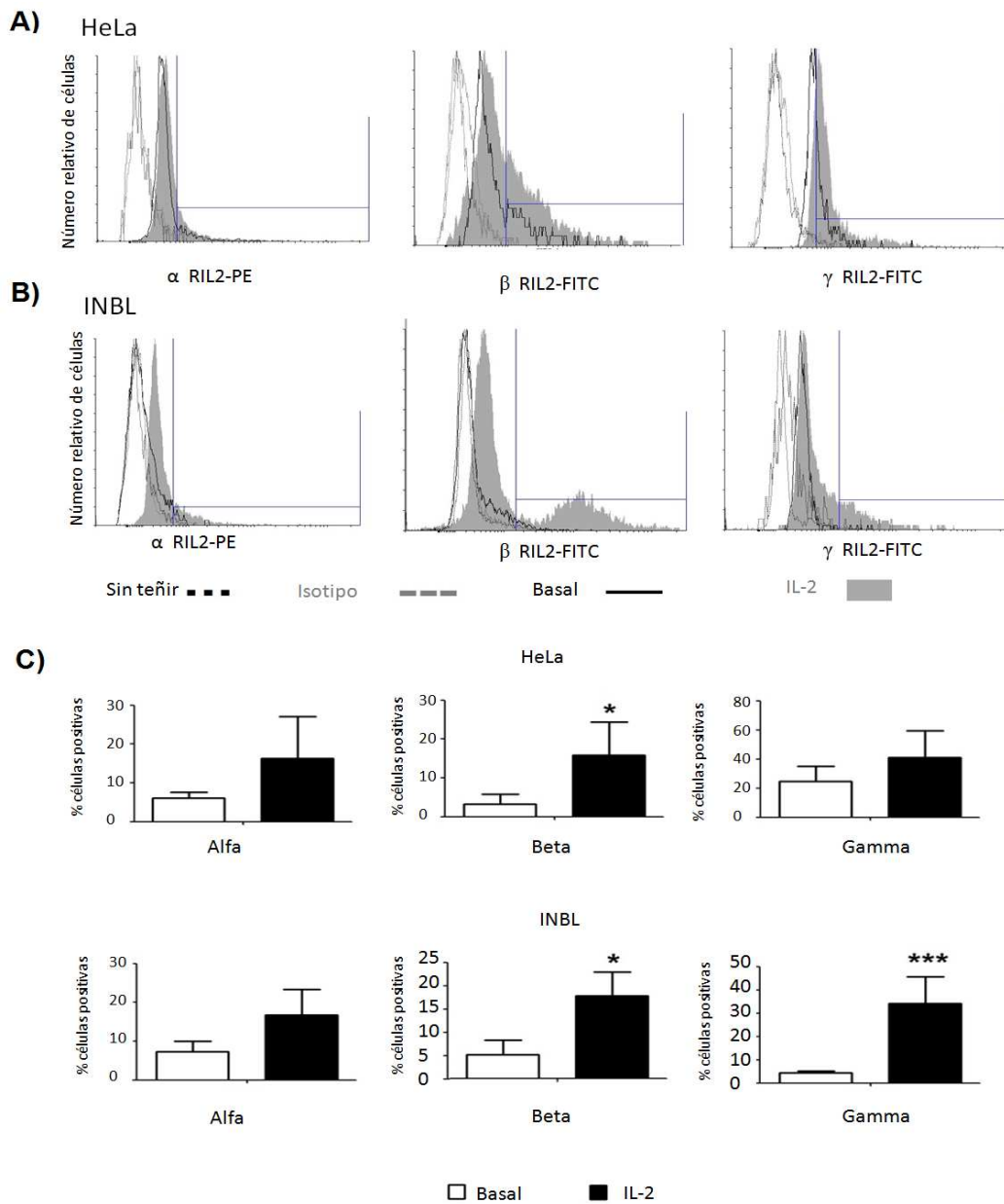


Figura 2. Cadenas IL-2 α , IL-2 β e IL-2 γ del IL2R en células HeLa e INBL. Se sembraron 3×10^5 células incubadas con y sin IL-2. En todos los histogramas las líneas negras punteadas representan el CAF (control de autofluorescencia), las rayas discontinuas grises representan el isotipo, la línea negra continua representa el área basal y el área gris sombreada representa las células tratadas con IL-2. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos independientes. A) HeLa. B) INBL. C) Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de la expresión de las subunidades del IL-2R. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

Una vez que se demostró que las células HeLa e INBL presentan el IL2R determinamos la cantidad de IL-2 necesaria para disminuir la proliferación celular en ambas líneas celulares.

IL-2 tiene efecto inhibitor sobre la proliferación

En investigaciones previas, nuestro equipo de trabajo demostró que el tratamiento con IL-2 inhibe la proliferación de células INBL a las 48 horas (Lagunas, 2014). Para corroborar en INBL y determinar en HeLa si la IL-2 afecta la proliferación de las líneas de cáncer de cérvix, se cultivaron células HeLa e INBL en presencia de 10, 50 y 100 UI/ml de IL-2 durante 48 horas (Figura 3). En la línea celular HeLa, observamos aumento en la proliferación celular del 24% con 10 UI de IL-2, y 0.08% con 50 UI de IL-2. Por el contrario, con 100 UI de IL-2 se observa disminución del 38.58% de la proliferación celular. En las células INBL con 10 UI la proliferación aumenta 18.6%, con 50UI de IL-2 disminuye de 7.4% y con 100 UI de IL-2 disminuye 27.1%. En ambas líneas celulares la disminución con 100UI/ml de IL-2 es estadísticamente significativa.

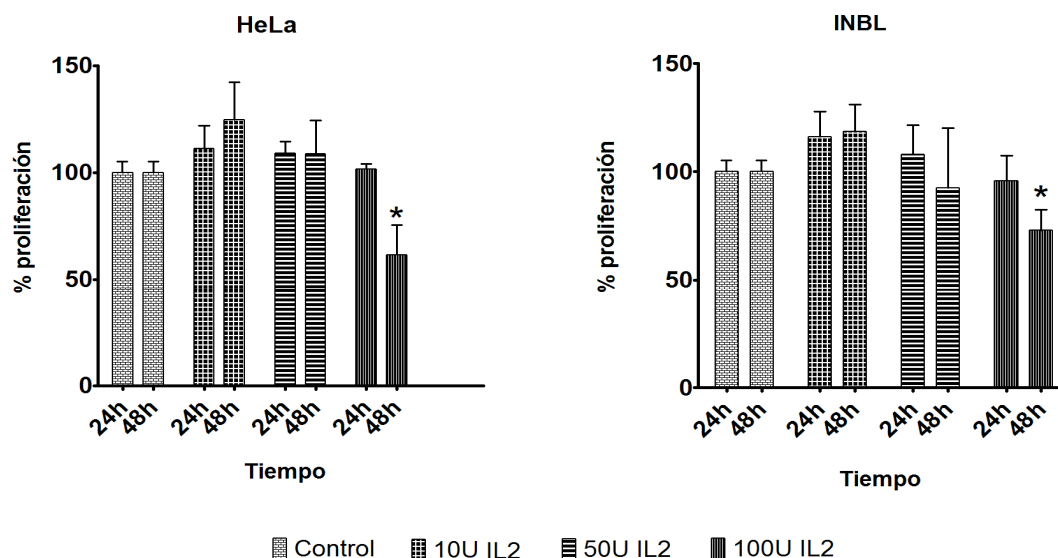


Figura 3. IL-2 inhibe la proliferación celular. Se sembraron 2×10^3 células y se incubaron en presencia de 10, 50 y 100 UI/ml de IL-2 por 24 y 48h. La proliferación se midió mediante la tinción con cristal violeta. * $P < 0.05$.

Efecto de IL-2 como inductora de apoptosis

Considerando que en ambas líneas celulares se inhibe la proliferación a las 48 horas en presencia de 100 UI de IL-2, decidimos analizar si se activa el proceso de apoptosis con el tratamiento con IL-2.

Una de las características de la apoptosis temprana es la exposición de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana celular. Para confirmar que el tratamiento con 100UI/ml de IL-2 sobre las células INBL y HeLa activa el proceso apoptótico, utilizamos la técnica de tinción con Anexina V. La incubación con IL-2 se llevó a cabo por 48 horas. Los resultados fueron obtenidos por citometría de flujo.

El tratamiento de las células HeLa con 100 UI/ml de IL-2 (Figura 4A) indujo una apoptosis temprana del 2.3% y una apoptosis tardía del 3.05% en comparación con el control. Para la línea celular INBL (Figura 4B), IL-2 indujo apoptosis temprana del 10.10% y apoptosis tardía del 3.97% en comparación con el control. La Figura 3C muestra los controles positivos para la apoptosis de las líneas celulares HeLa e INBL, y la Figura 3D muestra los gráficos de citometría de flujo del ensayo de apoptosis.

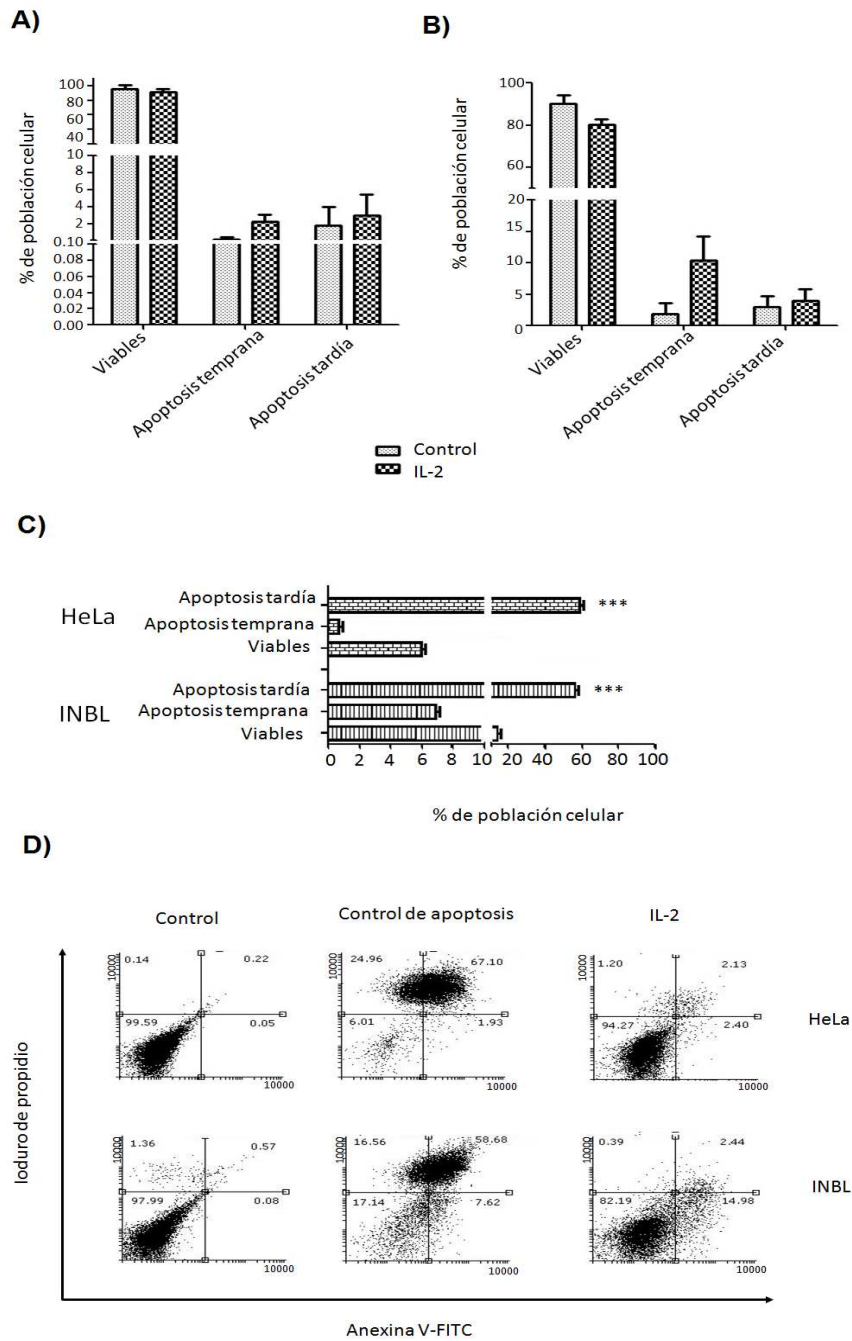


Figura 4. Determinación de apoptosis en las células tratadas con IL-2. Se sembraron 1×10^5 células incubadas en presencia y ausencia de IL-2 por 48h. En las células de cáncer cervical A) HeLa y B) INBL que fueron tratadas con 100UI/ml de IL-2 por 48 horas se observó apoptosis en bajo porcentaje de la población. C) células tratadas con puromicina como control positivo para apoptosis. D) imagen representativa de tres ensayos independientes. La tinción se evaluó por citometría de flujo en FACS Aria II. Análisis estadístico, T de Student. $P < 0.001$

En ambas líneas celulares se observó inducción de apoptosis en parte de la población, en etapa temprana. Para determinar si la apoptosis se mantiene activa se determinó fragmentación de DNA y determinación de la proteína pro-apoptótica Bax.

Uno de los procesos que se asocian con la apoptosis es la degradación de ADN de forma específica entre nucleosomas. Por tanto, las células HeLa e INBL fueron incubadas en presencia de 100UI/ml de IL-2 para analizar si el tratamiento induce fragmentación del ADN (Figura 5). En las células HeLa y en las células INBL se puede observar que el ADN de las células tratadas con IL-2 está íntegro ya que no se observa el patrón de escalera, a diferencia del ADN fragmentado de las células tratadas con puromicina, lo cual indica muerte por apoptosis.

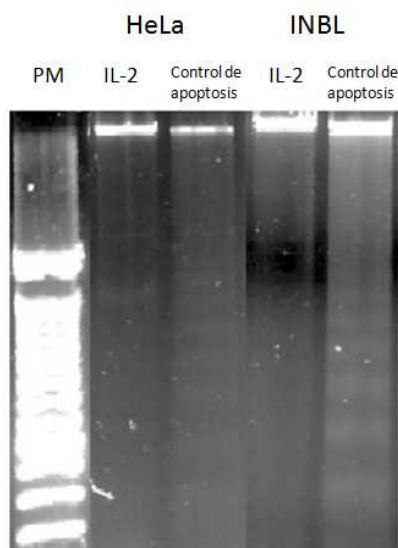


Figura 5. La IL-2 no induce fragmentación del DNA. Se sembraron 1×10^5 células en presencia de IL-2 por 48h. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. El ADN fue obtenido a partir de las células a las 48 horas, usando puromicina como control de inducción de fragmentación. El ADN de las células tratadas con IL-2, no se fragmentó en comparación con el patrón de fragmentación de DNA inducido por puromicina. Resultado representativo de uno de tres ensayos independientes.

Para definir la inducción de apoptosis se determinó la expresión de la proteína proapoptótica Bax en las líneas celulares HeLa e INBL. La expresión de la proteína Bax no se modificó en las líneas celulares con el tratamiento de la IL-2 (Figura 6 A, B).

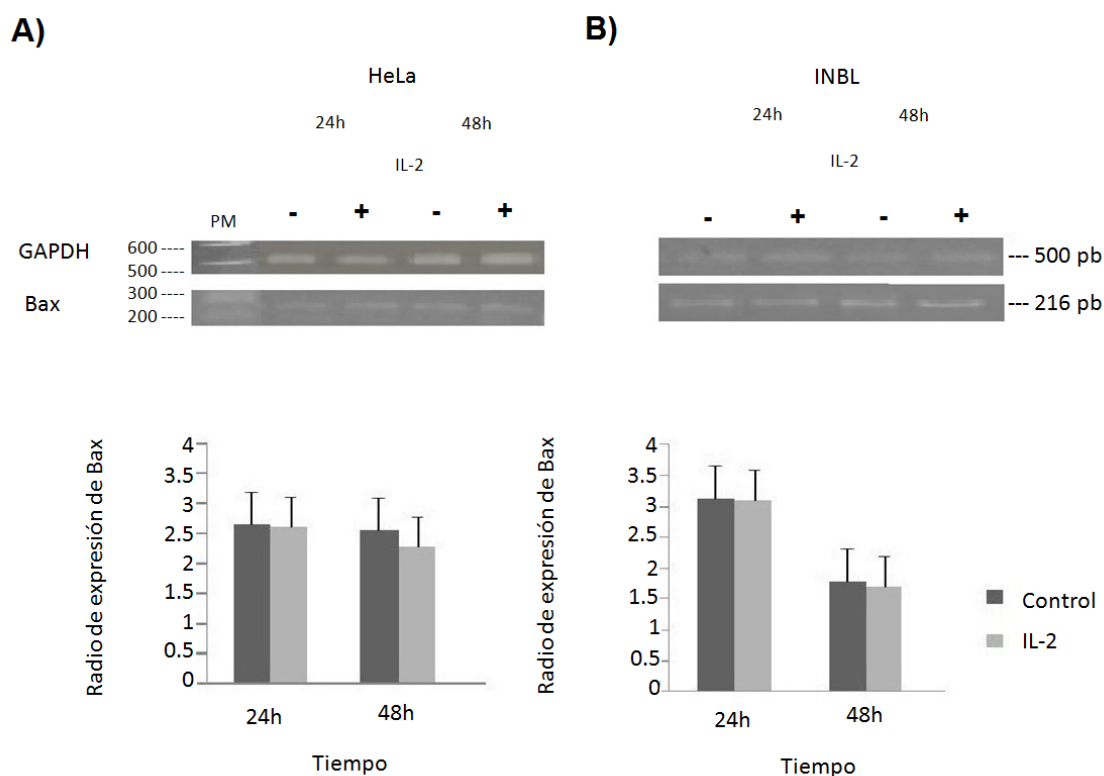


Figura 6. IL-2 no afecta la expresión de Bax. Electroforesis y radio de expresión de Bax en células de cáncer de cérvix. A) HeLa; B) INBL. Se analizó GAPDH como control de expresión. PM, marcador de peso molecular (tamaño en pares de bases).

La IL-2 no induce senescencia

Una vez que se determinó que la apoptosis solo se induce en menos del 15% de la población celular, al ser tratadas con IL-2, analizamos si la disminución de la proliferación observada se debía al proceso de senescencia. Utilizamos el kit comercial para determinar senescencia. De acuerdo con el fabricante, el sustrato X-gal es degradado por la β -galactosidasa asociada a senescencia al formar un

precipitando de color azul, lo cual permite determinar las células senescentes. Como control positivo usamos peróxido de hidrógeno ya que se ha reportado como inductor de senescencia (Chen y Ames, 1994). En la figura 7, podemos observar que la IL-2 no induce senescencia, en comparación con el control positivo. Por lo tanto, podemos descartar que la inhibición de la proliferación se deba a este proceso.

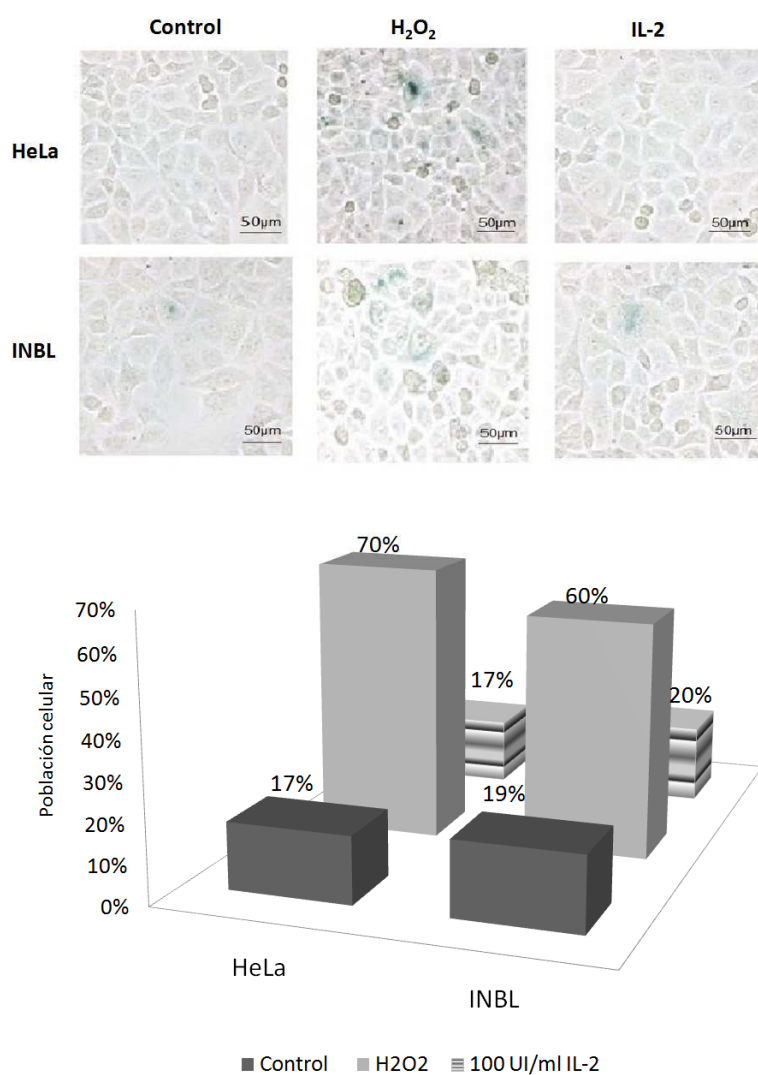


Figura 7. IL-2 no induce senescencia en células HELA e INBL. Las células HeLa e INBL fueron tratadas con 100 UI/ml de IL-2 por 96 horas y se analizó la actividad de beta-galactosidasa característica de células senescentes (color azul). Imagen representativa de tres ensayos independientes.

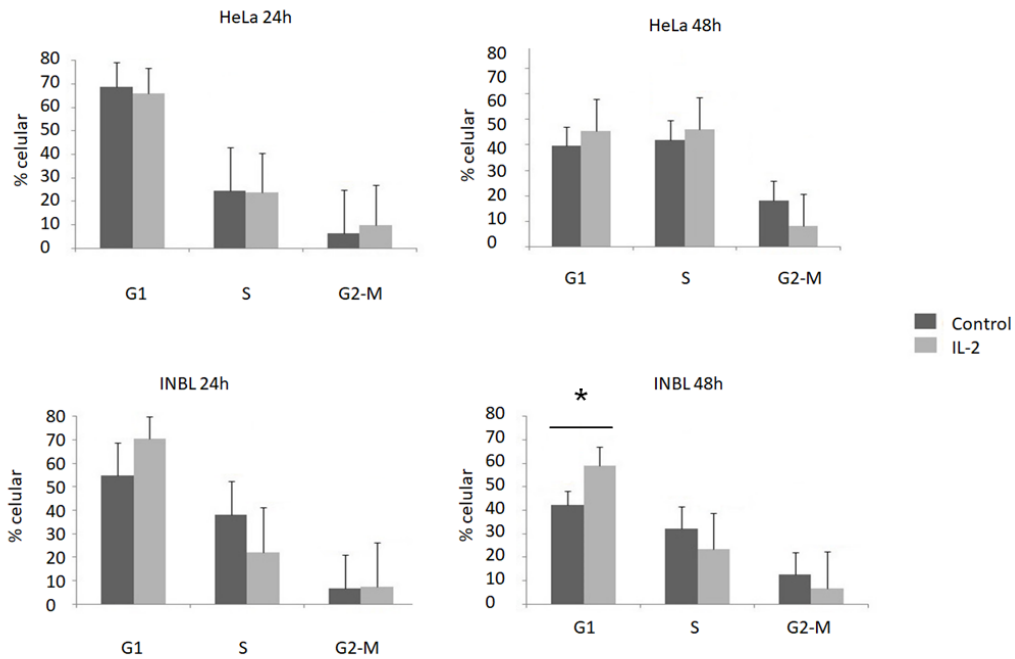
Al observar que la disminución de la proliferación no se debe al proceso de apoptosis, ni senescencia, analizamos las fases del ciclo celular.

Efecto de IL-2 sobre el ciclo celular en células de cáncer de cérvix

La regulación del ciclo celular asegura la fidelidad de la replicación genómica y la división celular para prevenir transmisión errónea de información genética. El ciclo celular es regulado por dos puntos principales localizados en la transición de G1/S y G2/M, la célula puede salir de ciclo o quedar detenida. En las líneas celulares de cáncer, evadir los puntos de control constituye una de las características más importantes.

Una población de células se incubó durante 24 y 48 horas con IL-2. A otra población celular, pasadas las 48 horas de incubación se le cambió el medio por medio fresco ausente de IL-2, y permaneció 24 y 48 horas más en incubación para determinar si el efecto de la IL-2 es permanente o transitorio. La distribución del DNA fue determinada durante las fases del ciclo celular mediante la tinción con yoduro de propidio (IP). En la línea celular HeLa no hubo modificación en las células tratadas con IL-2 comparadas con el control, a ningún tiempo (Figura 8A). En el caso de las células INBL el porcentaje celular aumenta de 44.1% a 59.2% en la fase G1; los resultados muestran que la IL-2 induce arresto del ciclo celular estadísticamente significativo en la fase G1 a las 48 horas. (Figura 8B). En las figuras 7C y D, se muestran los histogramas detallando la población correspondiente a cada fase del ciclo celular. Una vez que se retiró el medio con IL-2 las células salieron del arresto celular siguiendo el ciclo igual que las células sin tratamiento.

A)



B)

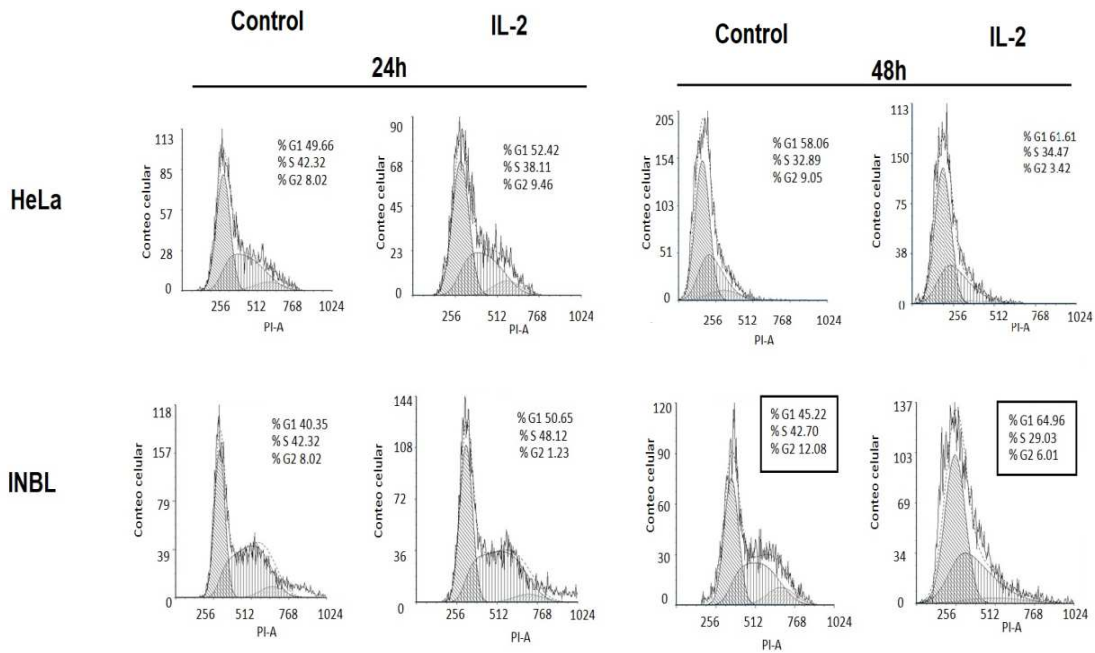
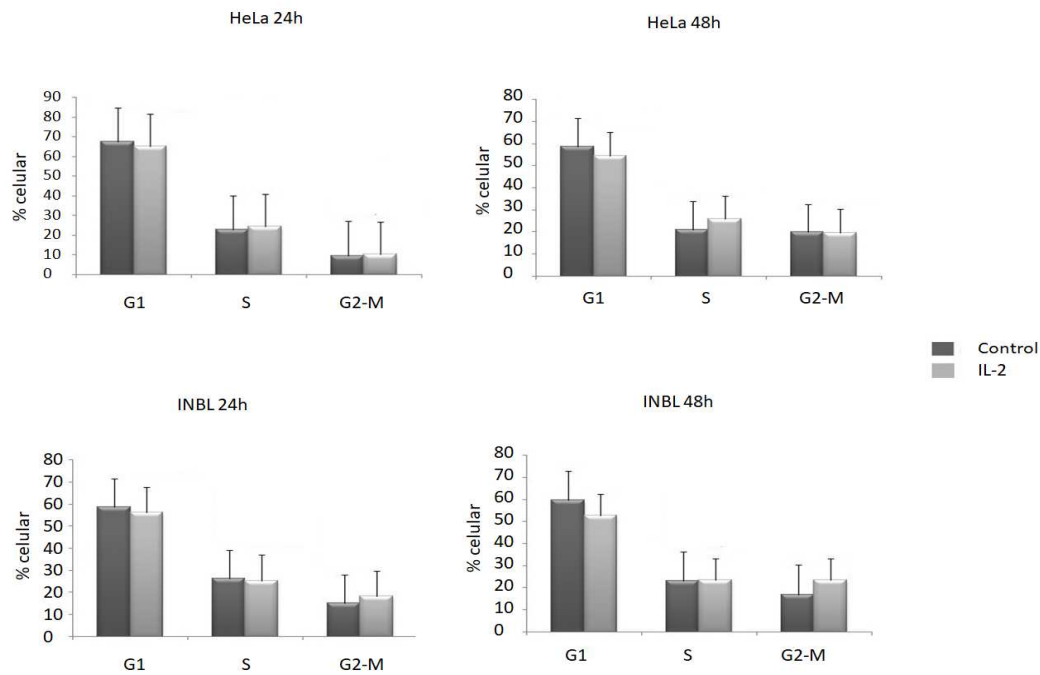


Figura 8. IL-2 induce arresto del ciclo celular en INBL pero no en HeLa. Se sembraron 1×10^6 células. Se incubaron con IL-2 por 24 y 48 h. A) Las gráficas muestran arresto del ciclo celular significativo en INBL a las 48h. B) histogramas representativos muestran el arresto en la fase G1 ciclo celular.

C)



D)

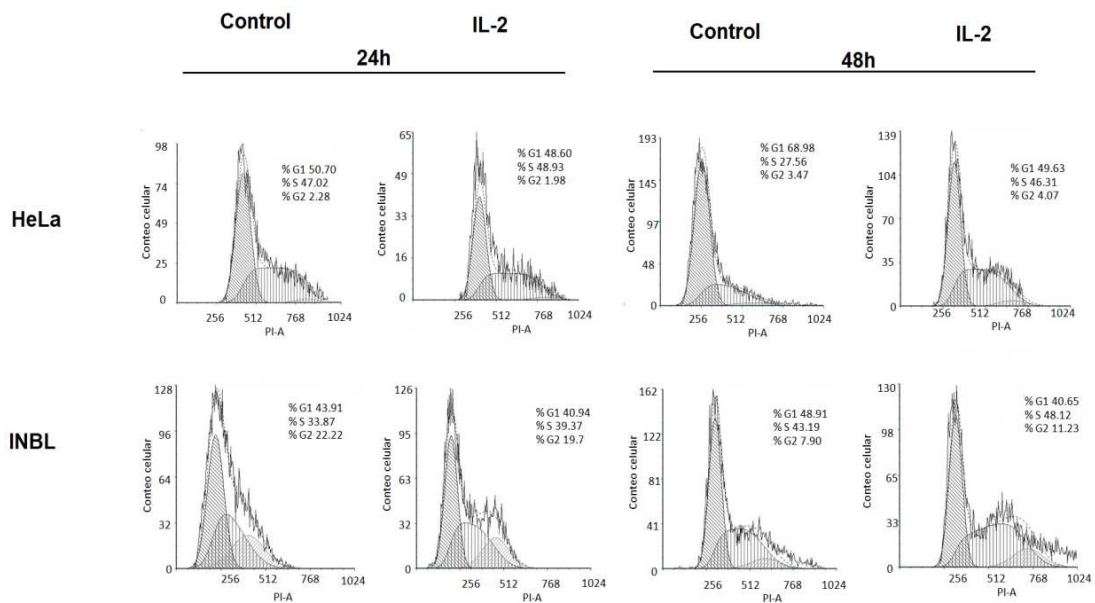


Figura 8. C, D) Posteriormente se cambio el medio por medio fresco sin IL-2 y se dejaron incubando por 24 y 48 horas más. En las gráficas y los histogramas se observa que pasado el tiempo las células salen del arresto celular. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes, las barras de error representan la DS, $P < 0.05$. La fracción de células en las fases del ciclo celular G1, S y G2/M fue monitoreada con IP y los resultados fueron obtenidos usando un citómetro FACSAria II. Los resultados fueron analizados con el programa FCS express 7 De Novo software.

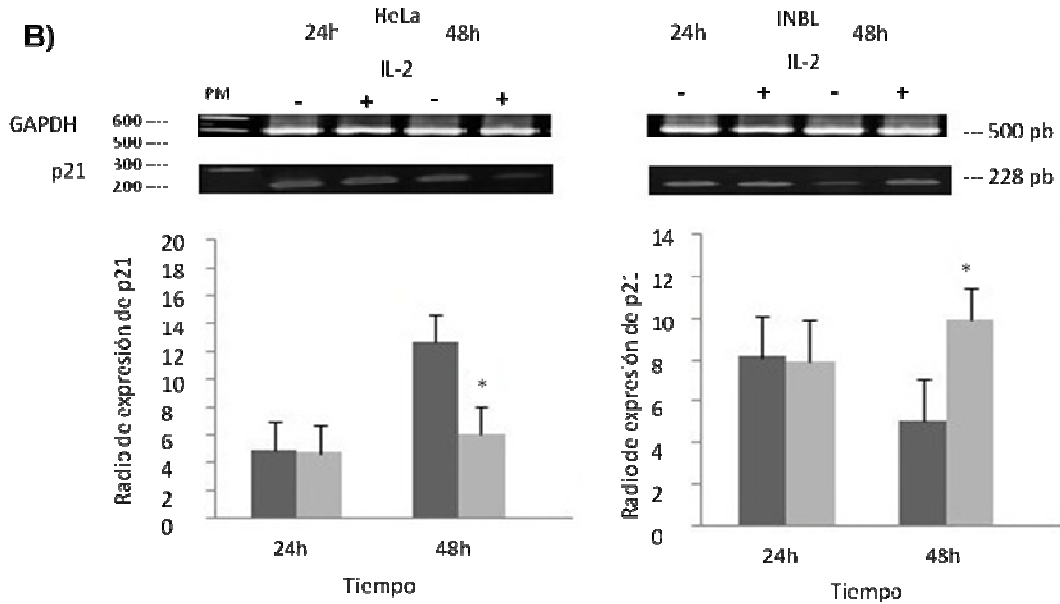
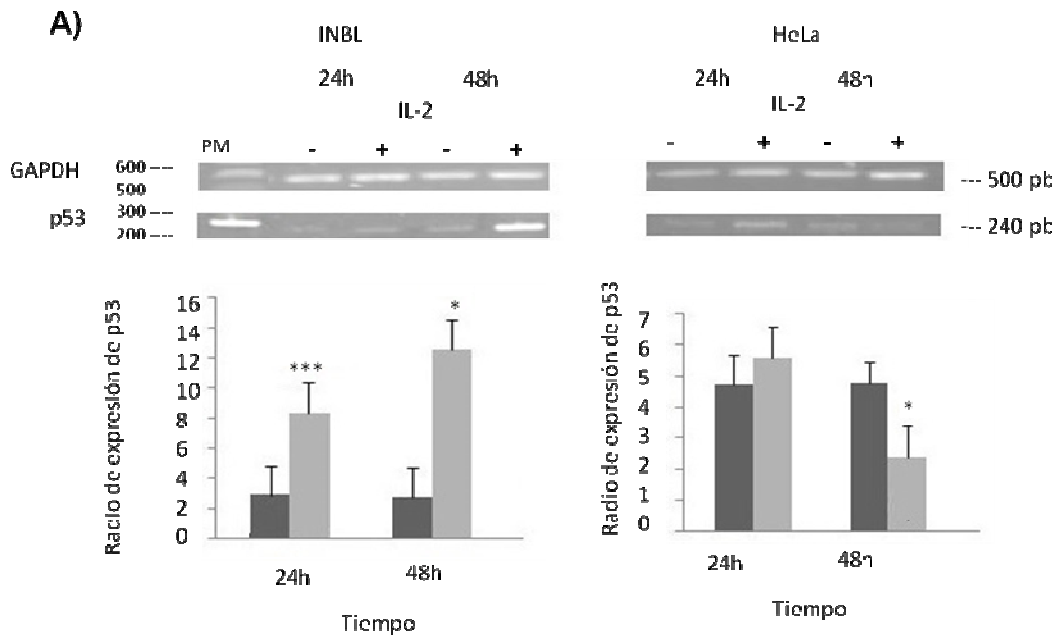
Expresión de las proteínas asociadas con la regulación del ciclo celular p53, p21 y ciclina D en líneas celulares de cáncer de cuello uterino tratadas con IL-2

Además del ciclo celular, se analizó la expresión de moléculas asociadas con la regulación del ciclo celular como p53, p21 y ciclina D. Los resultados muestran que la expresión del ARNm de p53 en la línea celular INBL tratada con IL-2 por 24h, aumenta de 3.3 a 8.2. A las 48h de tratamiento, la expresión aumentó de 3.1 a 12.9 (Figura 9A). Considerando estos resultados, p53 podría estar regulando el tránsito de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Para determinar si IL-2 indujo la activación de p53, la forma acetilada de p53 se midió por citometría de flujo, en los resultados se observa que en la línea celular INBL, p53 se activa a las 24 horas de 2.8 a 34.8% (Figura 9D).

Una vez observada la activación de p53 analizamos río abajo la expresión de p21 y ciclina D1.

La expresión del ARNm de p21 en la línea celular HeLa no se modificó a las 24h, a las 48h la expresión disminuyó de 13.5 a 5.8 (Figura 9B).

La expresión del ARNm de ciclina D solo se modificó en la línea celular INBL, disminuyendo la expresión de 22.6 a 7.7 (Figura 9C). Los resultados muestran que IL-2 induce un aumento en la expresión de ciclina D1 a las 24 horas en ambas líneas celulares.



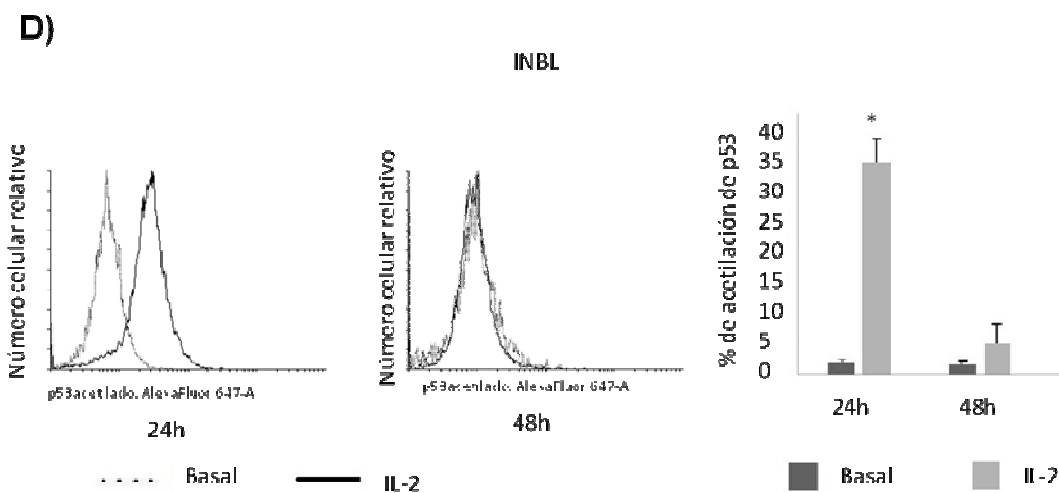
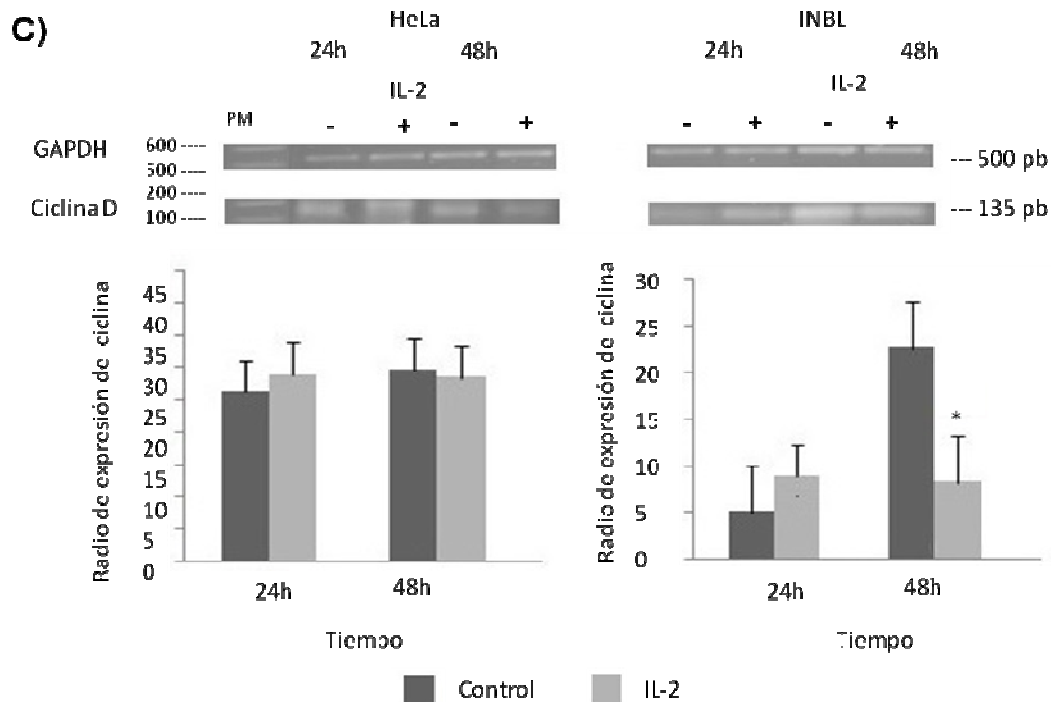


Figura 9. IL-2 aumenta la expresión de p53 en células HeLa e INBL. Las células se incubaron en presencia o ausencia de 100 UI/ml de IL-2 durante 24 y 48 horas. El ARNm se separó, se cuantificó y se retrotranscribió mediante RT-PCR estándar. Los productos de PCR se separaron por electroforesis. Se muestra la expresión y análisis por densitometría de (A) p53, (B) p21 y (C) Ciclina D en células INBL y HeLa. D) Activación por acetilación de p53. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de datos pareados no paramétricos. Se realizó utilizando el paquete estadístico GraphpadPrism5.0. * P < 0.05. ***P < 0.001.

Efecto del cisplatino sobre las células tratadas con IL-2

Una vez que determinamos que el tratamiento con IL-2 solo induce apoptosis en 15% de la población y que el arresto celular es transitorio, se diseñó un experimento para determinar si las células arrestadas podrían ser inducidas a muerte por apoptosis. Consideramos el uso de cisplatino pues se ha demostrado que induce apoptosis y se hizo una curva dosis respuesta para determinar la IC50. La concentración que se consideró para los subsecuentes experimentos fue de 5µg/ml tanto para células HeLa como para INBL (Figura 10).

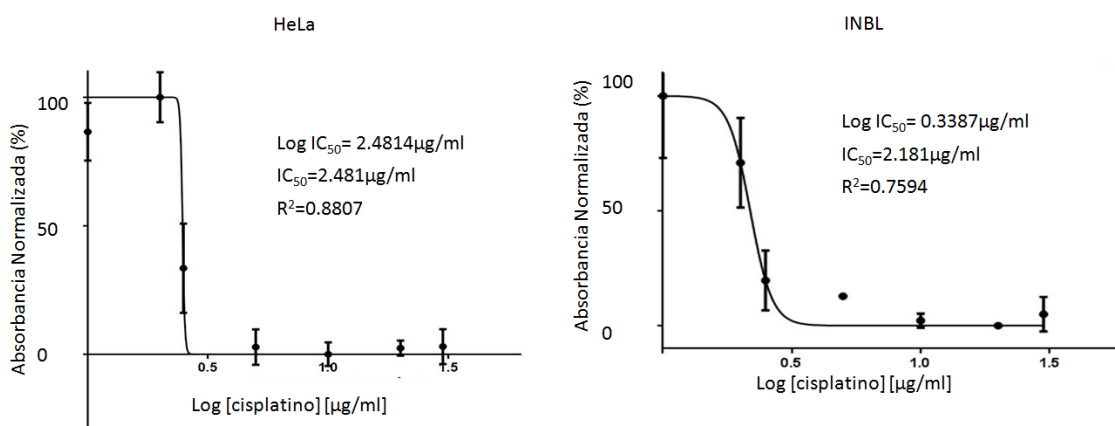


Figura 10. IC50 del cisplatino. Se sembraron 1×10^5 células HeLa e INBL se incubaron con 1, 2.5, 5, 10, 20 y 30 µg/ml de cisplatino durante 48 horas. El cálculo de la dosis en escala logarítmica se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5.

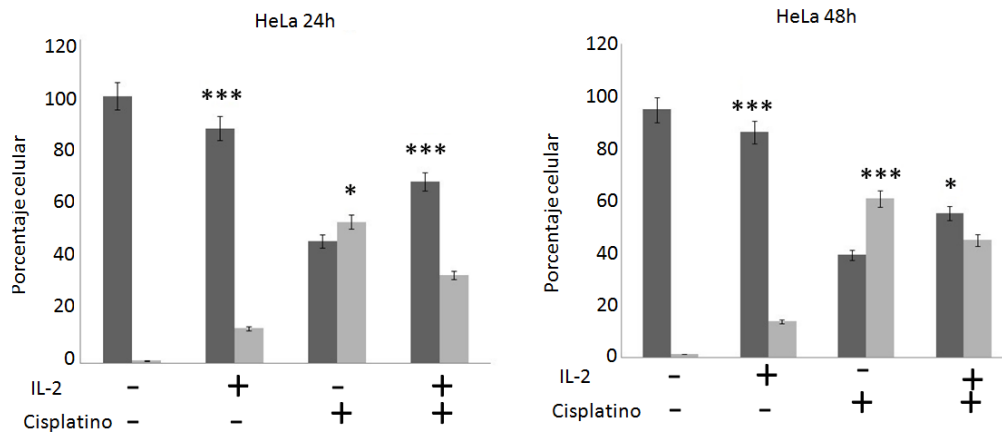
Una vez determinada la concentración de cisplatino para inducir muerte celular, las células se arrestaron con IL-2 para posteriormente incubarlas con cisplatino por 24 y 48 horas.

En todos los casos aumentó la viabilidad celular de los cultivos arrestados y posteriormente tratados con cisplatino, en comparación con las células que únicamente fueron tratadas con cisplatino. En las células HeLa el porcentaje de

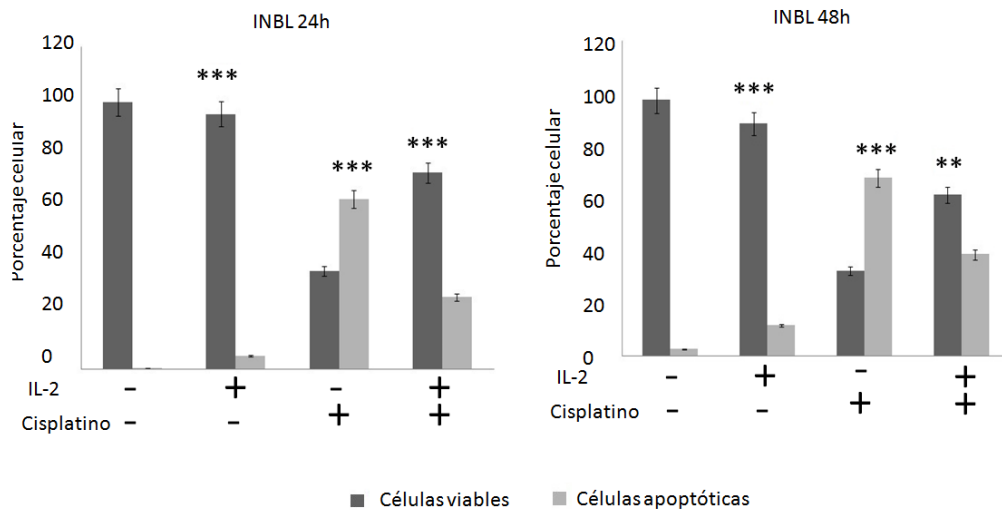
apoptosis pasó de 53.7% a 28.9% a las 24h. A las 48h el porcentaje de apoptosis paso de 61.2% a 48.6% (Figura 11A).

En las células INBL el porcentaje de apoptosis paso de 58.9% a 18.4% a las 24h. A las 48h el porcentaje de apoptosis paso de 72.3% a 44.6 (Figura 11B). En la figura C se muestran los dot plots correspondientes.

A)



B)



c)

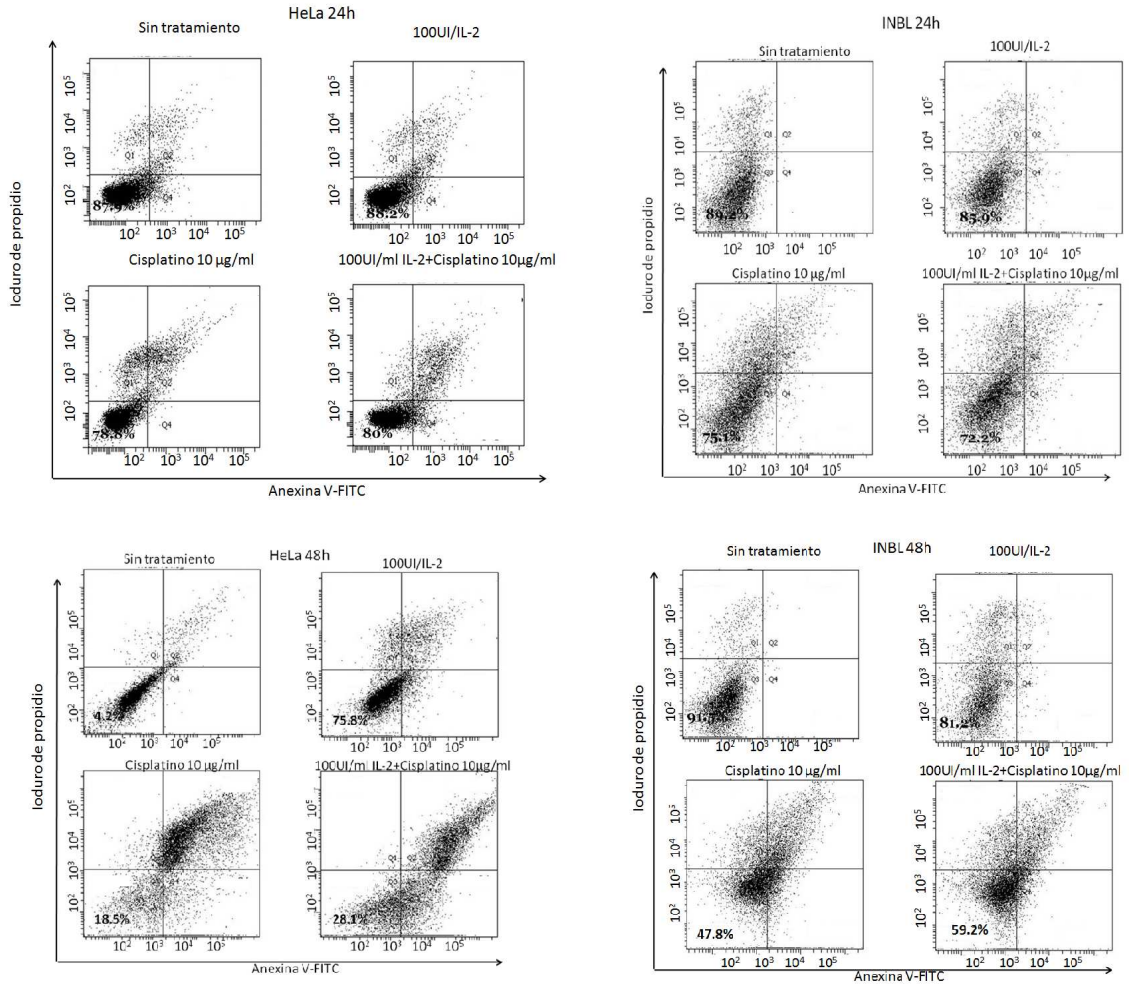


Figura 11. HeLa e INBL son resistentes a apoptosis al ser arrestadas en G1 y posteriormente tratadas con cisplatino. Las células se incubaron con IL-2 por 48 horas para inducir el arresto celular en la fase G1, y posteriormente se adicionó cisplatino por 24 y 48 horas, se consideraron los controles sin tratamiento y células tratadas únicamente con cisplatino. Los resultados se obtuvieron por citometría de flujo. A) Hela. B) INBL. C) Dot plots representativos de tres ensayos independientes.

Se obtuvieron fotografías de un experimento representativo de tres ensayos independientes. En las fotografías se observa la morfología de las células sin tratamiento, con IL-2, con cisplatino y células arrestadas con IL-2 y posteriormente tratadas con IL-2. En las células sin tratamiento se pueden observar células adheridas, con morfología extendida y con baja cantidad de células en proceso de muerte. En las células con IL-2 la mayoría de las células permanecen adheridas, pero se observan más células en proceso de muerte. En las células con cisplatino se observa al menos la mitad de las células muertas, han perdido la adherencia y turgencia. En las células que fueron arrestadas previo a la incubación con cisplatino se observan tanto células adheridas, extendidas y turgentes, como células es proceso de muerte (Figura 12).

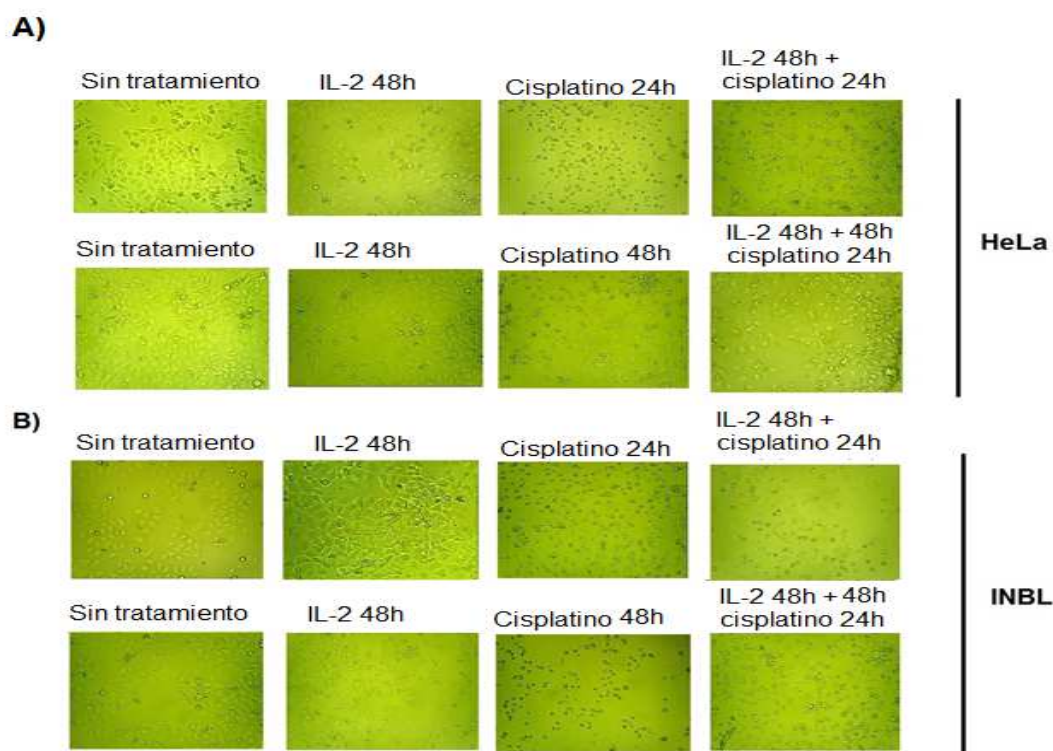


Figura 12. IL-2 induce arresto en G1 y protege a las células de apoptosis inducida por cisplatino. Las células fueron incubadas con IL-2 por 48 horas para inducir el arresto celular y se trataron con cisplatino por 24 y 48 horas. Se muestran imágenes de la morfología de las células. A) Hela. B) INBL. Imágenes tomadas con una cámara Leica acoplada al objetivo 10x de un microscopio de inversión.

Discusión

Las terapias de blancos moleculares son usadas en el tratamiento de muchos tipos de cáncer como primera línea terapéutica. Muchos cánceres se originan por la desregulación de las vías de señalización y el desarrollo de fármacos se ha enfocado en moléculas que bloquean específicamente a las causantes del cáncer. Se ha reportado que la heterogeneidad de las células malignas es la principal causa de la pobre eficiencia y duración de los tratamientos. Además, las células tumorales malignas que responden a un tratamiento terapéutico particular pueden adaptarse rápidamente y desarrollar resistencia al tratamiento cambiando la vía de señalización y beneficiándose de la comunicación cruzada. Por tal motivo, surge la necesidad de buscar nuevos blancos moleculares e innovar en el desarrollo de agentes terapéuticos.

Las citocinas, incluyendo a la interleucina 2 (IL-2), son una atractiva solución que pueda cumplir con las demandas terapéuticas, ya que la IL-2 juega un papel muy importante en las redes de transducción de señales mediando procesos celulares fundamentales como diferenciación celular, proliferación, apoptosis, transcripción, metabolismo y comunicación intracelular.

Se ha reportado que la IL-2 es una citocina proinflamatoria producida por el organismo, es capaz de activar a los linfocitos del sistema inmune y ha sido utilizada como método de control para diabetes tipo 1, melanoma metastásico, cáncer de riñón, cabeza y cuello, intestino, colon y esófago. Desde hace 20 años se han llevado a cabo estudios con IL-2, la cual se clasifica como un "modificador de la respuesta biológica", que modula la respuesta del organismo frente a las células cancerosas (Iwamuro *et al.*, 2016; Pham *et al.*, 2016; Perdigoto *et al.*, 2016).

Considerando que la IL-2 es utilizada en tratamientos contra diferentes tipos de enfermedades, incluyendo el cáncer, es importante conocer su efecto sobre las células de carcinoma de cérvix HeLa e INBL para determinar su posible uso como un agente terapéutico o como adyuvante en el tratamiento de este tipo de cáncer.

En este contexto en este trabajo presentamos evidencias del efecto de 100UI/ml de IL-2 sobre la proliferación, apoptosis, senescencia y ciclo celular de las células de cáncer de cérvix HeLa e INBL.

Algunos grupos han reportado la presencia del receptor para IL-2 en la línea de carcinoma de cérvix HeLa (Otero 1995, Presnell *et al.*, 2012; Rudnicka *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), por lo que nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por diversos grupos de trabajo. Como se observa en los resultados, la línea celular transformada INBL tiene las cadenas $\alpha\beta\gamma$, tal como lo reporta Rangel, (Rangel *et al.*, 1998). En este estudio nosotros confirmamos estos datos, además de observar las tres cadenas en la línea celular HeLa.

Se ha reportado que carcinomas humanos expresan de manera abundante IL-2R β e IL-2R γ y muy poco IL-2R α en la superficie celular en ratones desnudos. También se ha reportado la expresión de IL-2R α , IL-2R β en una variedad de células normales y malignas incluyendo fibroblastos embrionarios humanos (Plaisance *et al.*, 1992) células de melanoma (Rimoldi *et al.*, 1993), células de pituitaria (Arzt *et al.*, 1992) y células del epitelio intestinal (Ciacci *et al.*, 1993). La presencia de la IL-2R β en carcinoma humano parece ser necesario para el crecimiento de líneas celulares tumorales (Lin *et al.*, 1995). Nuestros resultados muestran que la IL-2 induce la expresión de las subunidades beta y gamma en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL. En previos reportes se mostró la presencia de las subunidades del IL-2R, pero no habían sido comparadas con la expresión basal de dichas subunidades. Por lo que en este trabajo se aporta que las subunidades del IL-2R son inducibles con IL-2 exógena.

Una vez determinada la presencia de las tres subunidades del receptor de IL-2, las líneas HeLa e INBL fueron tratadas con 100UI/ml de IL-2 para evaluar el efecto sobre la proliferación celular mediante la técnica de tinción con cristal violeta. Los resultados muestran que el tratamiento con IL-2 tiene efecto inhibitorio de la proliferación, tanto en células HeLa como en células INBL a las 48 horas. Estos resultados muestran que ambas líneas son sensibles al tratamiento, tal como se ha reportado anteriormente (Zhao *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2010). En estudios

previos se muestra que se inhibe la proliferación de las células CALO e INBL tratadas con 100UI/ml de IL-2 a las 48 horas (Alvarado 1997; Lagunas, 2014).

Una posible explicación sobre el proceso que induce la disminución de la proliferación con el tratamiento con IL-2 puede ser que se activa el proceso de muerte por apoptosis en las células de cáncer de cérvix. Para determinar si se induce apoptosis, analizamos el proceso con tres técnicas diferentes, cada una de ellas destinada a determinar las etapas de la apoptosis (desde el inicio hasta la culminación) y para nuestra sorpresa encontramos que no toda la disminución de la proliferación celular es causada por apoptosis, ya que alrededor del 70% de las células son viables.

Para determinar si la disminución celular se debía a que las células eran inducidas a senescencia se determinó la presencia de la Beta-galactosidasa asociada a este proceso en células tratadas con IL-2 por 96 horas. Los resultados obtenidos muestran que las células no son senescentes con el tratamiento, ya que la presencia de la beta-galactosidasa fue la misma que la observada en el control sin tratamiento.

Hasta este punto no se pudo determinar qué proceso inducía la disminución de la proliferación, por lo que decidimos analizar las fases del ciclo celular. En los resultados obtenidos al analizar el ciclo celular, se observó arresto en la fase G1 a las 48 en las células INBL. Cabe mencionar que a los cultivos celulares incubados con IL-2 por 48 horas les fue retirado el medio condicionado y reemplazado por medio fresco, los resultados fueron muy interesantes ya que la proliferación en ambas líneas celulares siguió adelante, por lo que el arresto inducido por IL-2, al parecer es transitorio. En muchas células, el arresto puede culminar en senescencia o apoptosis, pero en la mayoría de los casos el arresto celular es transitorio. Por ejemplo, la exposición de los fibroblastos a la radiación y promueve detención reversible en la fase G1 o detención irreversible, similar a la senescencia, dependiendo de la tasa de dosis de irradiación o tasa de daño en el ADN (Di Leonardo *et al.*, 1994). Es probable que se haya activado un mecanismo

similar al inducido por la radiación, pero esto deberá analizarse en otra serie de experimentos.

Se ha observado en leucemia de células T en adultos (del inglés Adult T-cell leukemia, ATL), que estas células requieren IL-2 para su proliferación y sobrevivencia, y al retirarles la IL-2 se observó el arresto en G1 seguido de apoptosis; la molécula responsable de esto fue p27Kip1, además de que se detectó una disminución de la expresión de Bcl-xL y un ligero aumento de Bax (Fujimura *et al.*, 2004). La progresión del ciclo celular está regulada por diversos mecanismos mediados por IL-2, entre ellos la expresión de miRNAs, por ejemplo, el factor de transcripción FOXO1 es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular vía inducción del inhibidor p27Kip1; también es capaz de inducir a la proteína pro-apoptótica Bim. FOXO1 puede ser inhibido de manera postranscripcional por la IL-2, debido a la inducción del microRNA miR-182 (Stittrich *et al.*, 2010).

Valle y colaboradores en 2014 reportaron que la desfosforilación de STAT5 podría estar implicada en la disminución de la proliferación celular. Reportes previos han mostrado que STAT5 tiene blancos moleculares tanto en vías de muerte (Bcl-XL, Bcl-2, Fas, TRAIL) como en vías de proliferación (p21, p53, ciclina D, ciclina E) (Lessene *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008). Varios estudios han reportado activación constitutiva de STAT1, STAT3 y STAT5 en diversas líneas celulares tumorales de humanos. Considerables evidencias sugieren que la activación constitutiva de STAT3 y STAT5 está involucrada en la formación y progresión de tumores, así como la inhibición de apoptosis (Xiong *et al.*, 2009). Se ha reportado que en células tumorales en monocapa y en tumores humanos *in situ*, la IL-2 es expresada en células en división (Reichert *et al.*, 1998). En células tumorales la IL-2 puede mediar la progresión del ciclo celular al regular los niveles de expresión de los inhibidores de CDK.

Por tanto, analizamos el estado de activación o inhibición de proteínas relacionadas con la regulación de la fase G1 del ciclo celular como, p53, p21 y ciclina D, para determinar las causas del arresto celular en la fase G1. Los

resultados obtenidos para p53 muestran que la disminución de la proliferación, así como el arresto celular en INBL se debe a que p53 está activada, ciclina D está disminuida y p21 sobre-expresada. En los datos obtenidos para HeLa se observa que p53 y p21 disminuyen, lo cual puede explicar porque en HeLa no se observa arresto celular.

En la línea celular HeLa se ha reportado una disminución de la expresión de p53, como resultado de la degradación inducida por la proteína E6 del papilomavirus, es posible que en estas células, p53 no tenga un papel importante en el proceso de apoptosis. Esto es relevante dado que la función de p53 en el arresto de la fase G1 es abolido (Maldonado et al., 1997).

Para determinar si las células arrestadas en G1 son susceptibles a la apoptosis inducida por cisplatino, las células HeLa e INBL fueron tratadas con este agente quimioterapéutico. Al analizar el efecto del cisplatino en células de cáncer de cérvix, encontramos que éste induce muerte celular a la mitad de la población cuando las células son arrestadas con IL-2 y posteriormente tratadas con cisplatino, la apoptosis se reduce significativamente. Un estudio realizado en células HeLa mostró que la reparación del DNA es una limitante en la resistencia de los tratamientos inductores de apoptosis (Chao, 1994).

La apoptosis inducida por cisplatino en células tumorales generalmente depende de la ruta de p53. Sin embargo, cuando los tumores poseen mutaciones de p53, el cisplatino no induce la apoptosis tan eficazmente, y los efectos clínicos del platino se restringen en consecuencia. Varios estudios han demostrado que las pacientes con cáncer de ovario avanzado que presentan mutaciones de p53 o sobreexpresión de p53 muestran baja sensibilidad a la quimioterapia que contiene cisplatino (Righetti et al.,1996; Sato et al.,1999). El cisplatino es un agente utilizado como quimioterapéutico ya que causa rompimiento de la doble cadena de DNA formando aductos (Cohen y Lippard, 2001; Siddik, 2003). Se ha reportado que el tratamiento de células de cáncer humano con cisplatino propicia arresto en la fase G2 independientemente de la activación de p53 (Strathdee et al., 2001).

Reyes y colaboradores en el 2018 reportaron que un subconjunto de células después de una semana de irradiación UV, detuvieron su ciclo celular, luego escaparon del arresto y se dividieron. Usando reporteros fluorescentes y modelos matemáticos, determinaron que las fluctuaciones en el patrón oscilatorio del gen supresor tumoral p53, desencadenaba un cambio brusco entre p21 y CDK2, lo que permitió a las células escapar del arresto celular (Reyes *et al.*, 2018).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento con IL-2 induce arresto transitorio del ciclo celular y protege a las células de entrar en apoptosis. Todos estos resultados nos sugiere que deben existir otros factores que permitan a la célula sobrevivir, uno de esos posibles factores pudieran ser mecanismos relacionados con la reparación del ADN.

De acuerdo a nuestros resultados la detención del ciclo celular en la fase G1 observada en este trabajo está mediada por la transcripción dependiente de p53 y del inhibidor de CDK p21. Al parecer durante la detención del ciclo celular se está reparando el DNA y la célula continuará hacia la fase S. La reparación del DNA activada por p53 no permite el inicio de la apoptosis, por lo que la expresión del gen pro-apoptótico Bax no aumenta. Posiblemente el efecto dual de acción de la IL-2 (activación de muerte y activación de la proliferación) permite que las células sigan proliferando. Considerando los resultados del grupo de trabajo en los que se ha analizado la vía de señalización JAK-STAT y se ha observado una disminución de la fosforilación en las proteínas JAK3 y STAT5, consideramos que estas moléculas podrían ser clave en la activación río abajo de proteínas involucradas en proliferación como se observa en el modelo propuesto (Figura 13).

Aunque la hipótesis de este trabajo sugiere que la IL-2 podría ser usada como tratamiento contra el cáncer de cérvix, debido a los antecedentes de su uso favorable en otros tipos de cáncer, los resultados de este trabajo muestran que el tratamiento con IL-2 confiere resistencia a las células de morir por apoptosis.

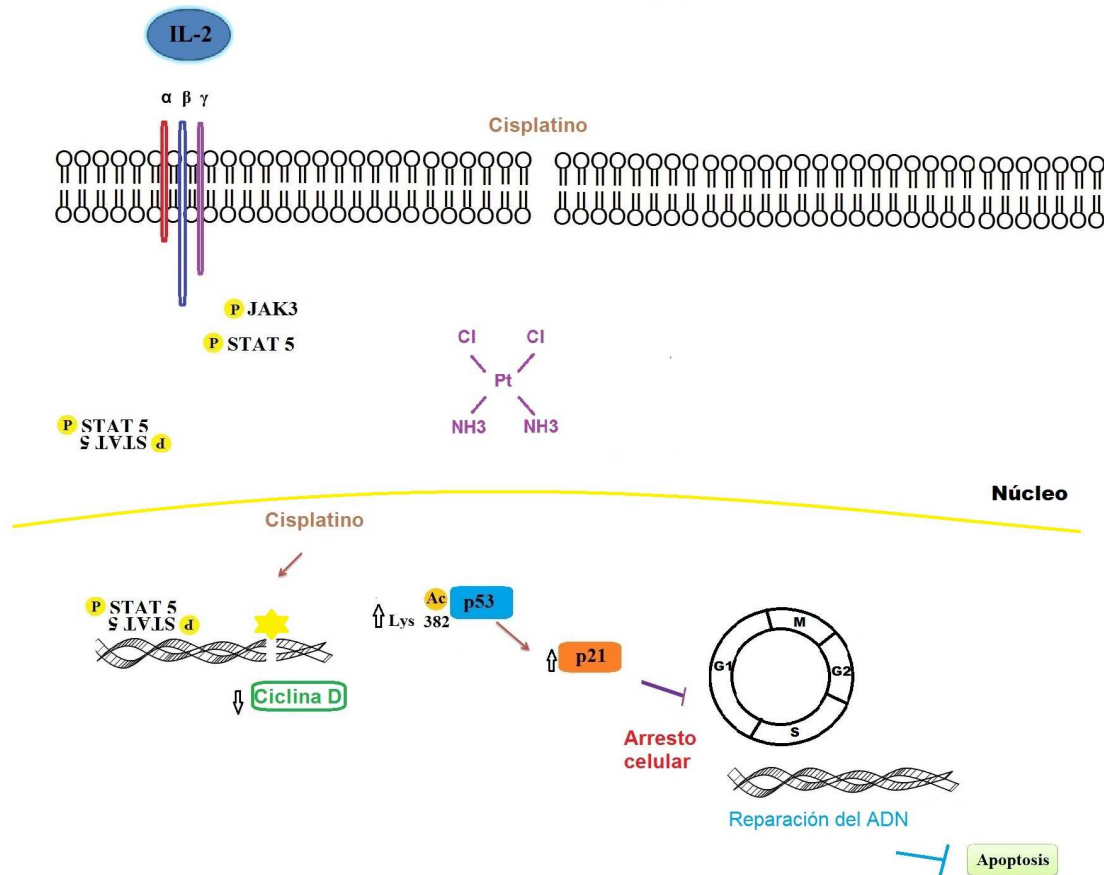


Figura 13. Efecto de la IL-2 sobre la proliferación y resistencia a muerte en células de cáncer de cérvix. La vía de señalización JAK-STAT activada por IL-2 regula río abajo la proteína reguladora del ciclo celular, ciclina D. La IL-2 permite la acetilación de la lisina 382 activando a p53 el cual regula la expresión de p21, ésta a su vez, disminuye la expresión de ciclina D, la cual permite el arresto celular en la fase G1. Durante el arresto celular se lleva a cabo la reparación del ADN inducido por el cisplatino exógeno bloqueando así el proceso de apoptosis.

Conclusión

De acuerdo a los resultados reportados concluimos que las células HeLa e INBL presentan el receptor para IL-2. El tratamiento con IL-2 disminuye la proliferación en ambas líneas celulares sin inducir significativamente apoptosis. El tratamiento con IL-2 no indujo senescencia celular. En la línea celular INBL se observó arresto transitorio en la fase G1 del ciclo celular regulado por p53, p21 y ciclina D. El tratamiento con cisplatino indujo apoptosis en la mitad de la población, sin embargo, en las células previamente arrestadas y posteriormente tratadas con cisplatino, se encontró, sorprendentemente, que la IL-2 confiere protección a las células evitando la activación de apoptosis.

Perspectivas

Para hacer una mejor determinación de blancos moleculares involucrados en el arresto celular, se podrían analizar por separado las poblaciones obtenidas en los cultivos arrestados (células adheridas) y en las células muertas (células flotantes). Una vez que se aíslan las células en arresto se puede utilizar Ki-67 o carboxifluoresceína para determinar si las células efectivamente continúan su proliferación normal o se relentececen.

Considerando el modelo propuesto se propone realizar los mismos experimentos con STAT5 silenciada para determinar si está influyendo directamente en la protección de las células ante la apoptosis.

Se puede considerar la incubación simultánea de IL-2 con cisplatino posterior al arresto celular, para saber si el porcentaje de apoptosis aumenta en comparación a la incubación por separado.

También es importante analizar el proceso de reparación celular en células tratadas con IL-2, ya que se ha reportado que la reparación celular ocupa un papel muy importante en la resistencia a tratamientos antitumorales.

Referencias bibliográficas

- Alvarado MJA. Frecuencia de la cadena alfa y beta del receptor para interleucina 2(RIL-2) en células tumorales de carcinoma cervicouterino y el efecto proliferador inducido por interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales : un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura.
- American Cancer Society, 2018.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997; 277 (5324): 370-372.
- Arias J. Fisiopatología quirúrgica: traumatismos, infecciones y tumores. Madrid. Tebar. 1999. Pp. 568.
- Arkin MR, Randal M, DeLano WL, Hyde J, Luong TN, Oslob JD, Raphael R, Taylor L, Wang J, McDowell RS, Wells JA, Braisted AC. Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(4):1603-1608.
- Arzt E, Stelzer G, Renner U, Lange M, Müller OA, Stalla GK. Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J Clin Invest*. 1992; 90(5):1944-1951.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381):1305-1308.
- Attardi L, de Vries A, Jacks T. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*. 2004; 23(4):973-980.
- Balachander A, Nabti S, Sobota RM, Foo S, Zolezzi F, Lee BT, Poidinger M, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell derived IL-2 inhibits survival of terminally mature cells via an autocrine signaling pathway. *Eur J Immunol*. 2015; 45(5):1494-1499.
- Barnum KJ and O'Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol*. 2014; 1170: 29–40.
- Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*. 2002; 2(4):381-392.

- Berglund LJ, Avery DT, Ma CS, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Bacchetta R, Bezrodnik L, Dadi H, Roifman CM, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Picard C, Durandy A, Cook MC, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG. IL-21 signalling via STAT3 primes human naive B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood*. 2013; 122(24):3940-50.
- Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging*. Albany NY. 2011; 3(2):94-101.
- Blankenberg FG. Recent advances in the imaging of programmed cell death. *Curr Pharm Des*. 2004; 10(13):1457–1467.
- Boice JD, Day NE, Andersen A, Brinton LA, Brown R, Choi NW, Clarke EA, Coleman MP, Curtis RE, Flannery JT. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *J Natl Cancer Inst*. 1995. 74(5):955-975.
- Bosco MC, Espinoza-Delgado I, Schwabe M, Gusella GL, Longo DL, Sugamura K, Varesio L. Regulation by interleukin-2 (IL-2) and interferon gamma of IL-2 receptor gamma chain gene expression in human monocytes. *Blood*. 1994; 83(10):2995-3002.
- Budhram-Mahadeo V, Morris PJ, Smith MD, Midgley CA, Boxer LM, Latchman DS. p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *J Biol Chem*. 1999. 274(21):15237-15244.
- Buscemi G, Perego P, Carenini N, Nakanishi M, Chessa L, Chen J, Khanna K, Delia D. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*. 2004; 23(46):7691-7700.
- Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1366(1-2):139-149.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9):729-740.
- Chao CC. Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in cervix carcinoma HeLa cells: relation to DNA repair. *Mol Pharmacol*. 1994; 45(6):1137-1144.

- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 1991; 65(6):1053–1061.
- Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(10):4130-4134.
- Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997; 272(51):32401-32410.
- Ciacci C, Mahida YR, Dignass A, Koizumi M, Podolsky DK. Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 1993; 92(1):527-532.
- Čipak L, Novotny L, Čipakova I, Rauko P. Differential modulation of cisplatin and doxorubicin efficacies in leukemia cells by flavonoids. *Nutrition Res*. 2003; 23(8):1045–1057.
- Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol*. 1991; 50:55-85.
- Cohen SM y Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001; 67:93-130.
- Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2005; 5(4):366-373.
- Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006; 281(40):29568-29574.
- Coqueret O. New targets for viral cyclins. *Cell Cycle*. 2003; 2(4): 293–295.
- Corrigall VM, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T, Tak PP, Panayi GS. Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol*. 2001; 166(6):4141-4147.

- Cress WD, Nevins JR. Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 208:63–78.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994; 8(21):2540-51.
- Engel BE, Cress WD, Santiago-Cardona PG. The retinoblastoma protein: a master tumor suppressor acts as a link between cell cycle and cell adhesion. *Cell Health Cytoskelet.* 2015; 7:1-10.
- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell.* 1993; 73(3):487–497.
- Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(5): 2077–2082.
- Fujimura S, Arakawa F, Yamada Y, Liao S, Khare PD, Kuroki M, Ono J. Growth arrest and apoptosis in adult T cell leukemia cell lines following IL-2 deprivation. *Int J Oncol.* 2004; 25(2):437-443.
- Globocan, 2018. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf> (Consultado febrero 2019).
- González RM, Ruiz MA, Gómez Y, Vilasmil R, Vilasmil AJ, Arteaga VM, Quintero TM. Niveles séricos de interleucina 2 antes y después de la donación de sangre. *Rev. Cub. Hemat. Inmunol. y Hemot.* 2007; 23(2):1-5.
- Govan VA: Strategies for human papillomavirus therapeutic vaccines and other therapies based on the E6 and E7 oncogenes. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1056(1): 328-343.
- Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* 2001; 2(9): 882–888.
- Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(12)pii: a006080.

- Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. 2000; 102(1):1-4.
- Gruss HJ, Scott C, Rollins BJ, Brach MA, Herrmann F. Human fibroblasts express functional IL-2 receptors formed by the IL-2R alpha- and beta-chain subunits: association of IL-2 binding with secretion of the monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*. 1996; 157(2):851-857.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646– 674.
- He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*. 2005; 24(18):2929-2943.
- Hershko AY, Suzuki R, Charles N, Alvarez-Errico D, Sargent JL, Laurence A, Rivera J. Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. *Immunity*. 2011; 35 (4):562-71.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(4):277-288.
- Iwamuro M, Kondo E, Takata K, Yoshino T, Okada H. Diagnosis of follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: A better initial diagnostic workup. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(4):1674-1683.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(9):4997-5002.
- Kaelin WG Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays*. 1999; 21(11):950–958.
- Kato R, Hasegawa K, Torii Y, Udagawa Y, Fukasawa I. Factors affecting platinum sensitivity in cervical cancer. *Oncol Lett*. 2015; 10(6):3591-3598.
- Kaushal GP, Kaushal V, Herzog C, Yang C. Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity. *Autophagy*. 2001; 4(5):710–712.
- Keene JA, Forman J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1982; 155(3): 768–782.

- Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17(5):349–366.
- Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1 A mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(8):2180–2184.
- Kuhn DJ, Smith DM, Pross S, Whiteside TL, Dou QP. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability. *J Cell Biochem.* 2003; 89(4):824-836.
- Lagunas CMC. 2014. Efecto de altas dosis de IL-2 sobre la fosforilación de JAK3, STAT3, STAT5 y su efecto en la proliferación de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis de Maestría.
- Lee M, Lee JS. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep.* 2014; 47(2):51-59.
- Lessene G, Czabotar PE and Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature.* 2008; 7(1):989-1000.
- Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* 1995; 2(4):331–339.
- Lin WC, Yasumura S, Suminami Y, Sung MW, Nagashima S, Stanson J, Whiteside TL. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. *J Immunol.* 1995; 155(10):4805-4816.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104(4):487-501.
- López M, Anzola M, Cuevas SN, Aguirre JM, Martínez de Pancorbo M. p53, a tumor suppressor gene. *Gac Med Bilbao* 2001; 98(1): 21-27
- Lukin DJ, Carvajal LA, Liu WJ, Resnick-Silverman L, Manfredi JJ. p53 Promotes cell survival due to the reversibility of its cell-cycle checkpoints. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(1):16-28.

- Maldonado V, Meléndez-Zajgla J, Ortega A. Modulation of NF-kappa B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells. *Send to Mutat Res.* 1997; 381(1):67-75.
- Miettinen HE, Paunu N, Rantala I. Cell cycle regulators (p21, p53, pRb) in oligodendrocytic tumors: a study by novel tumor microarray technique. *J Neurooncol* 2001; 55(1): 29-37.
- Mindiola R, Callejas D, Núñez-Troconis J, Araujo M, Delgado M, Mosquera J. Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Invest Clin.* 2008; 49(4):533–545.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995; 80(2):293-299.
- Nozell S, Chen X. p21B, a variant of p21(Waf1/Cip1), is induced by the p53 family. *Oncogene.* 2002; 21(8):1285-94.
- Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T. Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Med Microbiol Immunol.* 2013; 202(2):167-174.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74(4):609-619.
- Otero GC, Merrill JE. Molecular cloning of IL-2R alpha, IL-2R beta, and IL-2R gamma cDNAs from a human oligodendroglioma cell line: presence of IL-2R mRNAs in the human central nervous system. *Glia.* 1995; 14(4):295-302.
- Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chrétien I, Abrams J, de Vries J, Spits H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol.* 1988. 141(3):849-855.
- Perdigoto AL, Chatenoud L, Bluestone JA, Herold KC. Inducing and Administering Tregs to Treat Human Disease. *Front Immunol.* 2016; 6:654.
- Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10(5):545-551.

- Pham MN, Von Herrath MG, Vela JL. Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Front Immunol.* 2016; 6:651.
- Plaisance S, Rubinstein E, Alileche A, Sahraoui Y, Krief P, Augery-Bourget Y, Jasmin C, Suarez H, Azzarone B. Expression of the interleukin-2 receptor on human fibroblasts and its biological significance. *Int Immunol.* 1992; 4(7):739-746.
- Presnell SR, Zhang L, Chlebowy CN, Al-Attar A, Lutz CT. Differential transcription factor use by the KIR2DL4 promoter under constitutive and IL-2/15-treated conditions. *J Immunol.* 2012; 188(9):4394-404.
- Prives C, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes Dev.* 1993; 7(4):529-534.
- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005; 4(3):138-144.
- Rangel CR, Corona OT, Soto CI, López LA, Pablo AT, Torres GCF, Weiss SB. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Science direct.* 2010; 50(3):273-277.
- Rangel R, Rodríguez L, Flores G, Gomez C, Soto CI, Mendoza JF and Weiss SB. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors.* 1998. 1(3):1239-1243.
- Reichert TE, Watkins S, Stanson J, Johnson JT, Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46(5):603-611.
- Reinecker HC, Podolsky DK. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(18):8353-8357.
- Reyes J, Chen JY, Stewart-Ornstein J, Karhohs KW, Mock CS, Lahav G. Fluctuations in p53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest. *Mol Cell.* 2018; 71(4):581-591.e5.
- Righetti SC, Della Torre G, Pilotti S, Ménard S, Ottone F, Colnaghi MI, Pierotti MA, Lavarino C, Cornarotti M, Oriana S. A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56(4):689–693.

- Rimoldi D, Salvi S, Hartmann F, Schreyer M, Blum S, Zografos L, Plaisance S, Azzarone B, Carrel S. Expression of IL-2 receptors in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 1993; 13(3):555-564.
- Rocha ZL, Huitron C, Cacéres CJR, Alvarado MJA, Valle MA, Soto CI, Weiss SB and Rangel CR. Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta-gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signaling.* 2004; 16(11):1239-1247.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, Clarke-Pearson DL, Insalaco S. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999; 340(15):1144-1153.
- Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood.* 2005; 106(9):3214-3222.
- Rudnicka K, Matusiak A, Chmiela M. CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochim Pol.* 2015; 62(4):885-894.
- Safar M, Junghans RP. Interleukin 2 maintains biologic stability and sterility over prolonged time. *Immunophar.* 2000; 49(3):419-423.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995. 155(3):1151-64.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:39-85.
- Saneto RP, Altman A, Knobler RL, Johnson HM, de Vellis J. Interleukin 2 mediates the inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986. 83(23):9221-9225.

- Sato S, Kigawa J, Minagawa Y, Okada M, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Terakawa N. Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*. 1999; 86(7):1307–1313.
- Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. and Korsmeyer, S. J. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94(21): 11357-11362.
- Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23(36):9408-9421.
- Sellers WR, Kaelin WG Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 1997; 15(11):3301–3312.
- Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*. 1996; 192(7):669-675.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12):1501–1512.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47):7265-7279.
- Stauber DJ, Debler EW, Horton PA, Smith KA, Wilson IA. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(8):2788–2793.
- Steed H, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, De Petrillo D, Covens A. A comparison of laparoscopic-assisted radical vaginal hysterectomy and radical abdominal hysterectomy in the treatment of cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2004; 93(3):588-593.
- Stittrich AB, Haftmann C, Sgouroudis E, Kühl AA, Hegazy AN, Panse I, Riedel R, Flossdorf M, Dong J, Fuhrmann F, Heinz GA, Fang Z, Li N, Bissels U, Hatam F, Jahn A, Hammoud B, Matz M, Schulze FM, Baumgrass R, Bosio A, Mollenkopf HJ, Grün J, Thiel A, Chen W, Höfer T, Loddenkemper C, Löhning M, Chang HD, Rajewsky N, Radbruch A, Mashreghi MF. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol*. 2010; 11(11):1057-1062.

- Strathdee G, Samson OJ, Sim A, Clarke AR, Brown R. A role for mismatch repair in control of DNA ploidy following DNA damage. *Oncogene*. 2001; 20(15):1923–1927.
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001; 20(17):2122-2133.
- Sykora KW, Kolitz J, Szabo P, Grzeschik KH, Moore MA, Mertelsmann R. Human interleukin 2 gene is located on chromosome 4. *Cancer Invest*. 1984; 2(4):261-265.
- Tamura R, Yoshihara K, Saito T, Ishimura R, Martínez-Ledesma JE, Xin H, Ishiguro T, Mori Y, Yamawaki K, Suda K, Sato S, Itamochi H, Motoyama T, Aoki Y, Okuda S, Casingal CR, Nakaoka H, Inoue I, Verhaak RGW, Komatsu M, Enomoto T. Novel therapeutic strategy for cervical cancer harboring FGFR3-TACC3 fusions. *Oncogenesis*. 2018; 7(1):4.
- Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nat*. 1983; 302(5906):305-310.
- Taniguchi T, Minami Y. The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*. 1993; 73(1):5-8.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*. 2008; 9(3):231-241.
- Thomas GM. Improved treatment for cervical cancer-concurrent chemotherapy and radiotherapy. *N Engl J Med*. 1999; 340(15):1198-2000.
- Valle MA, Weiss SB, Rocha ZL and Soto CI. IL-2 enhances Cervical Cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Investigation*. 2014; 32(4):115-125.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003; 36(3):131-149.
- Wang X, Rickert M, Garcia KC. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science*. 2005; 310 (5751)1159–1163.

- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15(22):2922-33.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Methods Cell Biol. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011; 103:55-98.
- Wu S, Wang L, Ren X, Pan Y, Peng Y, Zou X, Shi C, Zhang Y. Involvement of retinoblastoma-associated protein 48 during photodynamic therapy of cervical cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017; 15(3):1393-1400.
- Xiong H, Su WY, Liang QC, Zhang ZG, Chen HM, Du W, Chen YX, Fang JY. Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells. *Lab Invest.* 2009; 89(6):717-725.
- Yui MA, Sharp LL, Havran WL, Rothenberg EV. Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation. *J Immunol.* 2004. 172(8):4691-4699.
- Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 2000; 10(3):205-211.
- Zhao Y, Sun Q, Zeng Z, Li Q, Zhou S, Zhou M, Xue Y, Cheng X, Xia Y, Wang Q, Tu X. Regulation of SCN3B/scn3b by Interleukin 2 (IL-2): IL-2 modulates SCN3B/scn3b transcript expression and increases sodium current in myocardial cells. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016; 16(1):1.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(5):342-350.