



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN
EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y CÁNCER**

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA MOLECULAR

**Efecto de interleucina-2 sobre la expresión y
activación de CDK2 en líneas de cáncer
cervicouterino**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

PEDRO FERNANDO MORALES DE LA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ARTURO VALLE MENDIOLA

ASESORA DE TESIS:

M. en C. MARIA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ

CDMX. 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Apoyo institucional

El trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular (Laboratorio 9 Planta Baja) perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la UNAM a través del programa PAPIIT (IN222218) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto CB253262) al cual agradezco por la Beca otorgada para el desarrollo de esta tesis.

Agradecimientos

A la **Dra. Isabel Soto Cruz** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de oncología molecular.

Al **Dr. Arturo Valle Mendiola** por ayudarme en todo momento tanto en lo teórico como en lo práctico y compartir su conocimiento conmigo, siempre de manera amistosa haciendo mucho más agradable mi estancia en el laboratorio.

A la **Dra. María del Carmen Lagunas Cruz** por todo el apoyo que me ha brindado desde el primer día en que acudí al laboratorio.

Al **Dr. Hugo López Muñoz** por haberme inspirado y motivado desde la primera de sus clases hasta el final de mi estancia en la facultad.

Al **Dr. Benny Weiss Steider** por enseñarme a analizar las cosas desde otra perspectiva, gracias por sus enriquecedoras aportaciones al presente trabajo.

A la **M. en C. Reynalda Roldán Pérez** por sus observaciones que me permitieron mejorar el presente trabajo.

Dedicatoria

Ma. Guadalupe De La Cruz Pérez y Pedro Morales Girón, ustedes que en todo momento me acompañaron, me motivaron y no dejaron que me rindiera, permítanme decirles que lo lograron, que si se pudo, que todo su esfuerzo por fin obtuvo una recompensa, que aunque pequeña y en forma de esta tesis, yo les dedico con todo mi corazón. Mamá, Papá, este trabajo es para ustedes.

A mi familia Stefany, David, Luis y Karla, mis sobrinos: Luis, Melanie, Linet y Mateo. También a toda mi familia, que de una forma u otra me ayudaron a lo largo de este camino.

A la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales y al M. en C. Amadeo Barba Álvarez por ser los primeros investigadores que me enseñaron a trabajar en un laboratorio de manera rigurosa. Gracias por su amistad y apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que se convirtieron en parte fundamental de mi vida desde que los encontré en la facultad, los menciono por orden de aparición ya que todos son importantes para mí: Edson, Alberto, Ana, Jennifer, Oscar, Alejandra, Otho, Eder, Levinn, Leticia, Erandy, Samuel, Sharon, Efraín, Elizabeth, Antonio, Edgar, Emilio, Maribel, Roberto, Vladimir, Monse, Paola, Lizbeth, Daryl, Lorena, Mirella, Isis, Liz, Miguel, Ithalivi e Ingrid.

También a todas aquellas personas que conocí fuera de la facultad y que durante la realización de mi tesis me apoyaron, compartiendo de su tiempo y cariño conmigo, quedándose de manera especial en mi vida, infinitas gracias: Angélica Carreño, Daniel, Angélica Hernández, Amaranta, Ángel, Viviana, Fabiola, Diana, Gissel, Silvia, Kasandra, Alma, Xadani, Carolina, Karina y Karen.

No hay en el mundo fortuna mayor, creo, que la incapacidad de la mente humana para relacionar entre sí todo lo que hay en ella. Vivimos en una isla de plácida ignorancia, rodeados por los negros mares de lo infinito, y no es nuestro destino emprender largos viajes. Las ciencias, que siguen sus caminos propios, no han causado mucho daño hasta ahora; pero algún día la unión de esos disociados conocimientos nos abrirá a la realidad, y a la endeble posición que en ella ocupamos, perspectivas tan terribles que enloqueceremos ante la revelación, o huiremos de esa funesta luz, refugiándonos en la seguridad y la paz de una nueva edad de las tinieblas.

H. P. Lovecraft, La llamada de Cthulhu (1928)

La ciencia se llama ciencia justamente porque no reconoce fetiches, porque no teme acabar con lo que se hace viejo y caduco y porque presta oído atento a la voz de la experiencia y de la práctica.

I. V. D. Stalin

... One day, we imagine that cancer biology and treatment—at present, a patchwork quilt of cell biology, genetics, histopathology, biochemistry, immunology, and pharmacology—will become a science with a conceptual structure and logical coherence that rivals that of chemistry or physics.

Hanahan D & Weinberg RA. The hallmarks of cancer (2000).

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
Cáncer.....	2
Cáncer de cérvix.....	5
Patofisiología.....	5
Ingreso del VPH a la célula huésped.....	9
Interleucina 2	15
Ciclo celular	19
Desregulación del ciclo celular en el cáncer.....	21
CDK2.....	22
Planteamiento del problema	26
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
Metodología.....	28
Material biológico	28
Amplificación por PCR	29
Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	29
Lisis celular e inmunoprecipitación	29
Electroforesis (SDS-PAGE) y Western blot.....	30
Elución de anticuerpos.....	30
Software utilizado	31
Resultados.....	32
Oligonucleótidos para <i>CDK2</i>	32
Expresión de <i>CDK2</i> en la línea HeLa.....	32
Expresión de <i>CDK2</i> en la línea INBL.....	32
Transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.....	35
Activación de <i>CDK2</i>	37
Fosforilación de <i>CDK2</i> en la línea HeLa.....	37
Fosforilación de <i>CDK2</i> en la línea INBL.....	39
Discusión.....	41
Conclusiones.....	45
Proyecciones futuras	45
Referencias.....	46

Resumen

El cáncer es un fenómeno que representa la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. La detección de cáncer en una fase avanzada y la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas frecuentes. En 2017, solo el 26% de los países de ingresos bajos informaron que la sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general. En el caso de México el cáncer se ha mantenido en segundo o tercer puesto como una de las principales causas de muerte, la mortalidad por neoplasias fue mayor en mujeres (13.97%) que en hombres (10.74%) siendo el cáncer de cérvix el tercer lugar en incidencia con un total de 7869 casos nuevos y la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres con 4121 defunciones.

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de este padecimiento es la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, que gracias a la actividad de las células que infecta y a la acción de las proteínas virales, particularmente E6 y E7, puede generar un desequilibrio en el ciclo celular y por lo tanto en la proliferación celular. Ya que CDK2 es una importante cinasa que regula diferentes etapas del ciclo celular, entre ellas la transición de la fase G1 a la fase S, en este trabajo nos enfocamos en analizar el papel de CDK2 en líneas de cáncer de cérvix tratadas con interleucina 2 (IL-2).

Nuestros resultados demuestran que 10 UI/mL de IL-2 disminuye la expresión de *CDK2* en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL después de 24 horas de incubación, mientras que a una concentración de 100 UI/mL aumenta la expresión de *CDK2* en ambas líneas celulares. Debido a este comportamiento decidimos analizar *CDK2* a nivel de proteína pero en este caso evaluando la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Previamente nuestro equipo de trabajo reportó arresto en la fase G1 del ciclo celular en células de cáncer de cérvix tratadas con 100 UI/mL de IL-2, por lo que también nos interesó dilucidar qué papel jugaba *CDK2* en dicha detención del ciclo celular. Determinamos que la transición de la fase G1-S del ciclo celular inicia aproximadamente a las siete horas de cultivo en la línea HeLa mientras que en la línea INBL inicia alrededor de las 10 horas de cultivo. Por último observamos que la activación de *CDK2* en la transición G1-S aumenta ya sea con 10 o 100 UI/mL de IL-2 en la línea HeLa, resultado que no esperábamos por lo menos para el tratamiento de 100 UI/mL de IL-2. También observamos que la IL-2 induce la inhibición de *CDK2* activa después de la transición G1-S en ambas líneas celulares.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que *CDK2* podría estar implicado en otros procesos celulares, como la activación de vías de señalización en respuesta por daño al ADN, que lleven a la detención del ciclo celular y no necesariamente esté participando en la regulación de la transición G1-S del ciclo celular bajo un tratamiento con IL-2, sin embargo es necesario profundizar en el papel que juega *CDK2* bajo este tipo de tratamientos.

Introducción

Cáncer

En el estudio del cáncer se han establecido algunas premisas como que las células cancerosas derivan de una sola célula que ha acumulado mutaciones a lo largo del tiempo y que las mutaciones ocurren en genes que controlan la proliferación y/o el ciclo celular. Esto ha llevado a que los investigadores busquen las causas del cáncer “dentro” de la célula y en especial, mutaciones en los llamados oncogenes y genes supresores de tumores [1].

Por ello, el cáncer se puede definir como un grupo de más de 100 diferentes padecimientos que son causados por múltiples alteraciones en el material genético de la célula [2]. Al menos tomando en cuenta la teoría convencional que trata de explicar la carcinogénesis, conocida como Teoría de Mutación Somática (TMS). Bajo el enfoque de esta teoría una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales, dichas células se caracterizan por poseer dos propiedades hereditarias: 1) Se dividen a pesar de las restricciones normales, y 2) se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis. La capacidad de invasión es una característica de las células cancerosas, les permite liberarse del tejido, entrar en el torrente sanguíneo y formar tumores secundarios en otros lugares del cuerpo. Así, las células cancerosas muestran inestabilidad genómica que deriva en su proliferación descontrolada ocasionada por la desregulación del ciclo celular [3,4].

En el año 2000 y 2011 Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg publicaron dos artículos en los que enlistan, lo que ellos denominan “características o sellos distintivos del cáncer” [5, 6]. Proponen una lista de ocho características para dar explicación al por qué de las células cancerosas:

- 1) Señalización proliferativa sostenida.
- 2) Evasión de las señales inhibitorias de crecimiento.
- 3) Resistencia a la muerte celular.
- 4) Inmortalidad replicativa.
- 5) Inducción de angiogénesis.
- 6) Activación de la invasión y metástasis.
- 7) Reprogramación del metabolismo energético.
- 8) Evasión de la respuesta inmune.

Con base en ello describen a las células cancerosas dentro de los tumores como poblaciones celulares razonablemente homogéneas hasta relativamente tarde en el curso de la progresión del tumor, cuando la hiperproliferación combinada con un aumento de inestabilidad genética genera distintas subpoblaciones clonales. Como reflejo de dicha heterogeneidad clonal, muchos tumores humanos son histopatológicamente diversos, y contienen regiones demarcadas por diversos grados de diferenciación, proliferación, vascularidad, inflamación y/o invasividad [5, 6].

Carlos Sonnenschein y Ana M. Soto [7], mencionan que esto refleja una visión reduccionista del fenómeno ya que todo se reduce a:

- a) El cáncer es un padecimiento genético y
- b) Todo lo que ahora no puede vincularse a un origen genético, finalmente se asociará a una interpretación genética de la enfermedad en un futuro próximo [7].

Aportando un enfoque diferente de abordar el cáncer, ellos proponen una nueva teoría a la que llaman TOFT, por sus siglas en inglés (Tissue Organization Field Theory). Esta teoría analiza y critica cada una de las características del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg. Así, mientras que bajo el enfoque de la TMS el cáncer es un padecimiento de origen genético basado en la célula; la teoría TOFT lo reconoce como alteración entre las interacciones de la célula con el tejido adyacente, mostrando inestabilidad genética como subproducto del cáncer [8].

Una de las diferencias más notables entre ambas teorías es que a diferencia de la TMS en donde un estado no proliferativo es el estado predeterminado de las células, la TOFT asume la proliferación como un estado “*sine qua non*” para la vida. Además sugieren revisar algunos puntos clave como la resistencia o evasión de la apoptosis ya que posiblemente este proceso puede disminuir el tamaño del tumor en un principio pero sea necesario después para una evasión agresiva de las células tumorales [7]. Stuart G. Baker realiza una comparación entre ambas teorías (**tabla 1**) mencionando que la complejidad del paisaje genómico del cáncer puede sugerir: 1) más investigaciones de secuenciación, bioinformática y biología de sistemas bajo la premisa de que se está acercando una comprensión completa de la TMS, o 2) más investigaciones sobre el papel de los morfostatos, fuerzas mecánicas y señales bioeléctricas en la carcinogénesis bajo la premisa de que un enfoque desde la teoría TOFT es más relevante u ofrece un mayor campo de investigación [8].

Sea cual sea el enfoque que se utilice para entender el cáncer, este fenómeno representa la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. La detección de cáncer en una fase avanzada y la falta de diagnóstico y tratamiento son problemas frecuentes. En 2017, solo el 26% de los países de ingresos bajos informaron que la sanidad pública contaba con servicios de patología para atender a la población en general. Más del 90% de los países de ingresos altos ofrecen tratamiento a los enfermos oncológicos, mientras que en los países de ingresos bajos este porcentaje es inferior al 30%, sin embargo solo uno de cada cinco países de ingresos medianos o bajos dispone de los datos necesarios para impulsar políticas de lucha contra la enfermedad [9].

El cáncer también representa la segunda causa de muerte en el continente Americano, en el 2018 causó 1.3 millones de muertes y 3.7 millones de nuevos casos [10]. El cáncer constituye una enorme carga para la sociedad en países ya sea económicamente desarrollados o en vías de desarrollo.

Tabla 1. Algunas diferencias entre TMS y TOFT.

Concepto	TMS	TOFT
Idea central	<ol style="list-style-type: none"> 1) Padecimiento genético 2) Se enfoca en la célula cancerosa 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Desarrollo erróneo 2) Se enfoca en las interacciones del tejido
Mutaciones	Necesarias para el desarrollo del cáncer	<ol style="list-style-type: none"> 1) No son necesarias para el surgimiento del cáncer 2) Inestabilidad genética como subproducto del cáncer 3) Hipótesis adicional: En algunos casos las mutaciones conducen al cáncer por disrupción de morfostatos, fuerzas mecánicas o señales bioeléctricas
Tejido Adyacente	Papel de apoyo: <ol style="list-style-type: none"> 1) Afecta la condición física de las clonas 2) Neoplasias incipientes reclutan células del estroma 	Papel clave: <ol style="list-style-type: none"> 1) Cáncer surge debido a la disrupción de las interacciones con el tejido adyacente
Localización del cáncer en relación a la exposición de agentes carcinogénicos.	El cáncer solo surge en tejido que ha sido expuesto a carcinógenos	El cáncer puede surgir en tejido que no ha sido expuesto a carcinógenos

Tomado y modificado de Baker SG, 2014 [8].

La incidencia de cáncer está aumentando debido al crecimiento y el envejecimiento de la población, así como a la creciente prevalencia de factores de riesgo asociados con las principales causas de muerte por cáncer como el tabaquismo (cáncer de pulmón, colorrectal, estómago e hígado) sobrepeso/obesidad e inactividad física (cáncer de mama y colorrectal) e infección y cambios en los patrones reproductivos asociados con la urbanización y el desarrollo económico (cáncer de hígado, estómago y cuello uterino)[11].

En el caso de México el cáncer se ha mantenido en segundo o tercer puesto como una de las principales causas de muerte, la mortalidad por neoplasias fue mayor en mujeres (13.97%) que en hombres (10.74%) siendo el cáncer de cérvix la segunda causa de defunciones en mujeres [12].

Cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix ocupa a nivel mundial la cuarta posición en cuanto a incidencia y mortalidad en mujeres, con un estimado de 569 847 casos nuevos en 2018 según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés). Se tiene un estimado de 311 365 mil muertes por cáncer de cérvix en todo el mundo lo que representa el 7.5% de todas las muertes por cáncer en mujeres [13]. En México este tipo de cáncer ocupa el tercer lugar en incidencia con un total de 7869 casos nuevos y es la segunda causa de muerte entre las mujeres con 4121 defunciones [14].

El tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, mantener relaciones sexuales a temprana edad así como la promiscuidad sexual, son algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de cérvix, sin embargo, el factor de riesgo más importante para el desarrollo de este padecimiento es la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) [15-18].

Patofisiología

El cuello uterino, que se encuentra entre la vagina y el útero, es un canal con dos aberturas: el orificio interno superior que conduce al útero y el orificio externo inferior que conecta con la cavidad vaginal. La histología del canal cervical se puede dividir en:

- 1) endocérvix, que se caracteriza por un epitelio secretor columnar simple, las células epiteliales del endocérvix pueden aparecer altas y delgadas, y están estrechamente adheridas entre sí; el cuello uterino no tiene glándulas, en cambio, los pliegues del epitelio de la columna crean estructuras extensas similares a criptas que secretan moco cervical y actúan como sitios de almacenamiento para los espermatozoides después del coito.
- 2) exocérvix, el cual está revestido por epitelio escamoso estratificado no queratinizante.
- 3) Unión escamocolumnar, es la zona donde se unen los epitelios que recubren el endocérvix y el exocérvix; ésta es una zona de gran importancia, ya que es el área más vulnerable a la infección por VPH (**figura 1**) [19, 20].

Esta vulnerabilidad de la zona de unión escamocolumnar es causada por la metaplasia que ocurre a lo largo de la vida de la mujer, este es un proceso normal, por el cual el epitelio columnar en esta región puede convertirse en un epitelio estratificado diferenciado. Ocurre en la pubertad cuando el endocérvix se expone al ambiente ácido de la vagina, pero también ocurre en respuesta a la irritación local. Aunque este modelo es persuasivo, nuestra comprensión de los tipos de células que mantienen la homeostasis epitelial normal en las proximidades de la unión escamocolumnar está poco desarrollada [21].

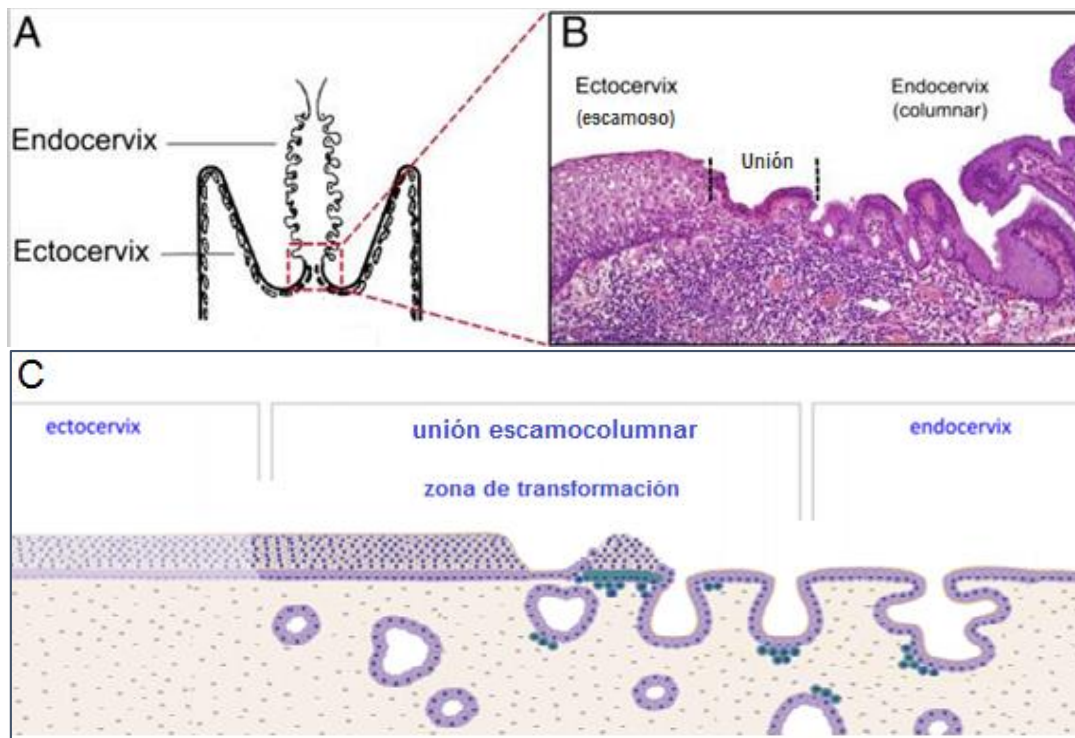


Figura 1. A) Esquema que muestra la zona del ectocérvix y endocérvix, **B) y C)** corte histológico y esquema donde se puede apreciar la unión escamocolumnar. Tomado y modificado de Herfs M *et. al.* y Doorbar J *et. al.* [20, 21].

Se reconoce así que el VPH puede inducir una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (ver **tabla 2**), que generalmente se convierten en cáncer cervical debido a la infección continua con VPH de alto riesgo. Dado que la zona de transición incluye dos tipos de células epiteliales (células glandulares y escamosas), pueden ocurrir dos formas diferentes de cáncer en el cuello uterino. Un rápido aumento no regulado de células glandulares en el endocérvix genera un adenocarcinoma mientras que una neoplasia maligna de células escamosas es la causa del carcinoma de células escamosas. Este último es mucho más frecuente y suele ser asintomático en sus primeras etapas, pero puede causar dolor coital y pélvico y sangrado y flujo vaginales a medida que progresa. El origen de los cánceres asociados al VPH, por lo tanto, a menudo tiene que ver tanto con el sitio epitelial, como con el rango de tipos de VPH de alto riesgo que lo infectan [21, 22].

Al final de la década de los 70's y principios de los 80's diferentes investigadores sugerían que la infección por un virus podría jugar un papel clave en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, específicamente de neoplasias cervicales [23], poco tiempo bastó para que se propusieran a los virus de papiloma humano como agentes causales del desarrollo del cáncer de cérvix [24, 25]. Al analizar diferentes muestras provenientes de biopsias de pacientes con cáncer de cérvix, Harald zur Hausen y colaboradores demostraron que se encontraba presente ADN viral de los tipos VPH 6, 11, 16 y un nuevo tipo (en ese entonces) al que

denominaron VPH 18; incluso encontraron ADN viral de VPH 18 en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix como HeLa y KB, por lo que se propuso a la línea celular HeLa como un importante modelo de estudio para entender mejor este tipo de cáncer [26].

Todos los papilomavirus pertenecen a la familia *Papillomaviridae* la cual incluye 16 géneros diferentes. Los papilomavirus del género Alpha se han subdividido en virus de bajo riesgo, los cuales han sido encontrados principalmente en verrugas genitales (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) y virus de alto riesgo los cuales están íntimamente relacionados con el proceso de desarrollo de cáncer de cérvix (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) además de tres posibles VPH de alto riesgo (VPH 26, 53, 66) [27, 28].

Tabla 2. Lesiones cervicouterinas precancerosas: terminología para la notificación citológica e histológica

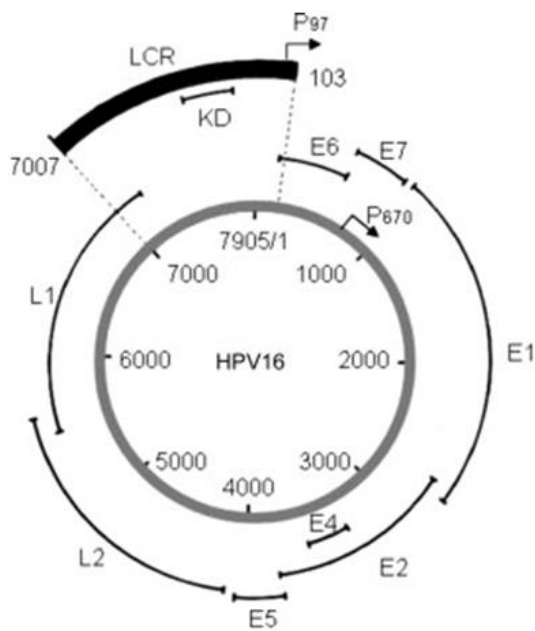
Clasificación citológica (utilizada para tamizaje)		Clasificación histológica (utilizada para diagnóstico)	
Papanicolaou	Sistema de Bethesda	NIC	Clasificaciones descriptivas de la OMS
Clase I	Normal	Normal	Normal
Clase II	ASCUS ASC-H	Atipia	Atipia
Clase III	LSIL	NIC1, con inclusión de condiloma plano	Coilocitosis
Clase III	HSIL	NIC2	Displasia moderada
Clase III	HSIL	NIC3	Displasia grave
Clase IV	HSIL	NIC3	Carcinoma in situ
Clase V	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor	Carcinoma invasor

ASC-H: células escamosas atípicas: no se puede excluir una lesión intraepitelial escamosa de alto grado; ASCUS: células escamosas atípicas de significado indeterminado; NIC: neoplasia intraepitelial cervicouterina; HSIL: lesión intraepitelial escamosa de alto grado; LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. Tomado y modificado de OPS, 2016 [29].

Si bien los tipos de VPH 16 y 18 han sido identificados como los más prevalentes en el cáncer de cérvix en el mundo alcanzando esta relación hasta un 66%, se ha reportado para nuestro país un porcentaje cada vez mayor de casos en donde se encuentran diferentes tipos de VPH como el VPH 31, 33, 45, 52 y 58; a pesar de ello, el ADN viral se identifica en el 99.7% de los casos de cáncer de cérvix invasor lo que demuestra su importante papel en el desarrollo de este padecimiento [30, 31].

La organización genómica del VPH consta de aproximadamente 8000 pares de bases con ocho o nueve marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés). El genoma del VPH puede dividirse en tres diferentes regiones: i) una región que codifica para los genes de expresión temprana E1, E2, E4, E5, E6 y E7; ii) otra región que codifica para los genes de expresión tardía L1 y L2 y iii) una región no codificante nombrada Región Larga de Control (LCR por sus siglas en inglés) que está localizada entre los ORFs L1 y E6 y contiene los elementos necesarios para la replicación y transcripción viral (**figura 2**) [32].

La proteína viral E1 (VPH E1) tiene actividad de helicasa dependiente de ATP que puede unirse al origen de replicación rico en AT y a las proteínas VPH E2 que participan en la transcripción y replicación viral. La proteína VPH E2 de longitud completa es un activador transcripcional, en contraste, una forma truncada de VPH E2 y la proteína de fusión VPH E8 ^ E2 reprimen la transcripción. VPH E4 está incrustado dentro del gen E2 y se expresa principalmente como una proteína de fusión VPH E1 ^ E4 durante las últimas etapas del ciclo de vida viral. VPH E4 se une a los filamentos de citoqueratina, interrumpiendo su estructura, y se cree que desempeña un papel clave en el escape viral de las capas epiteliales cornificadas. VPH E5 participa en la evasión de la apoptosis y de la respuesta inmune. La región tardía codifica las proteínas de la cápside mayor (L1) y menor (L2). Dado que el ORF L1 es el más conservado entre los papilomavirus, se utiliza para la organización filogenética y la clasificación del VPH [33].



Proteína viral	Función.
E1	Forma complejos con E2 y controla la replicación viral.
E2	Regula la expresión temprana de genes.
E4	Puede mediar la liberación de partículas virales desestabilizando los filamentos de citoqueratina.
E5	Estimula señales mitogénicas y factores de crecimiento.
E6	Inactiva múltiples proteínas del huésped, tiene gran potencial oncogénico.
E7	Inactiva múltiples proteínas del huésped, tiene gran potencial oncogénico.
L1	Conforma la cápside viral, componente de vacunas profilácticas.
L2	Conforma la cápside viral en menor grado que L1.

Figura 2. Organización genómica del VPH (género alpha), así como una breve descripción de la función de sus proteínas. Tomado y modificado de Tommasino M. 2014 [32].

Ingreso del VPH a la célula huésped

En el epitelio cervical, la zona de transformación dentro de la unión escamocolumnar es un nicho de células con un perfil de expresión único y características embrionarias. Las principales células diana para la infección por VPH de alto riesgo son células epiteliales cuboidales dentro de dicha zona (consideradas las células madre del epitelio cervical), que están involucradas en la transformación maligna [34].

El VPH ingresa a las células epiteliales de las superficies cutáneas o mucosas a través de la abrasión y además requiere heridas o micro heridas para permitir el acceso del virus a la lámina basal (**figura 3**). En la mayoría de los casos, la infección por VPH se resuelve espontáneamente y es transitoria y asintomática. El desarrollo de infecciones por VPH y la formación de lesiones pueden generar una respuesta de curación de la herida que promueve la división celular activa y la proliferación de células infectadas [35].

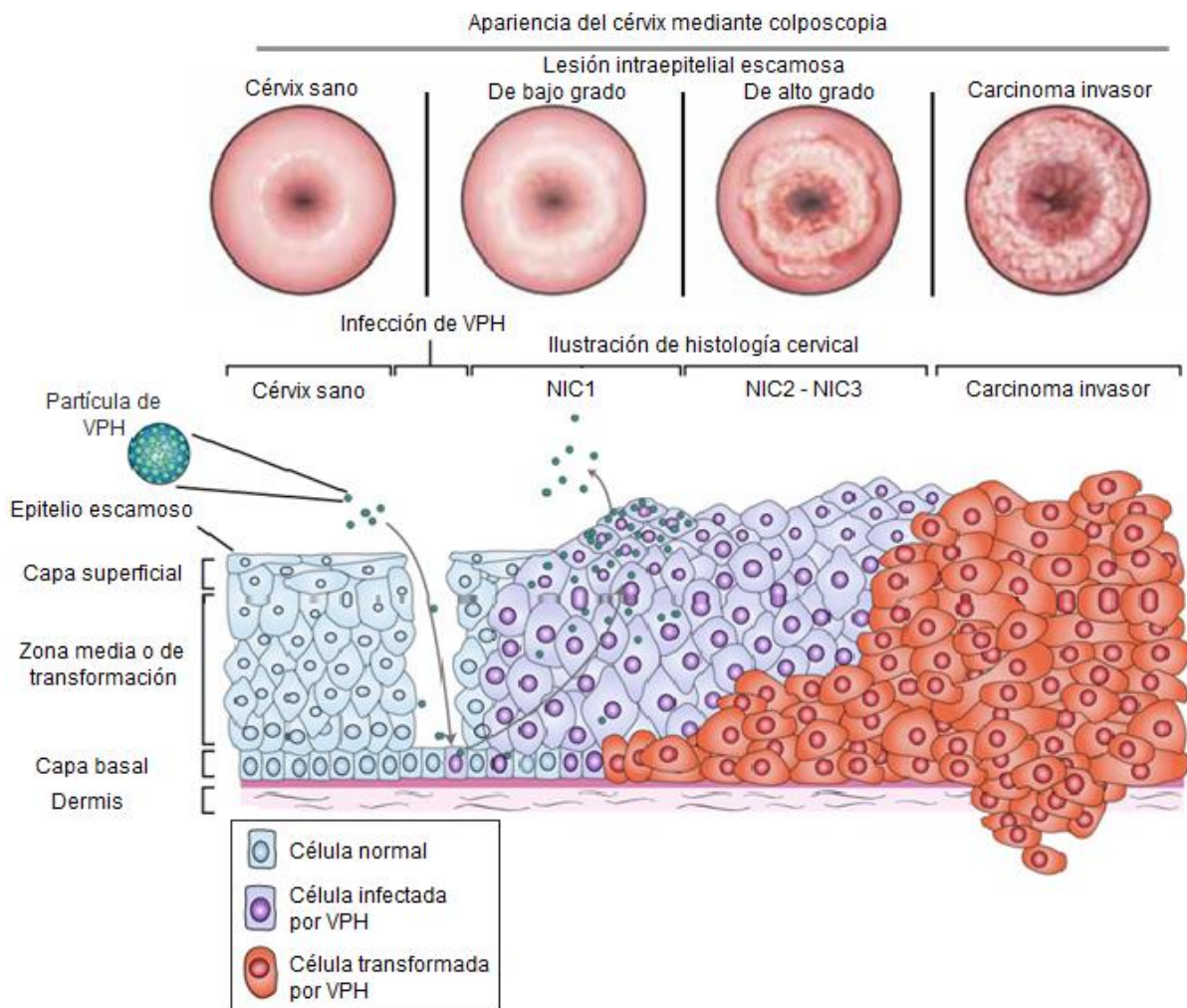


Figura 3. Progresión maligna debido a la infección por VPH. En la parte superior se muestra la apariencia del cérvix mediante colposcopia; en la parte inferior un esquema de histología cervical. Tomado y modificado de Jin XW, *et. al.* y Piersma SJ [36, 37].

Se ha sugerido que el VPH se une inicialmente a la membrana basal antes de ser transferido a la superficie celular de los queratinocitos. Es importante tener en cuenta que la entrada del VPH *in vitro* se inicia uniéndose a un receptor de superficie celular en contraste con la situación *in vivo* donde la membrana basal ha sido identificada recientemente como el sitio primario de unión del virus. Los glicosaminoglicanos (GAG), especialmente los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), se sugirieron como receptores de unión inicial para el VPH. Los HSPG se encuentran con frecuencia en la matriz extracelular y en la superficie de la mayoría de las células. Los sindecanos son los HSPG predominantes en las células epiteliales, las proteínas blanco del VPH, especialmente sindecano-1 (Sdc-1) puede servir como el principal receptor de unión *in vivo* debido a su alto nivel de expresión en dichas células y a su regulación positiva durante la cicatrización de heridas [38-40]. El virus se une a las cadenas de HSPG ubicadas en la membrana celular o en la matriz extracelular a través de la proteína principal de la cápside L1, lo que conduce a cambios conformacionales en su estructura mediados por ciclofilina B (CyPB), que expone la proteína menor de la cápside L2 en la superficie de la partícula viral. La escisión de L1 en el espacio extracelular por una serina proteasa, la calicreína-8, parece ser crucial para la externalización eficiente de L2. En la matriz extracelular, el virus también puede unirse a un receptor de unión transitorio, laminina-332 (anteriormente llamada laminina-5). Posteriormente, el extremo N terminal de la proteína menor de la cápside L2 se escinde con un mecanismo independiente de CyPB, un sitio consenso de escisión de furina para exponer los aminoácidos 17–36 de la proteína viral L2, esto parece ser importante para la interacción de la cápside con un receptor secundario; [41-43].

También se ha demostrado que la infección por VPH depende en gran medida de metaloproteinasas de matriz (MMP), metaloproteinasas ADAM y heparinasas para liberar ectodominios de heparan sulfato soluble y Sdc-1. Las partículas de VPH unidas a queratinocitos y a la matriz extracelular liberadas posteriormente por MMPs permanecen asociadas con heparan sulfato soluble, HSPG y factores de crecimiento de la familia EGF, un proceso denominado "decoración de partículas de VPH" (**figura 4**). Estos viriones de VPH decorados solubles pueden infectar células deficientes en HSPG, lo que respalda la idea de que los viriones unidos a heparan sulfato soluble pueden evitar la necesidad de HSPG en la membrana celular [44]

Ya que se ha llevado a cabo dicha "decoración del VPH" y se instala en la membrana celular, la señalización de la cinasa de adhesión focal (FAK) a través de la integrina $\alpha 6\beta 4$ y la señalización a través de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés) y KGFR (receptor del factor de crecimiento de queratinocitos, por sus siglas en inglés) son importantes para la infección. Incluso las tetraspaninas CD63 y CD151, que están involucradas en la entrada del VPH, influyen en la señalización de la integrina a través de sus interacciones con FAK; también son reguladoras de la señalización y el tráfico de EGFR. La señalización de EGFR activa la cinasa Src para fosforilar a anexina A2, esto promueve la translocación extracelular del heterotetrámero de anexina A2 (A2t), un complejo que interactúa con EGFR y regula su absorción en las

células. La unión del VPH a un receptor secundario como EGFR permite su posterior internalización [44-47].

Posteriormente se inicia un proceso endocítico no canónico e independiente de clatrina, que implica la participación de actina, OBSL1 (proteína adaptadora del citoesqueleto 1, por sus siglas en inglés), A2t y la tetraspanina CD151. El VPH internalizado en estos endosomas tempranos será mantenido hasta su maduración en cuerpos multivesiculares acidificados donde ocurre el desensamble de la cápside viral. El complejo tetraspanina CD63- sintenina-1-ALIX juegan un importante papel en la regulación de dicho proceso [48, 49].

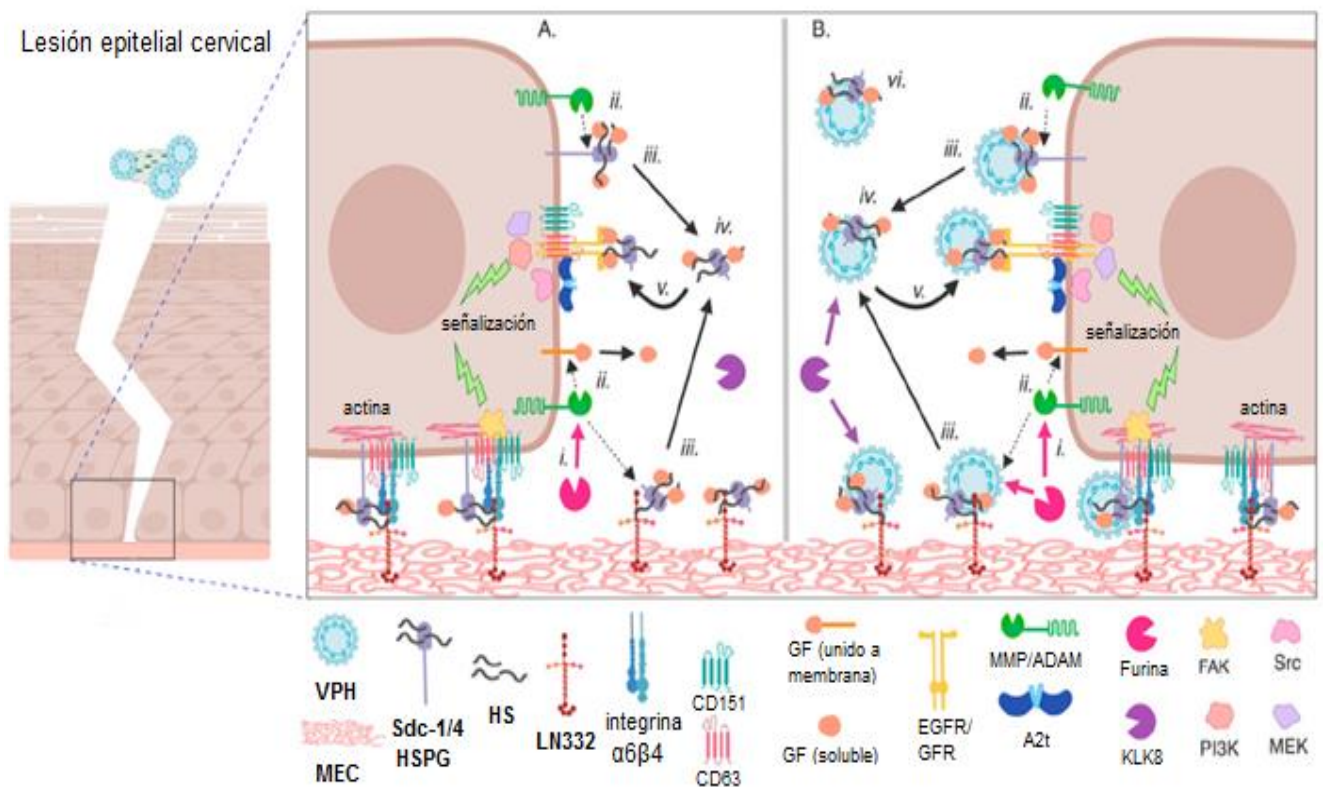


Figura 4. Modelo propuesto para representar la interacción del VPH con el microambiente de una lesión epitelial cervical. Tomado y modificado de Ozburn MA [44].

Una vez que las ciclofilinas han llevado a cabo la separación de la proteína viral L1 del complejo L2/ADNv (proteína viral L2 y ADN de VPH), este complejo puede transitar a la red Trans-Golgi de una manera dependiente de retrómero, donde reside hasta el inicio de la mitosis. Aunque también se ha demostrado que una fracción de la proteína viral L1, en forma de pentámeros intactos conformacionalmente, acompaña al complejo L2/ADNv a la red Trans-Golgi y al núcleo, pero no queda claro el papel funcional de estos pentámeros L1 [50].

Después del inicio de la mitosis, la red Trans-Golgi sufre fragmentación y vesiculación, y las vesículas que contienen el complejo L2/ADNv se asocian con los microtúbulos, luego migran a lo largo de los microtúbulos hacia los cromosomas condensados. Se ha sugerido que la proteína L2 podría interactuar con los cromosomas condensados utilizando su dominio de unión a la cromatina para garantizar que las vesículas de L2/ADNv permanezcan en el huso mitótico. En este modelo, las vesículas mitóticas positivas para L2/ADNv permanecerían unidas al cromosoma durante un período prolongado hasta que el complejo L2/ADNv transloque al núcleo en la fase G1 después de completar la mitosis, de esta manera se favorece la infección de ambas células hijas [51].

Una vez dentro de la célula huésped, el ciclo de vida del VPH se puede separar en dos etapas: no productiva y productiva. En la etapa no productiva, el virus mantiene su genoma como un episoma de bajo número de copias mediante el uso de la maquinaria de replicación del ADN de la célula huésped para sintetizar su ADN en las células de la capa basal del epitelio. La etapa productiva ocurre en las capas suprabasales de diferenciación terminal del epitelio. En estas células, el virus cambia su modo de replicación y amplifica su genoma a un número de copias más alto, expresa genes tardíos que codifican proteínas de la cápside y produce progenie viral [52].

Para ambas etapas el VPH utiliza múltiples mecanismos, quizá las primeras proteínas expresadas durante la infección son VPH E1 y VPH E2. La proteína VPH E2 es el principal regulador transcripcional de los VPH. VPH E2 principalmente recluta factores celulares para los genomas virales, que activan o reprimen los procesos transcripcionales. VPH E2 se une específicamente a secuencias en la LCR del genoma viral (sitios de unión a E2) y pueden activar o reprimir la transcripción, dependiendo del contexto de estos sitios de unión y la naturaleza de los factores celulares asociados [53]. En el origen de la replicación del ADN de la célula huésped, VPH E2 interactúa con el ori y recluta a VPH E1, una tarea que realiza debido a su capacidad de unirse simultáneamente a VPH E1 gracias a su dominio de transactivación, y a los sitios de unión a VPH E2 presentes en el ori a través de su dominio de unión al ADN. VPH E1 a su vez recluta la maquinaria de replicación del ADN celular como el complejo ADN polimerasa α -primasa, la proteína de replicación A y la topoisomerasa I, con lo que puede comenzar la expresión del resto de las proteínas virales [54, 55].

Las oncoproteínas VPH E6 y VPH E7 son los principales factores virales responsables de la transformación de las células epiteliales en el cáncer de cérvix; VPH E6 tiene la capacidad de reclutar a la proteína E6AP (también nombrada UBE3A), se une a ella mediante la secuencia de aminoácidos LXXLL en el dominio conservado de E6AP, el complejo E6/E6AP resultante luego recluta a la proteína supresora de tumores antiapoptótica p53, provocando su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. VPH E6 también promueve la desestabilización de p53 al alterar la actividad de las enzimas involucradas en la modificación de p53. De hecho, la acetilación de p53, que aumenta su estabilidad, es necesaria para la respuesta al daño del ADN. La acetilación de p53 en el extremo C terminal por p300/CBP provoca un aumento

de la actividad transcripcional de p53 que conduce a la detención del crecimiento y la apoptosis. El VPH E6 de alto riesgo previene la transactivación mediada por p300/CBP de p53 a través de la unión de la histona acetiltransferasa en múltiples sitios y provoca la degradación de la histona acetiltransferasa hADA3, que también es necesaria para la activación transcripcional mediada por p53 y la apoptosis. La fosforilación de p53 mediada por ATR previene su degradación por la oncoproteína MDM2 y activa la maquinaria de reparación de ADN dependiente de p53. Sin embargo, HPV E6 puede retrasar la activación de ATR con la consiguiente degradación de p53 y la abrogación de la detención del ciclo celular y la reparación del ADN. Aunque p53 a menudo no se degrada por completo en las células que expresan VPH E6. Sin embargo las tareas a su cargo están bloqueadas [56-58].

VPH E7 por su parte mediante su dominio LXCXE puede unirse a pRb, proteína que funge como supresor tumoral, parece que el complejo formado por pRb, VPH E7 y la ubiquitina ligasa cullina 2 es responsable de la degradación de pRb. Además, VPH E7 también interactúa con otros dos miembros de la familia de proteínas "pocket", p107 y p130, que también regulan negativamente la actividad del factor de transcripción E2F. Este es un paso importante para lograr la segunda fase productiva de la replicación del genoma viral en las células cervicales huésped que normalmente saldrían del ciclo celular. Así, E2F se encuentra libre para activar la transcripción de varios genes relacionados con el ciclo celular, como las ciclinas A y E, estimulando así la transición de la fase G1 a fase S. VPH E7 también puede interactuar y anular la actividad del complejo de transcripción inhibitoria E2F que conduce a la estimulación de la actividad promotora de los genes de control del crecimiento, a esto se agrega una serie compleja de posibles actividades estimuladoras e inhibitoras de VPH E7 en factores de transcripción celular como STAT1, NF- κ B, IRF1, SMAD2/3, TBP, Miz 1, B-Myb, c-Myc, c-Jun, c-Fos, E2F1 y E2F6. VPH E7 también interrumpe el proceso de muerte celular conocido como anoikis a través de la interacción con la proteína p600 asociada a RB que funciona como una ubiquitina ligasa. p600 es una proteína citoplasmática, lo que sugiere que VPH E7 puede atacar factores celulares tanto en el citoplasma como en el núcleo. A través de estas interacciones, VPH E7 funciona principalmente para modular el estado de proliferación de las células infectadas (**figura 5**) [59-62].

Aunque las oncoproteínas VPH E6 y VPH E7 proveen los principales mecanismos moleculares de transformación, VPH E5 también contribuye a dicho proceso. La expresión de VPH E5 aumenta con la diferenciación para promover proliferación celular y la replicación viral productiva. VPH E5 está presente en el retículo endoplásmico, en la envoltura nuclear, en el aparato de Golgi y en endosomas tempranos; dicha localización sugiere que su actividad puede estar relacionada con el tráfico de proteínas de la membrana citoplasmática a través de estos compartimentos celulares. Esto es consistente con la identificación de la proteína BAP31 (proteína asociada al receptor de células B 31, por sus siglas en inglés), un regulador del transporte de proteínas de membrana, como una proteína de unión de VPH E5. También se ha informado que VPH E5 altera la actividad de EGFR, que puede ocurrir a través de su unión a la ATPasa vacuolar,

lo que resulta en la alteración del pH endosómico y, por lo tanto, interfiere con la renovación o reciclamiento del EGFR [63, 64].

En conjunto, VPH E5, VPH E6 y VPH E7 pueden alterar diferentes vías de señalización celular que están involucradas en procesos de proliferación y apoptosis celular como la vía de las ERK/MAPK, PI3K/Akt, EFGR/VEGFR, Fas/TRAIL, la vía activada por Wnt y TGF β , entre otras. Lo cual conduce a la acumulación de mutaciones que dotarán a la célula infectada por VPH de características ventajosas sobre las no infectadas [65, 66], incluso evadiendo mecanismos esenciales para la célula como lo es la respuesta por daño al ADN, ya sea exógeno y/o endógeno. Este mecanismo juega un importante papel

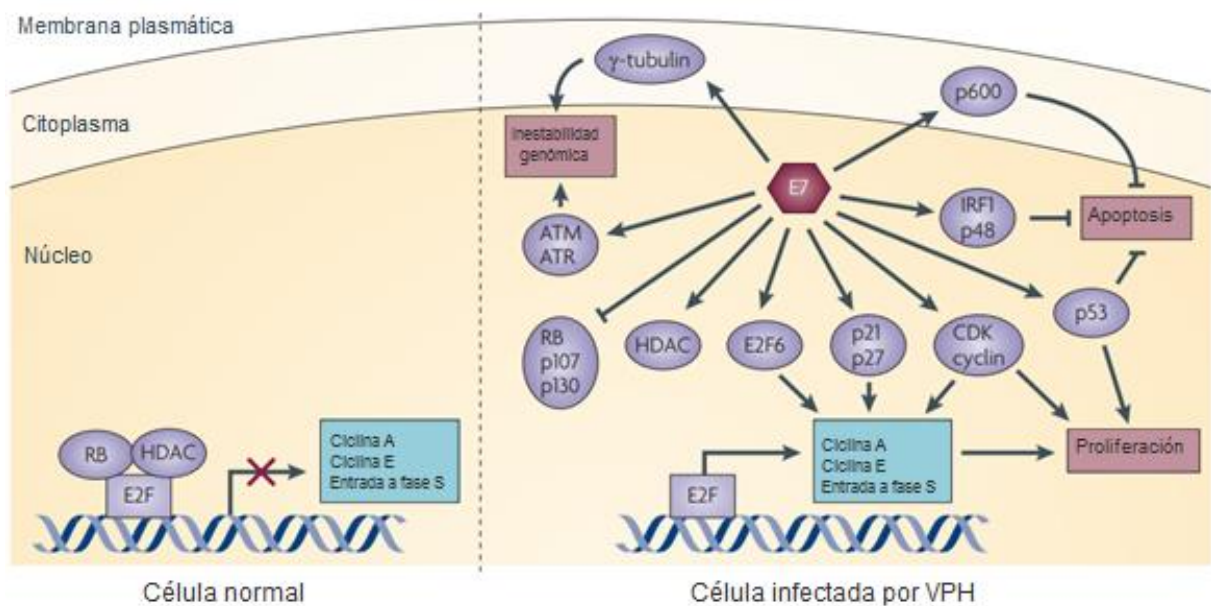


Figura 5. La oncoproteína VPH E7, afecta numerosos procesos celulares a través de su interacción con múltiples proteínas de la célula huésped. Tomado y modificado de Moody CA & Laimins LA [64].

en la preparación de la célula para continuar con la división celular. Una vez que se repara el daño, la célula puede seguir dividiéndose. Si este daño al ADN no puede ser reparado la célula sufre apoptosis. Sin embargo, los puntos de ruptura no reparados son los requisitos previos para que ocurra la integración. Las células que expresan las oncoproteínas VPH E6 y VPH E7 también muestran una menor respuesta a la reparación del daño al ADN que podría deberse a la pérdida de la función de p53 y pRb. El incremento en la ruptura del ADN o el mal funcionamiento de las vías de reparación del ADN aumentan la posibilidad de integrar ADN extraño que puede promover la integración del ADN viral en el genoma del huésped. En el cáncer de cérvix, se ha reportado que más del 80% de los cánceres positivos para VPH16 y casi todos los cánceres positivos para

VPH18 tienen el genoma viral integrado en el genoma del huésped. Se ha observado que más del 50% de las integraciones de VPH ocurrieron dentro de una de las regiones conocidas como Sitios Frágiles Comunes (CFS, por sus siglas en inglés) los cuales son altamente inestables. Como en el caso de la línea celular HeLa, la cual es positiva para VPH18; la secuenciación del genoma completo de HeLa reveló que estas células tienen el VPH18 integrado dentro de una de las regiones CFS que rodean el oncogén c-Myc. Este evento de integración resulta en la amplificación de porciones del genoma del VPH entre 8 y 32 veces y también causa una ruptura dramática del genoma humano alrededor de ese sitio de integración [67, 68].

Todos estos eventos establecen un ambiente que permite la progresión maligna del cáncer, sin embargo, el virus aún debe evadir el sistema inmune del huésped para asegurar su continua replicación. Las principales células responsables de vigilar el microambiente cervical son las mismas células epiteliales, células dendríticas y células de Langerhans, estas últimas son responsables, aunque no de manera exclusiva, del reconocimiento, procesamiento y la presentación antigénica a los linfocitos T mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) clase I y II para la eliminación de las células infectadas por VPH [69], sin embargo, el virus tiene la capacidad de desregular la maquinaria del procesamiento de antígeno. Existe evidencia de una pérdida o disminución en la expresión del MHC clase I en cáncer de cérvix ya que VPH E7 reprime a los promotores que regulan la expresión de la cadena pesada del MHC clase I, de TAP1 y LMP2. Por otro lado se ha mostrado que debido a la disminución de la acidez en los endosomas, VPH E5 evita la degradación de la cadena invariante (Ii), una proteína chaperona importante en la maduración del complejo MHC II, logrando con ello la disminución en la expresión de MHC clase II en la superficie celular y su reconocimiento por los linfocitos T CD4+ [70].

Otro mecanismo por el cual los macrófagos, células de Langerhans y células NK tratan de inhibir al VPH es mediante la expresión de receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés); se ha establecido que los TLR3, 4, 7, 8 y 9 juegan un papel fundamental en la inmunidad antiviral debido a su participación en la producción de citocinas [71]. Una vez que los linfocitos T se acoplan a la célula presentadora de antígeno mediante el receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés), su proliferación y diferenciación es impulsada por la interleucina 2 (IL-2), una citocina que produce la misma célula T activada, es decir, se convierte en un factor autócrino de crecimiento [72]. Sin embargo, se ha reportado que células de cáncer de cérvix podrían utilizar este mismo proceso a su favor ya que de manera interesante, también presentan el receptor de IL-2 (IL-2R) y son capaces de secretar IL-2 [73, 74].

Interleucina 2

Francis W. Ruscetti, Doris A. Morgan y Robert C. Gallo informaron en 1976 y 1977 sobre el descubrimiento del factor de crecimiento de células T (TCGF, por sus siglas en inglés), nombrándolo de esta manera porque pudieron mantener y

expandir linfocitos T durante nueve meses mediante la adición de TCGF. Esto condujo a una comprensión de cómo las células T reconocen antígenos y a la identificación de receptores para TCGF. Posteriormente se propuso utilizar el término “interleucina-2” (IL-2) en lugar de TCGF ya que también se descubrió que podía actuar en diferentes células como NK y células B. El descubrimiento de la IL-2 ha llevado a nuestra apreciación de los factores de crecimiento de las células T no solo como promotores de la supervivencia y proliferación de las células efectoras y asesinas inmunitarias, sino también como inductores fundamentales de las células T reguladoras [75].

La IL-2 es una glicoproteína de 15.5 kDa que posee una estructura globular que presenta cuatro hélices α . Es producida principalmente por células T CD4+ activadas, pero también en menor grado por células T CD8+, células NK, células dendríticas activadas y células cebadas. La transcripción de IL-2 está mediada por múltiples factores de transcripción, incluidas las proteínas de la familia NFAT, la proteína activadora 1 (AP-1), NF- κ B y el factor de transcripción OCT-1 [76]. IL-2 es un factor importante para el mantenimiento de las células T reguladoras CD4+ y puede promover la actividad de citotoxicidad de células T CD8+ y células NK así como modular los programas de diferenciación de células T en respuesta al antígeno, promoviendo la diferenciación de células T CD4+ nativas en células Th1 y Th2, mientras que inhibe la diferenciación de células Th17 [77].

El receptor de alta afinidad para IL-2 (IL-2R) es un complejo formado por tres subunidades: IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (CD132) que se comparte con otros receptores como el receptor para IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. El IL-2R α se une a la IL-2 con baja afinidad (K_d 10^{-8} M) una vez unida, el receptor sufre un cambio conformacional el cual ocasiona la asociación del IL-2R β a través de interacciones polares, y por último este complejo recluta a IL-2R γ ; la unión de las tres subunidades conforma el receptor de alta afinidad (K_d 10^{-11} M). Las subunidades IL-2 β e IL-2 γ no se unen por separado a la IL-2, pero el complejo IL-2R β /IL-2R γ del receptor se une a la IL-2 con afinidad intermedia (K_d 10^{-10} M) [78].

IL-2R utiliza miembros de la familia Janus cinasas (JAK) para inducir la transducción de señales una vez que se une a su ligando IL-2. La cadena IL-2R β recluta a JAK1, mientras que el IL-2R γ recluta a JAK3 lo que da como resultado la transactivación de JAK1/3, una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a IL-2R β , creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2) de los Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STATs), principalmente STAT5a y STAT5b, pero también STAT1 y STAT3. Los STAT fosforilados se dimerizan y este dímero ingresa al núcleo donde puede activar una variedad de genes dependiendo del tipo de célula y otras señales presentes. Además de las STATs, otras moléculas de señalización como SHC, también son reclutadas hacia el dominio citoplasmático de IL-2R β después de su fosforilación por las JAK. Las proteínas SHC luego activan las vías de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (**figura 6**). Tanto en la ruta MAPK como en la ruta PI3K, la fosforilación de SHC hace que se una a un complejo de varias proteínas: Ras

contribuye a la activación de RAF, que activa a la proteína cinasa activada por mitógeno (MEK); MEK pasa a activar a MAPK, las cuales actúan como factores de transcripción para una variedad de mediadores de la proliferación celular. En la ruta PI3K, la activación de Ras activa PI3K, que luego activa a Akt, y esta a su vez activa a mTOR. Hay una gran cantidad de subtipos de muchos de los participantes en las rutas MAPK y PI3K. Además, muchos pasos de ambas cascadas están regulados por mecanismos de retroalimentación desde dentro de la ruta y eventos de señalización en otras rutas. Las vías MAPK y PI3K están asociadas con la proliferación celular y muy probablemente contribuyen a la expansión de las células T efectoras en respuesta a la IL-2. Por lo tanto, está claro que la señalización de IL-2 es complicada, depende del tipo de célula, está ampliamente regulada y probablemente contribuye a la expansión celular en algunos tipos de células [79-81].

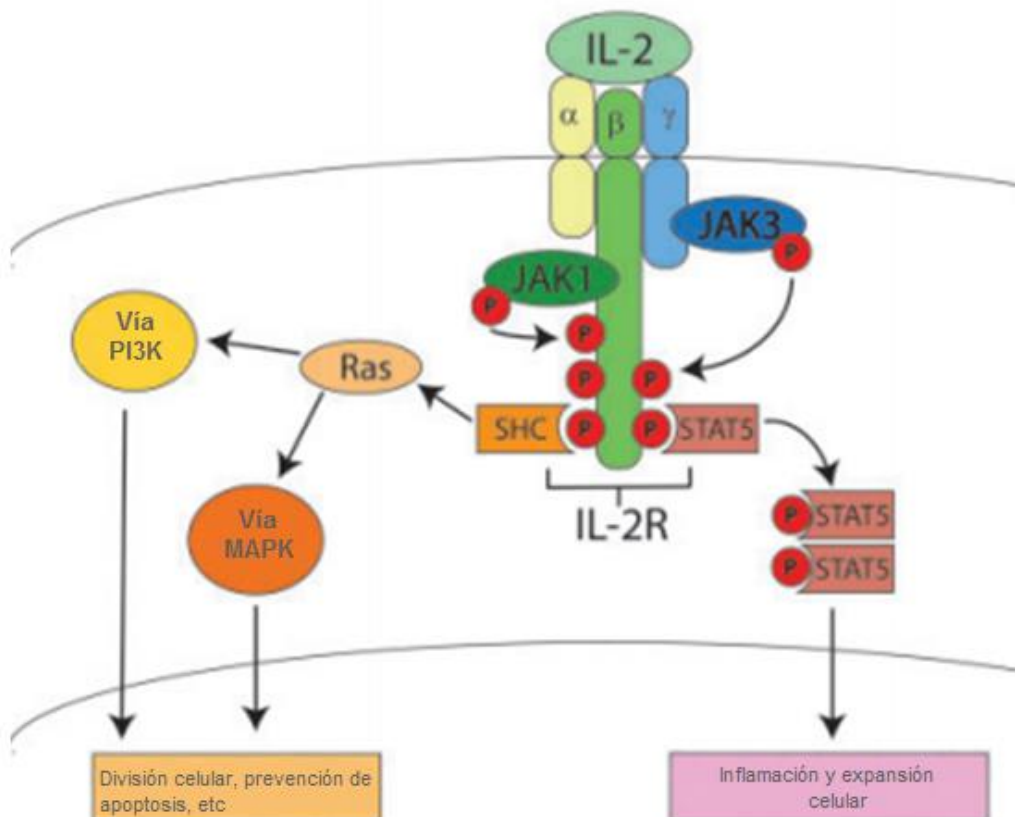


Figura 6. Señalización del receptor para IL-2. La unión de IL-2 a su receptor inicia la señalización de las vías JAK-STAT, MAPK y PI3K. Tomado y modificado de Doersch KM, *et. al.* [81].

Los hallazgos sobre la actividad de IL-2 sobre células del sistema inmune tuvieron un profundo impacto en el desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer. En 1985 se reportó un estudio sobre 25 pacientes con cáncer metastásico que fueron tratados con dosis crecientes de IL-2, aunque la mayoría de los pacientes tratados en la fase inicial de ese estudio recibieron 60,000 UI/kg cada 8 h, los pacientes tratados posteriormente recibieron 180,000 o 600,000 UI/kg. En esta primera serie de 25 pacientes, 4 de 7 pacientes con melanoma metastásico y 3 de 3 pacientes con cáncer renal metastásico mostraron regresión del cáncer. Posteriormente en 1987, se informó de 157 pacientes con cáncer en etapa avanzada tratados con altas dosis de IL-2. Treinta de los 157 pacientes mostraron regresiones del cáncer, incluidos 13 de 57 pacientes con cáncer de células renales (23%) y 12 de 42 pacientes con melanoma (29%); se estableció entonces una dosis máxima de 600,000–720,000 UI/kg cada 8 h como la dosis máxima tolerada. La administración de IL-2 representó la primera inmunoterapia eficaz para el cáncer en humanos, estos estudios jugaron un papel importante al permitir que la inmunoterapia se uniera a la corriente principal del tratamiento del cáncer [82].

Desde entonces se ha buscado disminuir o evitar efectos adversos ocasionados por la implementación de terapias basadas en la utilización de IL-2, que van desde el aumento en los niveles séricos de creatinina y bilirrubina, y aumento de peso sustancial en los pacientes, hasta hipotensión, síndrome de fuga vascular generalizada que resulta en infiltrados pulmonares intersticiales y edema, arritmias cardíacas, así como toxicidades hematológicas y renales adicionales, que requieren un tratamiento adecuado [82, 83]. Para ello se han explorado diversas maneras de administrar la IL-2, por ejemplo: Disminuir las dosis de IL-2 utilizadas, IL-2 en complejo con anticuerpo anti IL-2, modificaciones en aminoácidos de IL-2, proteínas de fusión de IL-2, IL-2 en combinación con otras citocinas, quimioterapia o radioterapia, también en combinación con otras terapias de anticuerpos o vacunas, en combinación con otras terapias celulares que implementan células T y NK; o incluso se ha intentado su administración por aerosol. Todo ello con la esperanza de que la IL-2 también pueda ser empleada para combatir otros tipos de cáncer [77, 84-87].

En el caso del cáncer de cérvix la utilización de IL-2 es algo complejo ya que si bien líneas celulares derivadas de pacientes con este tipo de cáncer presentan el IL-2R funcional (lo cual no sucede en tejido cervical sano), también se ha reportado que estas células producen y secretan IL-2, indicando con ello que la IL-2 puede actuar como un factor de crecimiento autócrino también en células tumorales y no solo en células hematopoyéticas. Existe evidencia de que al administrar bajas dosis de IL-2 (10 UI/ml) a células derivadas de cáncer de cérvix aumenta la proliferación celular y fosforilación de la vía JAK/STAT, de manera contraria a lo que ocurre cuando se agrega 100 UI/ml de IL-2 donde disminuyen dichos procesos, indicando con ello que las vías de señalización activadas por IL-2 se encuentran alteradas en este tipo de células. Las proteínas JAK1 y JAK3 se encuentran presentes pero mientras que JAK3 aparece constitutivamente fosforilada, JAK1 no lo está, lo cual sugiere el papel preponderante de JAK3 en la señalización desencadenada por IL-2. Estos hallazgos podrían explicar el

porque de la reducción tumoral al utilizar la IL-2 en otros tipos de cáncer, sin embargo en este caso las células de cáncer de cérvix podrían verse beneficiadas al utilizar la IL-2 para desencadenar procesos tan importantes como la proliferación celular, proceso que depende de la correcta regulación del ciclo celular, el cual se encuentra alterado a causa del VPH [88-91].

Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso ubicuo y complejo involucrado en el crecimiento y proliferación celular, en la regulación de la reparación por daño al ADN, en hiperplasia de tejidos como respuesta a una lesión y en enfermedades como el cáncer. El ciclo celular emplea numerosas proteínas de regulación que dirigen a la célula a través de una secuencia específica de eventos que culminan en la mitosis y en la producción de dos células hijas; para ello el ADN debe replicarse con precisión y distribuirse copias cromosómicas idénticas a las células resultantes. Las fases del ciclo celular son G1, S, G2 y M; durante G1, la célula está sujeta a estimulación por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento; en respuesta a estos estímulos, la célula pasa a través de G1 y continúa con la síntesis de ADN en fase S; G2 es el intervalo entre la finalización de la síntesis de ADN y la mitosis; la fase M se conoce como el proceso de división nuclear y consta de las etapas profase, metafase, anafase y telofase. La regulación del ciclo celular debe garantizar que los eventos en cada fase se completen de manera correcta antes de pasar a la siguiente. Por lo tanto, existen puntos de control para asegurar la integridad del ADN y así evitar la progresión y proliferación de células mutadas o dañadas. El funcionamiento de estos puntos de control se basa en proteínas Cinasas Dependientes de Ciclina (CDKs) [92, 93].

Las CDKs son proteínas cinasa de serina/treonina que se caracterizan por la dependencia de subunidades proteicas separadas requeridas para la actividad enzimática conocidas como ciclinas. Cada complejo de CDK/ciclina es responsable de la transición o progresión de una fase dada en el ciclo celular. Aunque cabe señalar que existen CDKs que no participan de manera directa en el control del ciclo celular pero son importantes en fenómenos celulares como la transcripción del ADN (como CDK7), el mantenimiento de la estabilidad genómica (CDK12, CDK13), el desarrollo embrionario (CDK14), procesos apoptóticos (CDK15), neurológicos (CDK5), entre otros [94-97].

Una vez que llega la señal mitogénica comienza la acumulación de ciclina D (existen 3 miembros: D1, D2 y D3) debido a que se suprime su fosforilación y posterior ubiquitinación por GSK β y enzimas de la familia SCF respectivamente, esta acumulación lleva a su mayor disposición para poder unirse a CDK4/6, el complejo CDK4,6/ciclina D resultante puede entonces fosforilar a pRb pero solo en algunos de los sitios disponibles, manteniéndola hipofosforilada, sin embargo es suficiente para que disminuya su afinidad por el factor de transcripción E2F y este quede libre. Esto hace posible que comience la transcripción de genes involucrados en la transición de la fase G1 a la fase S como ciclina E lo que hace posible que ahora se forme el complejo CDK2/ciclina E; este complejo es de gran

importancia ya que se encargará de fosforilar en los sitios restantes a pRb, con lo cual se mantendrá hiperfosforilada para que E2F pueda seguir con la transcripción de genes involucrados en la fase S, por lo que el complejo CDK2/ciclina E promueve la iniciación de la replicación del ADN. Posteriormente CDK2 puede unirse a la ciclina A para asegurar la progresión a lo largo de la fase S. El complejo CDK1/ciclina A participa en el tránsito de la fase S a la fase G2 y por último el complejo CDK1/ciclina B regula la transición de la fase G2 a la fase M fosforilando sustratos que participan en la ruptura de la envoltura nuclear, condensación de los cromosomas y formación del uso mitótico [94, 98-100].

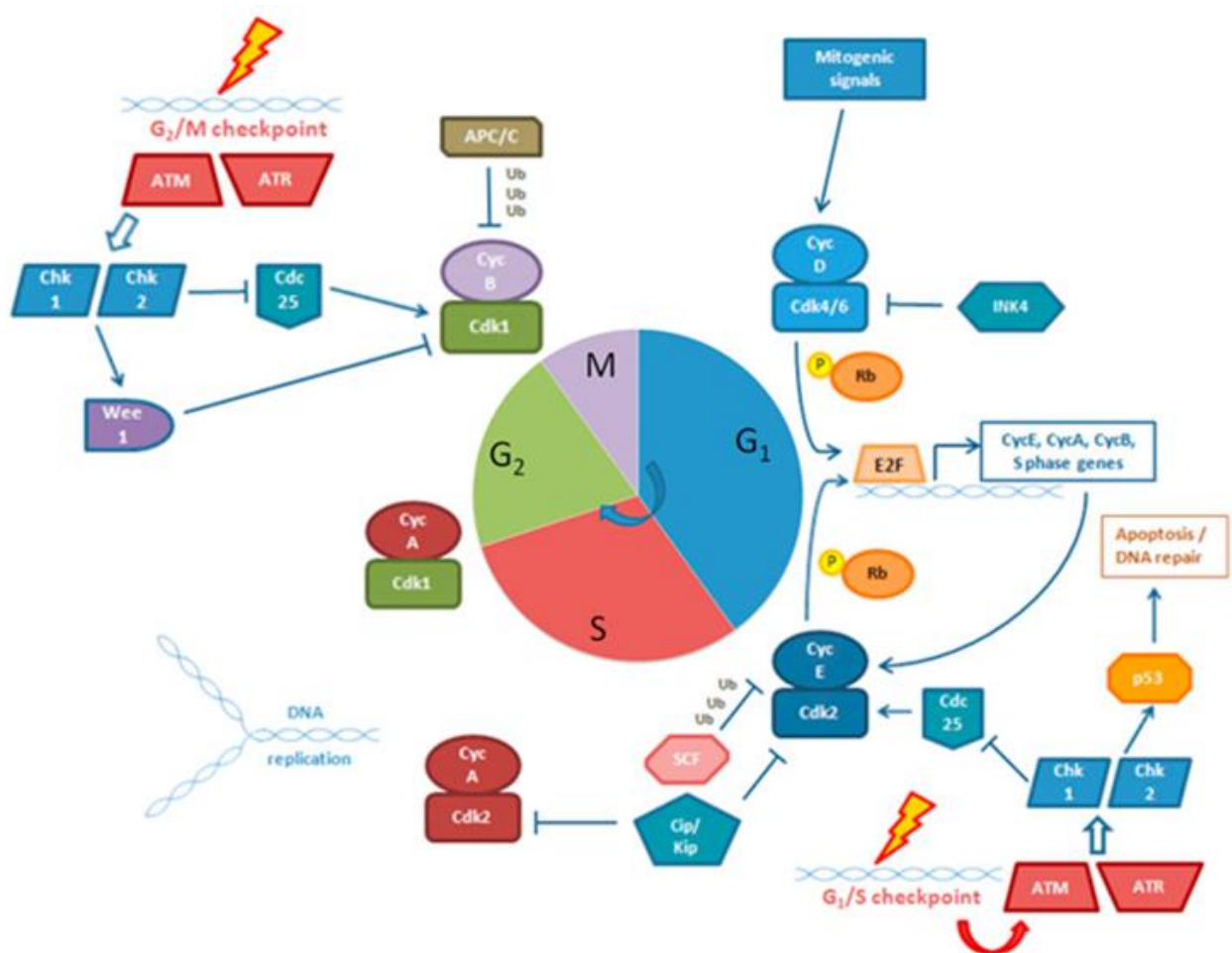


Figura 7. Visión general del ciclo celular. Los complejos CDK/ciclina son los encargados de asegurar la correcta progresión del ciclo celular, regulando cada fase del mismo mediante fosforilaciones de proteínas clave o siendo inhibidos por proteínas de la familia Cip/Kip e INK4. Además existen mecanismos que salvaguardan la integridad del ADN como la activación de la vía ATM-ATR. Tomado y modificado de Santo L, *et al.* [101].

La actividad de las CDKs a su vez está sometida al control de proteínas inhibidoras conocidas como CKIs que hacen mucho más robusto el control del ciclo celular; estas CKIs impiden la progresión del ciclo celular en respuesta a señales extracelulares o bien debido a que algún evento durante determinada fase no se llevó a cabo correctamente; dichas CKIs se han dividido en dos familias [102, 103]:

- Familia CIP/KIP. Incluye a las proteínas: p21, p27 y p57; las cuales inhiben a los complejos CDK4/ciclina D, CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A y CDK1/ciclina B.
- Familia INK4. Incluye a las proteínas: p15, p16, p18 y p19. Estas proteínas se unen solo a las CDK en el sitio de unión a la ciclina D, por lo que inhiben a CDK4 y CDK6 [102, 103].

Aunado a estas proteínas inhibidoras de la actividad de CDKs podemos encontrar otros mecanismo que trabajan junto con las CKIs como la vía ATM/ATR. Estas dos proteínas evitan que las células con daño en ADN puedan seguir transitando el ciclo celular. ATM es una cinasa que se activa cuando existe daño a ADN por ruptura de doble cadena, una vez activada puede fosforilar a p53, ya sea de manera directa o mediante la activación de CHK2, esta fosforilación de p53 conduce a su estabilización y evita que sea ubiquitinada para su degradación. Una vez que p53 se encuentra activa actúa como factor de transcripción e induce la expresión de genes como p21. Por su parte ATR puede activar a CHK1 para inhibir a las fosfatasa involucradas en la activación de los complejos CDK/ciclina, de esta manera ATM/ATR evitan que continúe la actividad de los complejos CDK/ciclina y detienen el ciclo celular para que se lleve a cabo la reparación del daño al ADN [104, 105].

Desregulación del ciclo celular en el cáncer.

Las células pueden detenerse temporalmente en los puntos de control del ciclo celular para permitir: 1) que el daño sea reparado, 2) la disipación de alguna señal exógena de estrés celular, o 3) censar la disponibilidad de factores de crecimiento o nutrientes. Defectos en estos puntos de control pueden desencadenar eventos por los cuales la célula pierde el control sobre el ciclo celular y a la postre puede derivar en una célula maligna o tumoral, esta alteración puede deberse a diferentes factores como radiación ultravioleta, tipo de alimentación, exposición a agentes carcinogénicos, estrés, infecciones por virus, daño espontáneo al ADN, entre otros [106, 107].

Este mal funcionamiento en los puntos de control los podemos encontrar en diferentes padecimientos como en el cáncer. CDK6 se ha encontrado sobre expresada en linfomas, leucemias, carcinoma de células escamosas, gliomas y meduloblastomas. La sobre expresión de CDK4 se ha reportado en melanoma, cáncer de mama, rdbomiosarcoma, osteosarcoma, glioblastoma y neuroblastoma. En el caso de CDK2 se ha encontrado sobre expresada en

carcinoma de células escamosas de laringe, melanoma avanzado y cáncer de mama, mientras que su hiperactivación, que se encuentra relacionada a la sobre expresión de ciclina A y E, se ha demostrado en osteosarcoma, melanoma, carcinoma de pulmón y tiroides, cáncer de ovario y carcinomas endometriales. [101].

Gracias al estudio de estos complejos CDK/ciclina se ha logrado una mayor comprensión de su papel en la regulación del ciclo celular y su participación en procesos como el cáncer, por lo que constituyen un atractivo blanco terapéutico a emplear contra dicho padecimiento. Ya se ha avanzado en el desarrollo de medicamentos dirigidos hacia los complejos CDK/ciclina para tratar de restablecer su actividad normal, sin embargo, el desafío es desarrollar medicamentos que inhiban la hiperactividad de estos complejos con alta eficiencia, especificidad y selectividad, al mismo tiempo de provocar el mínimo de efectos secundarios tóxicos y la aparición de resistencia con el paso del tiempo [108].

CDK2

CDK2 es una proteína cinasa de Ser/Thr con un peso molecular de 33.931 kDa con 298 residuos de aminoácidos en su estructura. Conocida anteriormente como proteína cinasa de división celular 2, proteína cinasa p33 o DKN2; CDK2 juega un papel crucial en la regulación de múltiples eventos en el ciclo celular, como la duplicación del centrosoma, la síntesis de ADN, la transición de la fase G1 a la fase S y la progresión de la fase S [109].

El mecanismo de regulación de CDK2 ha sido investigado en estudios estructurales, mutacionales, y teóricos; ahora es extensamente empleado como modelo general de activación de CDKs. La activación completa de CDK2 requiere la unión de ciclina A o E y la fosforilación en el residuo Treonina 160 (Thr160) en el segmento de activación (también conocido como T-loop) por una cinasa activadora de CDK. En ausencia de estas características no puede estar activa porque los residuos que forman los sitios de reconocimiento catalítico y de sustrato están desordenados. La estructura de la ciclina no cambia significativamente durante la activación de CDK2 pero muchos de los residuos de CDK2 se realinean hacia su configuración activa [110].

Existen dos segmentos importantes en el dominio C-terminal de CDK2, además de los residuos catalíticos que están a cargo de la fosforilación, así como el segmento de activación. Entre ellos, este segmento de activación abarca residuos entre el motivo conservado DFG (residuos 145-147) y el motivo APE (residuos 170-172), y también incluye el sitio de fosforilación, es decir, el residuo Thr160, aunque éste se encuentra escondido debido a la conformación proteica. El T-loop que se encuentra en la entrada de la hendidura catalítica, retiene los sustratos polipeptídicos y, de esta manera, evita que entren en la hendidura para interactuar con el ATP. Además, el residuo Glu51 que se ubica en la hélice PSTAIRE, se encuentra hacia el exterior de la hendidura de catálisis. Incluso la

disposición de los residuos de arginina (Arg50, Arg126 y Arg150) en la hendidura catalítica también es de gran importancia para la activación de CDK2. Cuando la ciclina se une a CDK2, se producen algunos cambios estructurales que conducen a una ligera ampliación del sitio activo, luego liberan la hendidura catalítica y exponen el sitio de fosforilación en el T-loop gracias a que la hélice PSTAIRE gira 90°. Una vez que ocurre esto, se necesita la fosforilación activadora en Thr160 por parte de la cinasa activadora de CDK (CAK), el cual es un complejo formado por CDK7/ciclina H/Mat1. Esta fosforilación da como resultado la total activación de CDK2 y una nueva conformación en donde existe una mayor accesibilidad al sitio activo y de unión a sustrato; por último, cuando el sustrato se encuentra presente, el G-loop muestra mayor flexibilidad y se mueve hacia él. Un mecanismo más para regular la actividad de CDK2 es la fosforilación inhibitoria en los residuos Thr14 y Tyr15, ambos se encuentran en medio del G-loop rico en glicina que sirve como un ancla de fosfato en la unión de ATP; la fosforilación en uno o ambos de estos sitios también podría inhibir la actividad de la cinasa al interferir con la unión del sustrato o al afectar indirectamente la orientación de ATP al cambiar la conformación del G-loop. [110-114].

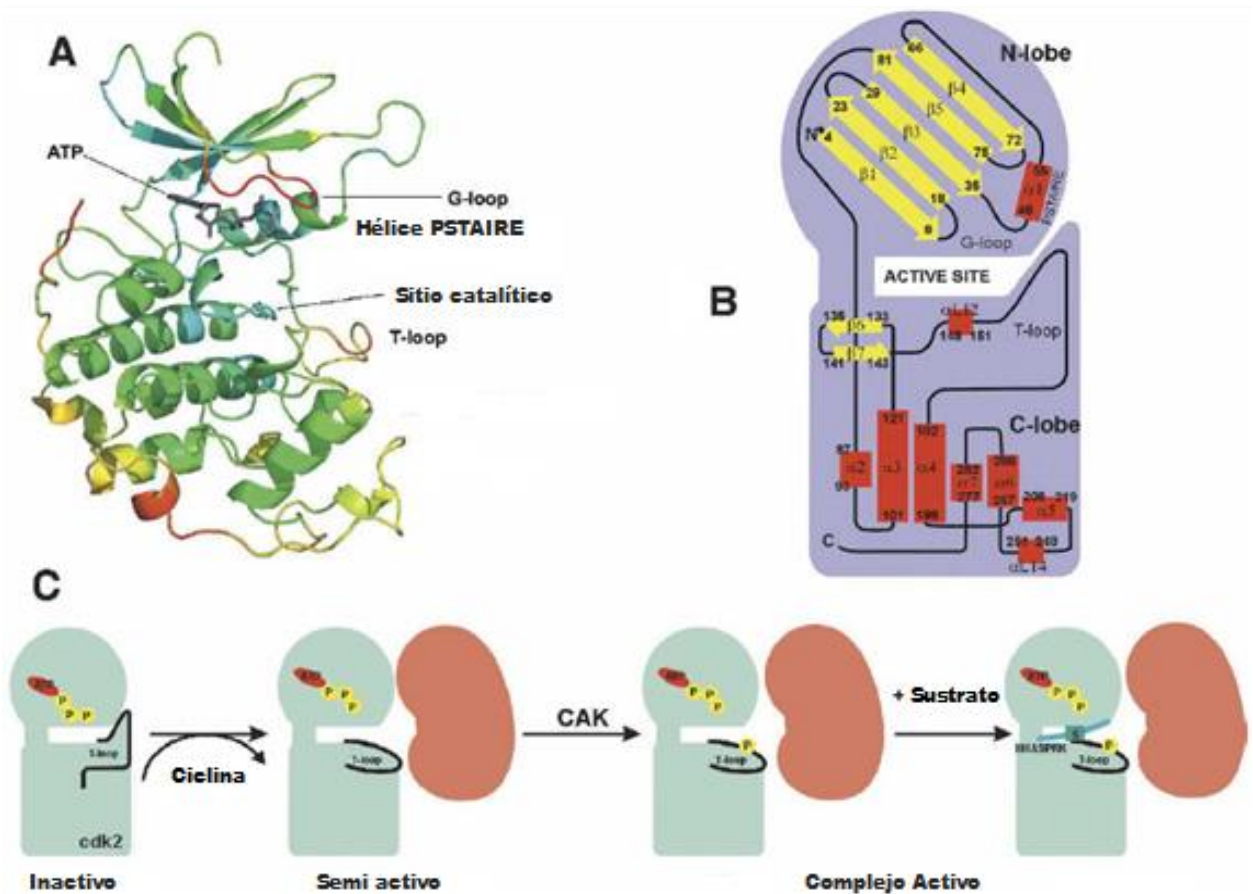


Figura 8. A) Estructura secundaria de CDK2, B) Representación esquemática de las α hélices y láminas β de CDK2, C) Activación de CDK2 mediante unión de ciclina y fosforilación en Thr160. Tomado y modificado de Bártová, *et. al.*, 2008 [110].

La forma activa del complejo CDK2/ciclina E la podemos encontrar al final de la fase G1 e inicio de la fase S, por lo tanto su actividad da como resultado la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular, lo cual deriva en la consecuente proliferación celular. Sin embargo, el mal funcionamiento en los circuitos de regulación de dicho proceso se produce con frecuencia en el cáncer en humanos. La correlación entre la actividad de CDK2 y la tasa mitótica en los tumores implica un papel importante para esta cinasa en la proliferación del cáncer, incluso la alta actividad de CDK2 se ha asociado con un mejor resultado en el cáncer de colon, pero un peor resultado en otros cánceres, los cuales muestran baja actividad de CDK2. Por lo tanto, el aumento en la actividad de CDK2 puede tener actividad oncogénica incluso en tumores con bajo contenido de esta cinasa [115, 116].

En el caso del cáncer de cérvix, la proteína viral VPH E7 desregula inicialmente a pRb permitiendo la liberación de E2F y este factor de transcripción a su vez desencadena la expresión de ciclina E, facilitando con ello que se forme el complejo CDK2/ciclina E, el cual puede fosforilar e inactivar a pRb; mientras que VPH E6 al inducir la degradación de p53, interfiere con la activación de los inhibidores del complejo CDK2/ciclina E y CDK2/ciclina A como p21 y p27, estableciendo así un mecanismo que asegura la activación de los complejos CDK2/ciclina en todo momento, es por esa razón que tanto ciclina E como CDK2 se encuentran sobre expresadas en el cáncer de cérvix [117, 118].

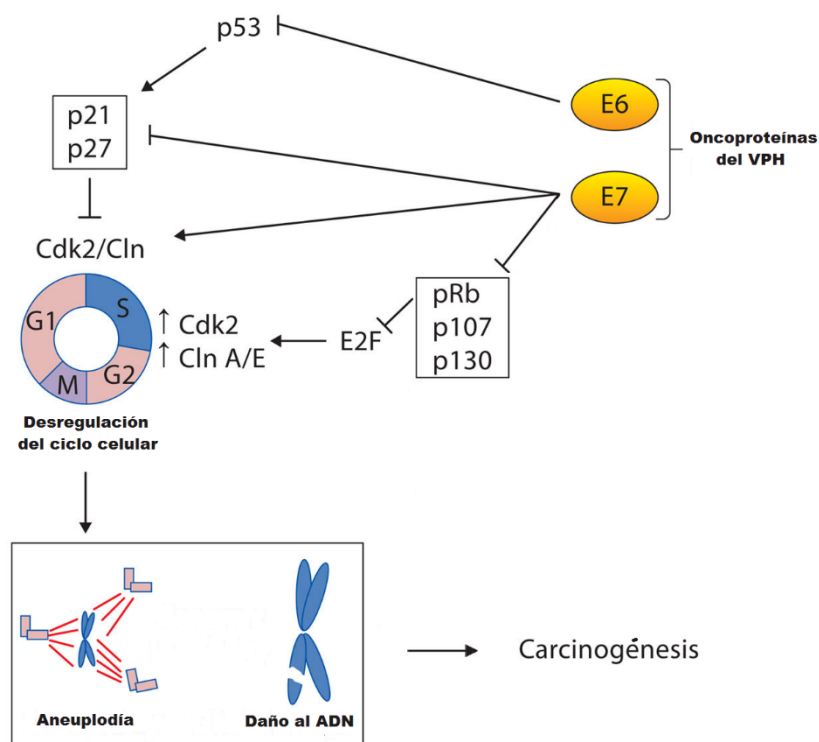


Figura 9. Mecanismos moleculares desencadenados por la actividad de las oncoproteínas VPH E6 y VPHE7 mediante los cuales pueden inhibir la actividad de p53 y la familia pRb para provocar la activación de CDK2/ciclina E. Tomado y modificado de Lehoux M, *et. al.*, [118].

Wu K y colaboradores, mediante herramientas informáticas, encontraron que la expresión de CDK2 era mayor en tejido proveniente de cáncer de cérvix en comparación con epitelio cervical sano. También realizaron un estudio de PPI (red de interacción proteína-proteína) en donde obtuvieron un grupo de genes expresados en lesiones pre invasivas (asociados a procesos como replicación de ADN y ciclo celular) y otro grupo de genes expresados en lesiones invasivas (asociados a procesos de adhesión celular). De manera interesante, CDK2 se encontró dentro de los cuatro genes que conectaban a ambos grupos, sugiriendo un papel importante en la progresión del cáncer de cérvix [119].

Debido a la importancia de CDK2 para la regulación del ciclo celular tanto en células normales como de cáncer, no sorprende el hecho de que sea señalada como un potencial blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos o terapias que puedan inhibir su actividad, por lo que es necesario realizar una investigación más exhaustiva y así evitar causar un mayor daño en el aparato de control del ciclo celular [109, 120].

Planteamiento del problema

En la búsqueda de alternativas para combatir diversos tipos de cáncer, se han propuesto citocinas, como la interleucina-2 (IL-2), para su uso terapéutico y de esta manera lograr un mecanismo que coadyuve con los tratamientos convencionales como cirugía, radioterapia y quimioterapia. Datos obtenidos por nuestro equipo de trabajo han demostrado que células de cáncer de cérvix proliferan con un tratamiento de 10 UI/mL de IL-2 y que disminuye su proliferación con un tratamiento de 100 UI/mL de IL-2, lo cual sugiere que la actividad de la IL-2 está involucrada en proliferación celular, ofreciendo así una ventana de oportunidad para su implementación terapéutica. Ya que se ha reportado que la expresión de CDK2 es mayor en tejido proveniente de cáncer de cérvix en comparación con epitelio cervical sano y además es una proteína clave en el proceso de proliferación celular debido a que participa en la transición de la fase G1-S, CDK2 ha sido señalada como blanco terapéutico, por lo que es de gran importancia dilucidar si existe algún efecto sobre la expresión y activación de CDK2 bajo un tratamiento de 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 que pudiera relacionarse con la proliferación en células de cáncer cérvix.

Hipótesis

La IL-2 en concentración de 10 UI/mL induce un aumento en la expresión y activación de CDK2, de manera contraria 100 UI/mL de IL-2 induce una disminución en la expresión y activación de CDK2 en líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL.

Objetivo general

- Determinar si la IL-2 a una concentración de 10 UI/mL o 100 UI/mL afecta la expresión y activación de CDK2 en células de cáncer de cérvix HeLa e INBL.

Objetivos particulares

- Diseñar los oligonucleótidos para *CDK2* y así analizar su expresión en células HeLa e INBL.
- Estandarizar las condiciones experimentales para analizar la expresión de *CDK2*.
- Determinar si existen cambios en los niveles de expresión de *CDK2* en las líneas HeLa e INBL incubadas con 10 ó 100 UI/mL de IL-2.
- Definir el tiempo (horas) en que ocurre la transición G1-S del ciclo celular en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL.
- Estandarizar la técnica de Western-blot para identificar CDK2 en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL.
- Evaluar la presencia y activación de la proteína CDK2 en la transición G1-S del ciclo celular en las líneas de cáncer de cérvix HeLa e INBL.

Metodología

Material biológico

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix HeLa e INBL, obtenidas de material criopreservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Las células HeLa e INBL se cultivaron en medio DMEM (Microlab S.A de C.V.) y medio RPMI-1640 (Microlab S.A de C.V.) respectivamente, suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific.) en botellas de cultivo tratadas para células adherentes en monocapa (Sarstedt, Alemania). Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones constantes a 37°C, 5% de CO₂ y humedad saturada.

Transcripción reversa

Para determinar la expresión de *CDK2* se cultivaron 4×10^5 células durante 24 y 48 horas sin IL-2, con 10 UI/mL o con 100 UI/mL de IL-2. También se cultivó un grupo más de células durante 48 horas con 10 UI/mL ó con 100 UI/mL de IL-2, al concluir las 48 horas el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco sin IL-2 incubándolas 24 horas más (a estas muestras se les denominará en adelante como condición de 72 horas). Posteriormente se obtuvo el ARN total por el método de Trizol (Ambion, Thermo Fisher Scientific.) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN complementario se sintetizó utilizando 3 µg de ARN total y 1 µL oligo-dT (0.5µg/µL), incubando a 37°C por una hora, con el buffer de transcripción inversa (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM), dATP, dTTP, dCTP y dGTP 10 mM Promega (Madison, WI, USA) y 1 µL de transcriptasa inversa MMLV (200 U/µL) de Gibco BRL Life Technology (Grand Island, NY, USA).

Diseño de Oligonucleótidos para PCR

Para obtener los oligonucleótidos necesarios para la amplificación del gene *CDK2* mediante PCR se realizó la búsqueda de la secuencia codificante para nuestra proteína de interés en la base de datos NCBI, posteriormente se usaron herramientas informáticas para obtener los posibles oligonucleótidos que pudieran hibridar con el ADN complementario obtenido de la retrotranscripción. Por último, se probaron los mejores pares de oligonucleótidos mediante PCR virtual (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/epcr/>) para determinar el par útil para los ensayos.

Amplificación por PCR

Para cada reacción se utilizaron 3 µg de ADN complementario, 3 µL de buffer de reacción ((NH₄)₂SO₄), 2.5 µL de MgCl₂, 0.2 µL de Taq polimerasa Promega (Madison, WI, USA), 0.9 µL de dNTPs 10 Mm y por último se llevaron a un volumen final de 20 µL con agua libre de nucleasas. La amplificación consistió en 30 ciclos, cada uno de 95°C por 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen, USA). El agente de tinción que se utilizó fue Bromuro de etidio (Promega, Madison, USA). Finalmente, las imágenes se obtuvieron después de someter el gel de agarosa a la exposición de rayos UV utilizando el transiluminador UVP con sistema DigiDoc-It (UVP, USA).

Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Se cultivaron 1x10⁶ de células de cada línea, analizándolas a intervalos de una hora durante 30 horas. Después del tiempo de incubación las células se lavaron con PBS y se fijaron con un mililitro de etanol al 75% durante toda una noche a 4°C. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS, se les agregó 200 µL de ribonucleasa A (Sigma Chemical, CO. USA) (1 mg/mL) a 37°C durante una hora para eliminar el ARN presente. Una vez transcurrida la hora de incubación se agregó 3 µL de yoduro de propidio (Sigma Chemical, CO. USA) (50 mg/mL) agitando suavemente e incubando durante 10 minutos. Por último, se analizaron las fases del ciclo celular utilizando el citómetro FACSAria II (BD Biosciencias, CA. USA). Los datos obtenidos se analizaron con ayuda de software Flowing Software 2.5.1.0 (Flowing Software, Finland).

Lisis celular e inmunoprecipitación

Las células se incubaron con 10 UI/mL ó 100 UI/mL de IL-2, además de un grupo sin tratamiento de IL-2 como control, durante 3, 7 y 12 horas para línea HeLa; y 6, 10 y 15 horas para la línea INBL ya que fue el tiempo determinado en que ocurre la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.

Después de transcurrido el tiempo de incubación con el tratamiento de IL-2, las células se lavaron una vez con PBS frío (4°C), se retiró el PBS y se agregó 500 µL de buffer de lisis, las células se despegaron utilizando un gendarme. Posteriormente, se depositó la solución en tubos Eppendorf y se incubaron durante 15 minutos en hielo; una vez transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante resultante fue nuestro lisado celular.

En tubos Eppendorf se colocaron 25 µL de esferas de agarosa conjugadas con proteína A (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se lavaron dos veces con buffer de lisis. Una vez lavadas se agregaron 40 µL de buffer de lisis más 1.5 µL de anticuerpo p-CDK2 (Thr160) (Cell Signaling Technology, USA) y se incubaron por una hora a 4°C en agitación. Después de dicho tiempo, las esferas ya con el

anticuerpo acoplado se lavaron con buffer de lisis y se incubaron durante tres horas a 4°C en agitación constante con los lisados de células tratadas con IL-2, o el lisado de células sin dicho tratamiento como control negativo. Después de transcurrido el tiempo de incubación las esferas se lavaron tres veces con buffer de lisis y se agregaron 20 µL de buffer de Laemmli reductor a cada tubo, posteriormente se llevaron a un contenedor con agua en ebullición durante 5 minutos. Finalmente, las muestras estuvieron listas para la posterior electroforesis o bien para su almacenamiento a -20°C.

Electroforesis (SDS-PAGE) y Western blot

Se realizó de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador fue de 4.5%. Las concentraciones finales del gel separador fueron: Tris-HCl 0.375 M (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) (pH 8.9), SDS 0.1% p/v y poliacrilamida 10% p/v. Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. USA) y tetrametileno-diamina (TEMED) (Sigma Chemical, Co. USA) para el gel separador o 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. El buffer de corrida (pH 8.3) contenía Tris 0.025 M y glicina 0.192 M. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85 V por durante dos horas en una cámara vertical (ATTO, Japón).

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse-Andersen en una cámara de transferencia semiseca (Nova Blot, GE. USA) a corriente constante de 125 mA durante una hora utilizando buffer de transferencia. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloqueó con BSA al 3% p/v en buffer TBS durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo p-CDK2 (Thr160) (Cell Signaling Technology, USA) (1:1000) durante 1.5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación la membrana se lavó tres veces con TBS-Tween y dos veces más con TBS por cinco minutos cada uno. Después se incubó con el anticuerpo anti-rabbit conjugado con peroxidasa (HRP) (1:7000) durante 40 minutos. Posteriormente, se realizaron cinco lavados más y se visualizaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (Pierce, USA).

Elución de anticuerpos

Se lavó una vez la membrana con TBS, después se adicionó buffer de elución (Glicina 0.1 M y SDS 0.5%) cubriendo completamente la membrana y se incubó durante una hora a 80°C. Al término de dicho tiempo se lavó una vez con TBS-Tween por 15 minutos en agitación constante, posteriormente se realizaron tres lavados más con TBS-Tween por cinco minutos cada uno para finalmente bloquear la membrana con BSA al 4% durante toda la noche. Una vez hecho esto se pudo incubar con el anticuerpo anti-CDK2 (Santa Cruz Biotechnology, USA) (1:1000) durante una hora y media. Al finalizar el tiempo de incubación de realizaron cinco lavados de cinco minutos cada uno y se incubó con el anticuerpo

anti-mouse conjugado con peroxidasa (1:7000) durante 30 minutos. Finalmente se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween y dos veces más con TBS por cinco minutos cada uno. Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia.

Software utilizado

La densitometría aplicada tanto a los geles de poliacrilamida para observar la expresión como a los inmunoblots para observar la fosforilación de CDK2, se realizó con el programa Image Studio Lite versión 5.2.

Para el análisis del ciclo celular utilizamos el programa Flowing Software 2 versión 2.5.1.0.

Resultados

Oligonucleótidos para *CDK2*

El par de oligonucleótidos que se obtuvo al utilizar las herramientas informáticas fue:

	Secuencia (5' > 3')
Forward primer	CCTGAAATCCTCCTGGGCTG
Reverse primer	ACTGGCTTGGTCACATCCTG
Longitud del producto	368 pares de bases

Expresión de *CDK2* en la línea HeLa

La intención de cultivar células HeLa durante 24 y 48 horas con 10 UI/mL o con 100 UI/mL de IL-2 y después cambiar el medio de cultivo por medio fresco sin IL-2 para cultivarlas por 24 horas más, fue establecer si los cambios en la expresión de *CDK2* generados por el tratamiento podían mantenerse, incluso una vez eliminada la IL-2 exógena.

En la **figura 10** se muestra un gel representativo de tres ensayos independientes, se observa que después de 24 horas de tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 la expresión de *CDK2* disminuyó 30.93% mientras que con 100 UI/mL de IL-2 la expresión de *CDK2* aumentó 21.54%, ambos porcentajes con respecto al control. A las 48 horas de tratamiento con IL-2, ya sea con 10 UI/mL o con 100 UI/mL se registró un aumento en la expresión de *CDK2* siendo de 32.76% y 49.15% respectivamente. Cuando cultivamos las células por 24 horas más en ausencia de IL-2 se observa una disminución en la expresión de *CDK2*. Esta disminución fue de 4.5% cuando se trataron previamente con 10 UI/mL de IL-2 y de 19.81% cuando se trataron con 100 UI/mL de IL-2. Estos resultados sugieren que el tratamiento con IL-2 exógena afecta la expresión de *CDK2*.

Expresión de *CDK2* en la línea INBL

Para esta línea celular también se muestra un gel representativo de tres ensayos independientes, donde se observa un cambio en la expresión de *CDK2* (**figura 11**). Después de las primeras 24 horas de tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 la expresión de *CDK2* disminuyó 30.8%, mientras que con 100 UI/mL de IL-2 aumentó 4.8%. Posteriormente, a las 48 horas observamos un aumento en la expresión de *CDK2* con el tratamiento de 10 y 100 UI/mL de IL-2 siendo de 81.89% y 84.91% respectivamente. Por último, en nuestro grupo de 72 horas se observó una disminución en la expresión de *CDK2* siendo de 2.88% con el tratamiento de 10 UI/mL de IL-2 y de 25.27% con el tratamiento de 100 UI/mL de IL-2.

Expresión del gen *CDK2* en HeLa

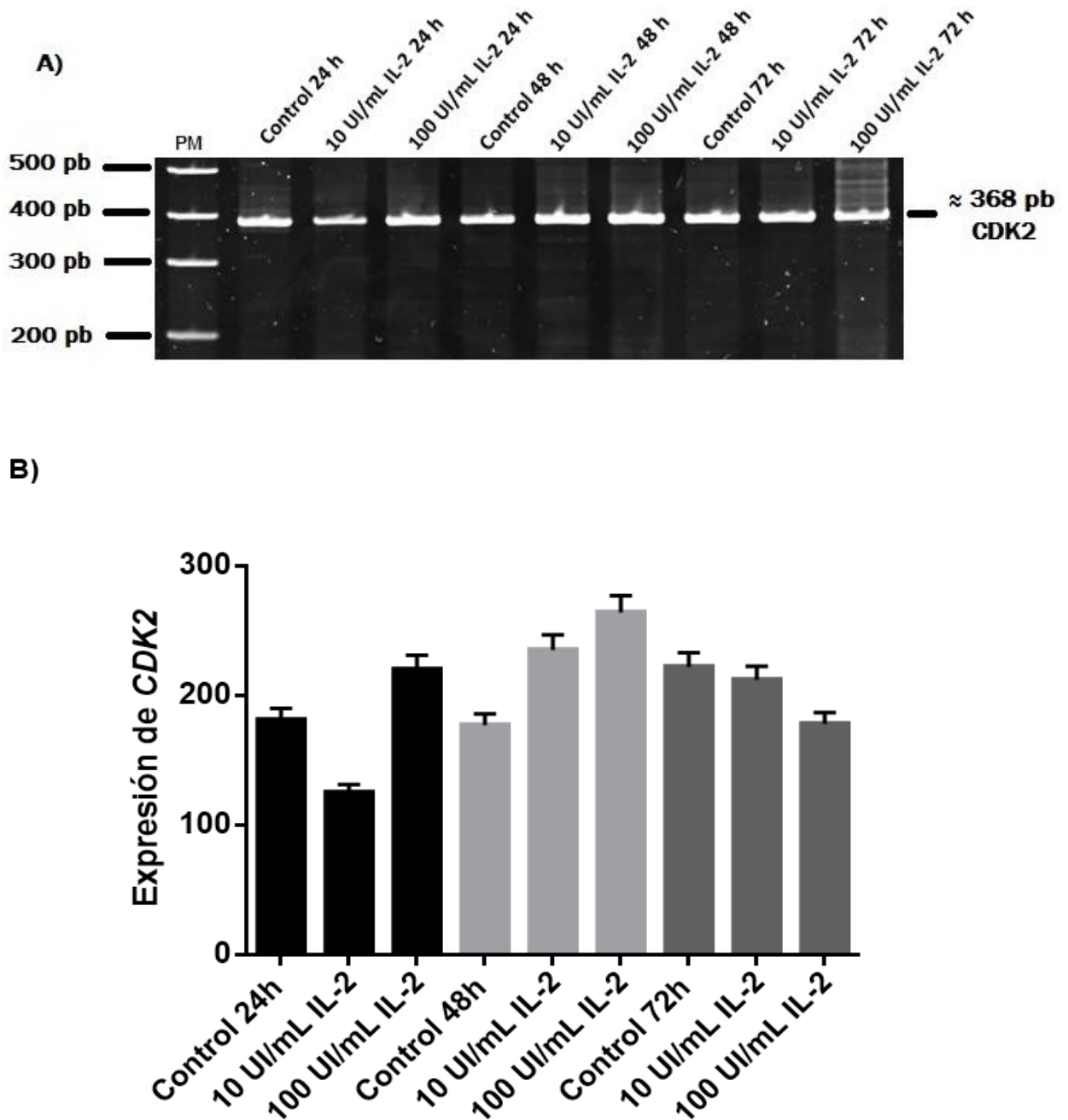


Figura 10. Evaluación de la expresión de *CDK2* en la línea HeLa. **A)** Gel representativo de tres ensayos independientes donde se realizó RT-PCR para *CDK2*. PM: Peso molecular, pb: pares de bases. **B)** Gráfica de los datos obtenidos en la densitometría aplicada al gel de poliacrilamida en donde se observan las distintas bandas de expresión de *CDK2*.

Expresión del gen *CDK2* en INBL

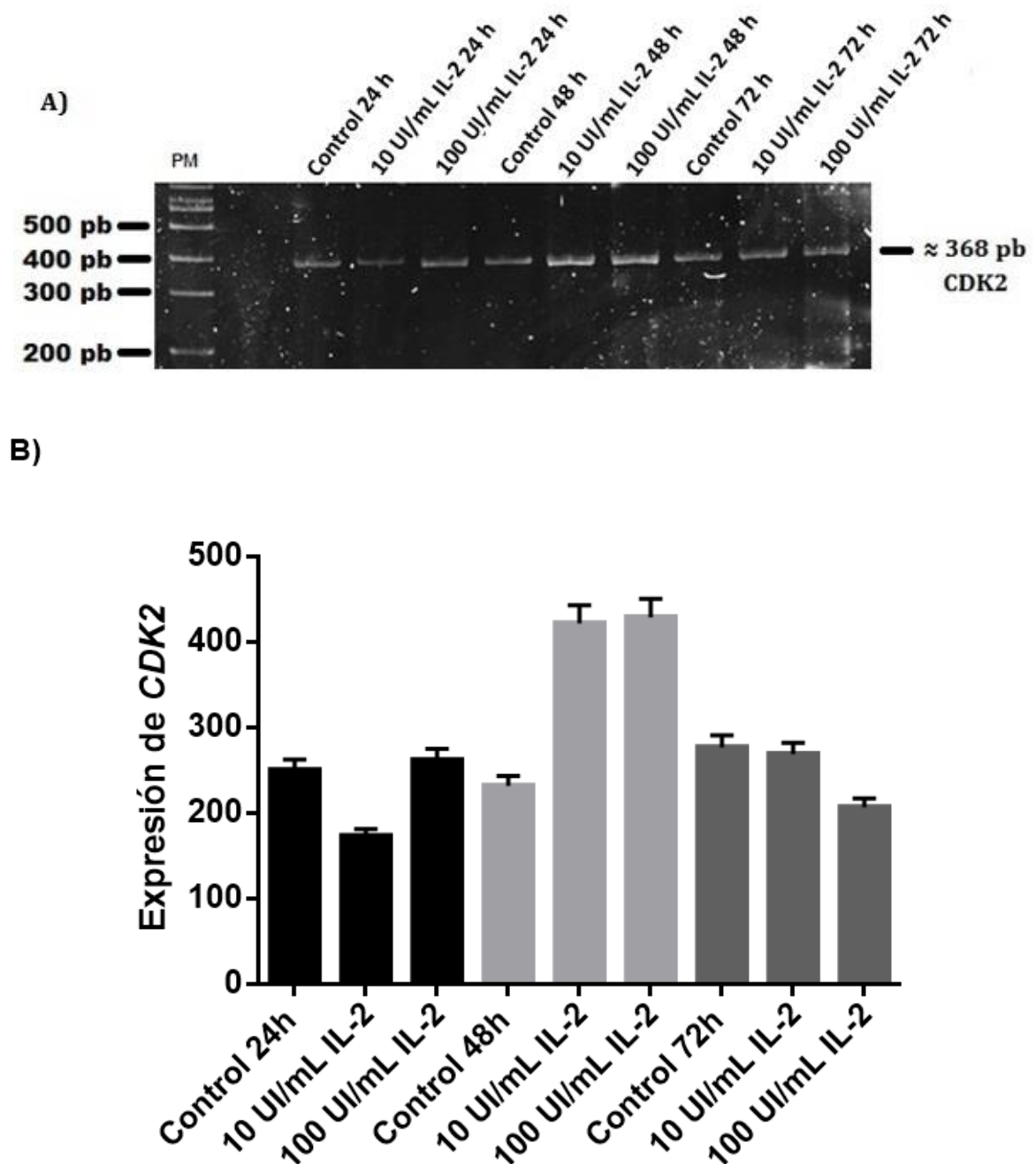


Figura 11. Evaluación de la expresión de *CDK2* en la línea INBL. **A)** Gel representativo de tres ensayos independientes donde se realizó RT-PCR para *CDK2*. PM: Peso molecular, pb: pares de bases. **B)** Gráfica de los datos obtenidos en la densitometría aplicada al gel de poliacrilamida en donde se observan las distintas bandas de expresión de *CDK2*.

Transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular

Ya que se observaron cambios en la expresión de *CDK2* en respuesta al tratamiento con IL-2, ya sea con 10 o 100 UI/mL, nos enfocamos en analizar el ciclo celular tanto de la línea HeLa como INBL; específicamente nos interesó examinar la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular ya que ahí se encuentra uno de los más importantes puntos de control en donde participa *CDK2* para la progresión del ciclo celular y en consecuencia de la proliferación celular. Sin embargo, había que determinar en qué momento ocurría esta transición G1-S para ambas líneas celulares (HeLa e INBL). Por ello se realizó el ensayo con duración de 30 horas, el cual nos permitió obtener el porcentaje de células que se encontraba en cada fase del ciclo celular durante el total de horas del ensayo.

Para poder establecer en que tiempo ocurre la transición G1-S, tomamos el valor más bajo a partir del cual comenzó el aumento en el porcentaje de células en fase S, lo cual significa que las células estaban entrando a dicha fase del ciclo celular. De igual manera, nos apoyamos en la gráfica tanto de la fase G1 como de la fase S para corroborar que el comportamiento de una fase coincidía con el de la otra. En la línea celular HeLa observamos que la transición G1-S inicia alrededor de las siete horas de cultivo, mientras que en la línea celular INBL inicia después de 10 horas de cultivo (**figura 12**).

Análisis de la transición G1-S del ciclo celular

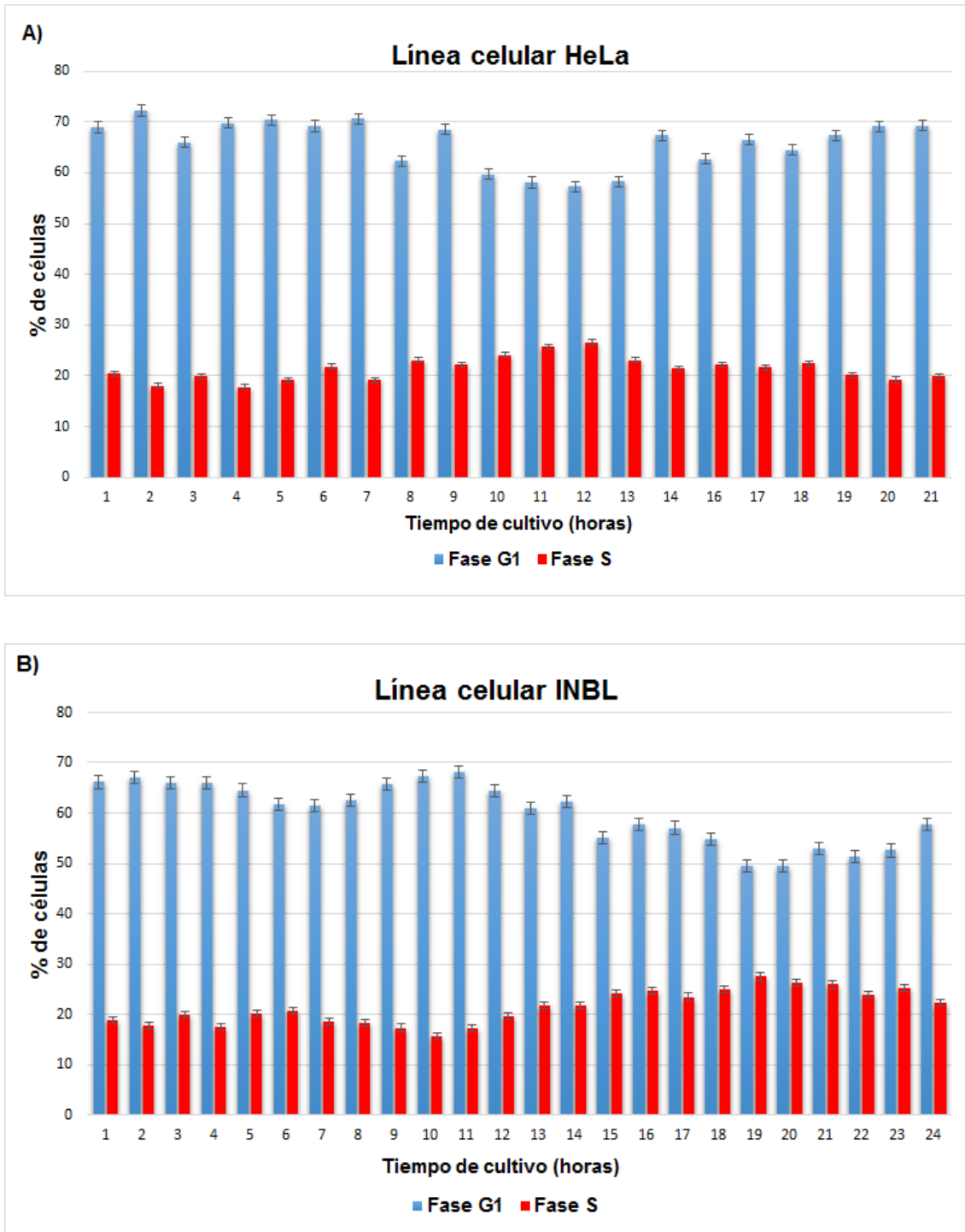


Figura 12. Gráfica de los datos obtenidos mediante citometría de flujo. **A)** En la línea celular HeLa la transición G1-S ocurre alrededor de las siete horas de cultivo. **B)** En la línea celular INBL se aprecia mejor dicha transición, la cual ocurre alrededor de las 10 horas de cultivo. El ensayo se repitió dos veces para cada línea celular y se analizó con ayuda del software Flowing Software versión 2.5.1.0.

Activación de CDK2

Una vez que se determinó el inicio de la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en ambas líneas celulares, el siguiente paso fue analizar la activación de CDK2 (evaluando la fosforilación en Thr160) en dicha transición. Para ello se seleccionaron tres diferentes tiempos en cada línea celular: I) antes de la transición G1-S, II) el tiempo en que ocurre la transición G1-S y III) después de que ocurre la transición G1-S. Esto con la finalidad de obtener un panorama sobre la activación de CDK2 en esta importante transición del ciclo celular.

Fosforilación de CDK2 en la línea HeLa

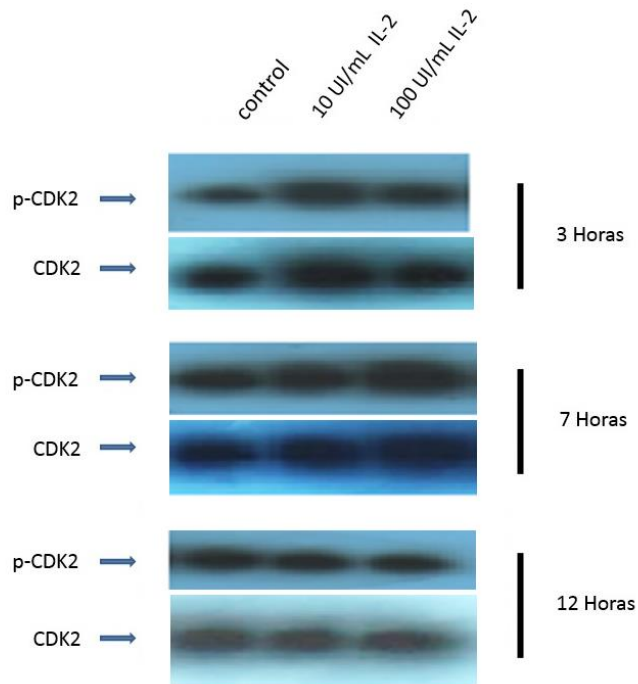
En la línea celular HeLa la activación de CDK2 se evaluó a las tres, siete y doce horas de cultivo con y sin tratamiento de IL-2. Pudimos observar que en los grupos control (células sin tratamiento de IL-2) la activación de CDK2 fue aumentando conforme transcurría el tiempo, siendo su mayor nivel a las 12 horas; de las tres a las siete horas de cultivo la activación de CDK2 aumentó 140%, mientras que de las siete horas a las doce horas aumentó 27.91%.

Bajo el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2, la activación de CDK2 aumentó con respecto al control a las tres y siete horas en 154% y 9.58% respectivamente; pero a diferencia del comportamiento en las muestras control, en donde la fosforilación de CDK2 siempre va en aumento, a las 12 horas de tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 se observa una disminución de 9.77% en la fosforilación de CDK2 con respecto al control pero sin regresar al nivel observado a las tres y siete horas.

Un comportamiento similar se observó bajo el tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 en donde la fosforilación de CDK2 aumentó en un 111% con respecto al control a las tres horas, aunque en menor medida que lo mostrado para el tratamiento de 10 UI/mL de IL-2, mientras que a las siete horas el aumento en la fosforilación de CDK2 fue de 23.33% con respecto al control. Sin embargo, a las 12 horas de tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 se observa una disminución de 26.38% en la activación de CDK2 con respecto al control (**figura 13**).

Activación de CDK2 en la línea HeLa

A)



B)

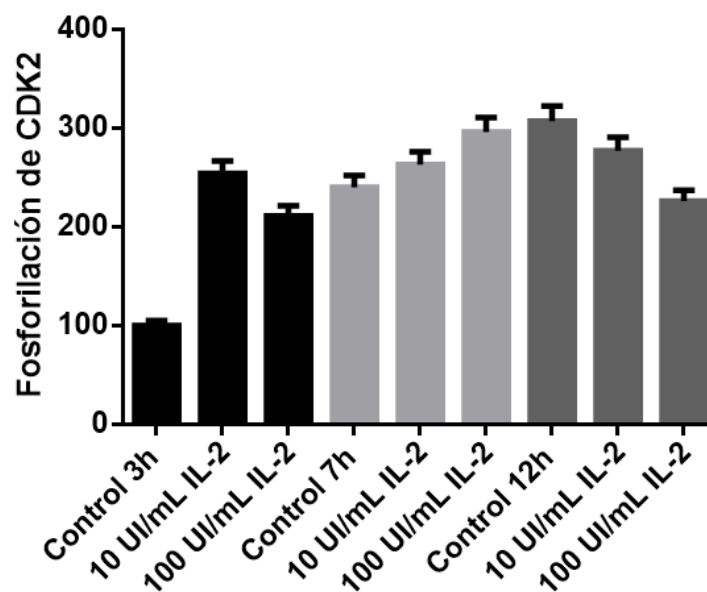


Figura 13. Fosforilación de CDK2 en HeLa. **A)** Inmunoblot representativo de tres ensayos independientes, p-CDK2: CDK2 fosforilada en Thr160 (activa). CDK2: Proteína CDK2 total. **B)** Gráfica de los datos obtenidos mediante densitometría aplicada al inmunoblot.

Fosforilación de CDK2 en la línea INBL

En la línea celular INBL los tiempos de evaluación seleccionados fueron: seis, 10 y 15 horas. De manera similar a lo observado para la línea HeLa, en nuestros grupos control la fosforilación de CDK2 en Thr 160 aumentó con el transcurso del tiempo, siendo su máximo nivel a las 15 horas de cultivo; de las seis a las 10 horas de cultivo aumentó 39.28% y de las 10 a las 15 horas el aumento fue de 2.56%. En esta línea celular no fueron evidentes cambios en la fosforilación de CDK2 con el tratamiento de IL-2 después de seis y 10 horas de incubación.

Se observó disminución en la activación de CDK2 después de 15 horas de incubación con IL-2, la cual fue de 20.62% bajo el tratamiento de 10 UI/mL de IL-2 y de 58.81% bajo el tratamiento de 100 UI/mL de IL-2 (**figura 14**).

Activación de CDK2 en la línea INBL

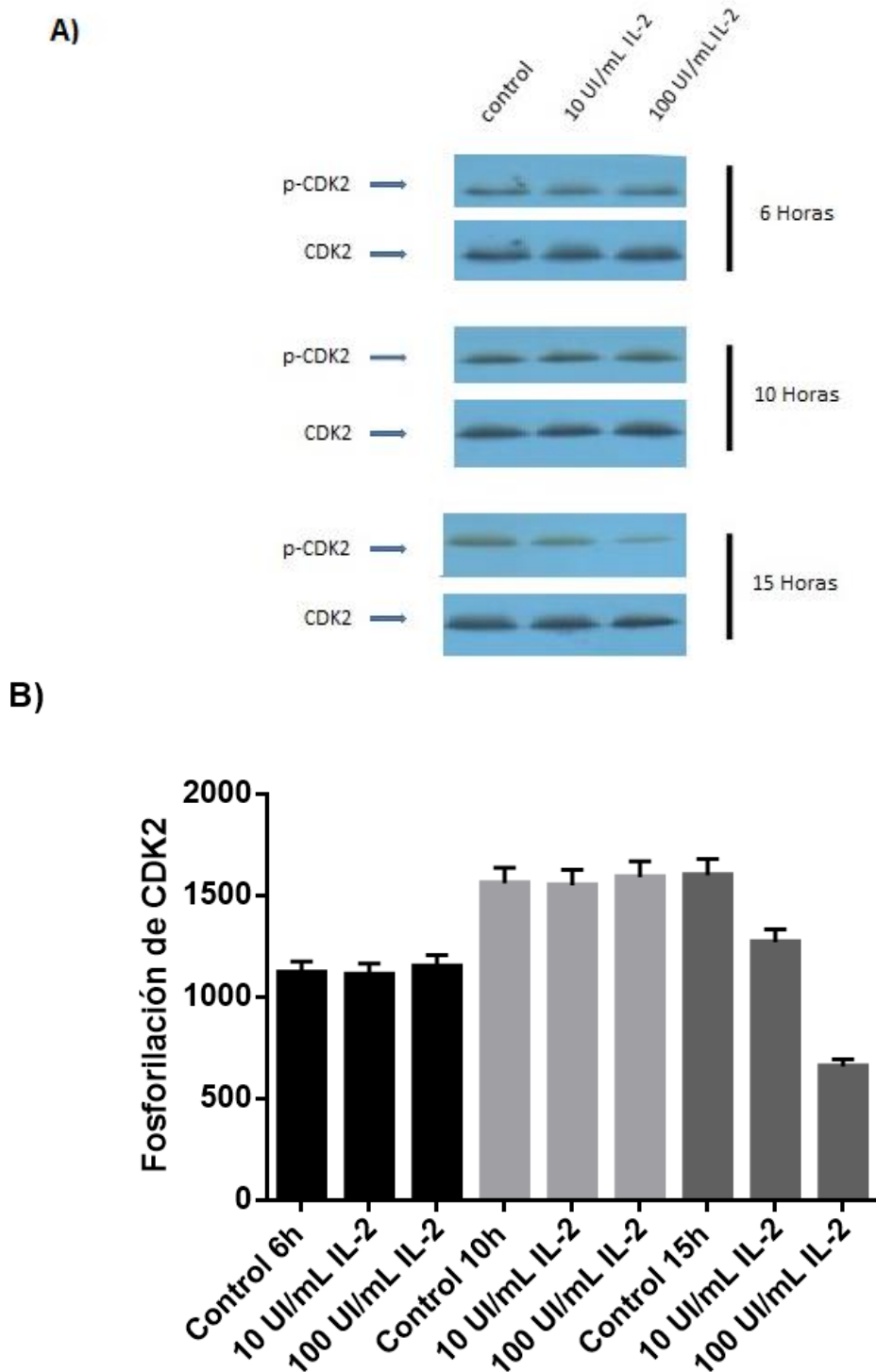


Figura 14. Fosforilación de CDK2 en INBL. **A)** Inmunoblot representativo de tres ensayos independientes, p-CDK2: CDK2 fosforilada en Thr160 (activa). CDK2: Proteína CDK2 total. **B)** Gráfica de los datos obtenidos mediante densitometría aplicada al inmunoblot.

Discusión

En los países en desarrollo la mayor importancia del cáncer de cérvix se debe a las altas tasas de mortalidad reportadas, las cuales están relacionadas con el diagnóstico tardío en etapas avanzadas de la enfermedad. La tasa de mortalidad en México disminuyó aproximadamente 2.5% por año en la década de los noventa y aproximadamente 5% por año en la última década, lo cual todavía se considera excesivamente alto. En relación con la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), institución de salud que atiende a cerca de la mitad de la población en México, se reporta que la tendencia de la mortalidad continúa disminuyendo [121].

Sin embargo, es necesario explorar nuevas estrategias y alternativas para el tratamiento del cáncer de cérvix. En la actualidad, procedimientos como la criocirugía y electrocirugía acompañadas de radioterapia y/o quimioterapia, representan un alto grado de invasividad y toxicidad ya que no solo actúan contra las células malignas, por lo que causan efectos secundarios severos en las pacientes. Por esta razón, se continúan investigando diferentes blancos moleculares en el cáncer de cérvix [122, 123]. Con el fin de contribuir a un mejor entendimiento del cáncer de cérvix y de una posible opción para su tratamiento, este trabajo se enfocó en estudiar un posible blanco terapéutico, la proteína CDK2, analizando su expresión y activación en respuesta a 10 y 100 UI/mL de IL-2, citocina que ha sido utilizada para combatir otros tipos de cáncer.

Ya que nuestro grupo de trabajo ha observado que con 10 UI/mL de IL-2 aumenta la proliferación celular en líneas de cáncer de cérvix y con 100 UI/mL de IL-2 disminuye [90], esperábamos que la expresión de *CDK2* se comportara de la misma manera, es decir, que su expresión aumentara bajo un tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 y disminuyera con 100 UI/mL de IL-2, pues es necesario un aumento en los niveles de CDK2 para poder superar el punto de control de la fase G1 a la fase S del ciclo celular [109]. Sin embargo, nuestros resultados muestran que tanto en la línea celular HeLa como INBL después de ser tratadas con 10 UI/mL de IL-2 durante 24 horas, la expresión de *CDK2* disminuyó con respecto al control 30.93% y 30.8% respectivamente, mientras que el tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 generó un aumento en la expresión de *CDK2* de 21.54% en la línea HeLa y de 4.8% en la línea INBL, es decir, totalmente contrario a lo esperado. De manera interesante, después de 48 horas de incubación ya sea con 10 o 100 UI/mL de IL-2, la expresión de *CDK2* aumentó con respecto al control para después comenzar a disminuir cuando retiramos la IL-2 y cultivamos las células durante 24 horas más.

Estos datos sugieren que la IL-2 puede inducir cambios en la expresión de *CDK2* que no necesariamente coinciden con el papel principal o canónico que se conoce, el cual consiste en la regulación de la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Diversos estudios han mostrado que el ARN mensajero de *CDK2* puede ser regulado por micro-ARN y así participar en otros procesos celulares como inhibición de la proliferación en el caso del miR-5582-5p en células de cáncer colorectal, miR--302b en cáncer gástrico, miR-223 en

carcinoma pulmonar de Lewis, o bien en el caso de cáncer de cérvix en donde *CDK2* puede ser regulado negativamente a nivel post transcripcional por el miR-372, lo que inhibe la progresión del ciclo celular en células HeLa [124-127]. También, es posible que la IL-2 exógena sea necesaria para el aumento en la expresión de *CDK2* y al no estar presente comienza la disminución de dicha expresión.

Una vez que observamos cambios en la expresión del gen *CDK2* en respuesta al tratamiento con IL-2, decidimos explorar el comportamiento de *CDK2* a nivel de proteína para determinar si se comportaba de la misma manera que en la expresión del RNA mensajero. Además, evaluamos la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular para contribuir a dilucidar el papel de la proteína *CDK2* en la detención del ciclo celular en líneas de cáncer de cérvix cuando son tratadas con IL-2, fenómeno que se ha observado por nuestro equipo de trabajo [90, 128, 129]. De manera similar, se ha reportado que en células de cáncer de ovario cultivadas en ausencia de suero, se detiene la proliferación y se atribuye a la disminución en los niveles de la proteína *CDK2* [130]. Uno de los obstáculos que nos encontramos fue determinar en qué momento del ciclo celular ocurría dicha transición. Por tanto, llevamos a cabo un análisis del ciclo celular en ambas líneas celulares durante 30 horas. De acuerdo a nuestros resultados, la transición G1-S en la línea celular HeLa ocurre aproximadamente a las 7 horas de cultivo, mientras que para la línea celular INBL es alrededor de las 10 horas de cultivo.

Una vez establecidos esos tiempos procedimos a evaluar la activación de *CDK2* mediante la detección de la fosforilación en treonina 160. En la línea celular HeLa encontramos un mayor nivel de *CDK2* activa después de 3 y 7 horas de incubación con IL-2, ya sea con 10 o 100 UI/mL. En el caso de la línea INBL no se observó algún cambio evidente en la activación de *CDK2* después de 6 y 10 horas de incubación con IL-2. También encontramos que después del mayor tiempo de incubación con IL-2 en ambas líneas celulares (12 horas en HeLa, 15 horas en INBL) el nivel de proteína *CDK2* activa comenzó a disminuir; lo cual se asemeja a lo reportado por He G. y colaboradores, en donde al someter a células de cáncer de ovario a un tratamiento que buscaba dañar su ADN para así provocar la detención del ciclo celular en la fase G1, observaron que la actividad de *CDK2* comenzaba a disminuir después de haber alcanzado su nivel máximo a las seis horas de tratamiento [131].

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo demostró que hay una disminución en la proliferación celular al tratar los cultivos de células de cáncer de cérvix con 100 UI/mL de IL-2, por lo que podríamos suponer que habría una disminución en la actividad de *CDK2*. Sorprendentemente los resultados de este trabajo muestran que tanto la expresión (en las líneas HeLa e INBL) como la activación (en la línea HeLa) de *CDK2* pueden aumentar con el mismo tratamiento de 100 UI/mL de IL-2. Nuestros datos se contraponen a los hallazgos de diversos autores, que atribuyen la disminución de la proliferación celular a la inhibición de la expresión y activación de *CDK2* para así evitar la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en células de cáncer de cérvix [132, 133].

Una posible explicación sobre la participación de CDK2 en este proceso, la ofrecen Edward Goodwin y Daniel DiMaio, quienes proponen que la detención del ciclo celular en células de cáncer de cérvix se debe a la regulación de las propias proteínas virales, específicamente VPH E2, VPH E6 y VPH E7, ya que si se llega a reducir su actividad se incrementa la actividad de p53 y en consecuencia la de p21, y por tanto se reduce la actividad de CDK2; esto a su vez se traduce en el aumento en la concentración de las proteínas de la familia Rb “restableciendo” así el control que tanto p53 como pRb ejercen sobre el ciclo celular para reprimir la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular dando como resultado la detención del mismo [134].

Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, la pieza que no encaja con este modelo propuesto es el aumento en la activación de CDK2 que observamos, lo que nos lleva a pensar que quizá CDK2 no es indispensable para la detención del ciclo celular como ya lo han propuesto otros investigadores [135-137]. O bien, que CDK2 puede actuar de manera diferencial dependiendo del contexto en el que se encuentre, de manera similar a lo que reportaron Hwang y colaboradores en donde la inducción de senescencia celular en células normales y la proliferación celular de la línea HeLa que evidenciaron tras un tratamiento de peróxido de hidrógeno lo adjudican al papel que juega CDK2 en dichos procesos [138]. En nuestro caso, ese contexto sería proporcionado por la concentración de IL-2 exógena administrada.

Una de las propiedades de CDK2 es que puede participar no solo en el control del ciclo celular de manera directa sino también como parte integral de otras vías, como en la respuesta por daño al ADN mediante la activación de ATM/ATR llevando a la consecuente detención del ciclo celular [139-142]. En ese sentido, sería interesante explorar si el tratamiento con IL-2 es capaz de provocar daño al ADN en células de cáncer de cérvix, de la misma manera que se ha reportado para interleucina 6 en células de cáncer de hígado, y así analizar qué papel juega CDK2 en la activación de la respuesta por daño al ADN y en la detención del ciclo celular en dicho contexto [143].

También se ha reportado que CDK2 participa de diferentes maneras en el proceso de muerte celular por apoptosis; se han propuesto algunas proteínas que parecen estar vinculadas a la actividad de CDK2 y con ello desencadenan el proceso de apoptosis, como en el caso de la cinasa Akt que puede fosforilar a CDK2 en Thr39 y así provocar su salida del núcleo hacia el citoplasma con ayuda de la proteína 14-3-3, lo que resulta en el aumento en los niveles de apoptosis [144]. Además, existen evidencias de que al inhibir CDK2 en células HeLa los niveles tanto de citocromo C en citoplasma como de caspasa-3 activa disminuyen, incluso cuando se les aplica un tratamiento con el fármaco quimioterapéutico paclitaxol [145]. La caspasa-3 activa puede activar a cdc25A, la cual es una proteína activadora de CDK2; por otro lado, puede inhibir la actividad de p21, p27 y Wee1, todos ellos inhibidores de la actividad de CDK2, así como escindir a ciclina E con lo que evita su unión a CDK2 y al mismo tiempo induce la disponibilidad de Bax [146]. Todo lo anterior apunta a que a mayor actividad de CDK2 mayor puede ser el nivel de muerte celular por apoptosis, por

lo que es importante analizar el papel de CDK2 en la apoptosis de células de cáncer de cérvix cuando son tratadas con IL-2. En ese sentido, nuestro grupo de trabajo publicó recientemente un artículo en donde no se observó un cambio significativo en los niveles de apoptosis en células HeLa e INBL al incubarlas con 100 UI/mL de IL-2, por el contrario, se propone que la IL-2 podría estar protegiendo a las células de cáncer de cérvix cuando son tratadas con cisplatino. Si consideramos trabajos como el de Megyesi y colaboradores en el cual muestran que el incremento en la actividad de CDK2 está asociado a muerte celular inducida por cisplatino, ya que después de la exposición a este fármaco CDK2 puede fosforilar a Bcl-xL convirtiéndola así en una proteína pro-apoptótica; entonces podríamos proponer que la IL-2 efectivamente está protegiendo a las células de cáncer de cérvix de la muerte celular interfiriendo quizá con la actividad de CDK2 [125, 147].

El objetivo de este estudio, así como el de Sun Y. y colaboradores, trata de arrojar luz sobre el posible uso terapéutico de IL-2 [148], sin embargo, si se pretende utilizar IL-2 como parte de un posible tratamiento para combatir el cáncer en general y el cáncer de cérvix en particular, es necesario continuar con la investigación sobre los efectos que esta interleucina puede generar en proteínas tan importantes para diversos mecanismos celulares como CDK2.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran que tanto la expresión (en las líneas HeLa e INBL) como la activación (en la línea HeLa) de CDK2 pueden aumentar con el mismo tratamiento de 100 UI/mL de IL-2. Mientras que la expresión de CDK2 disminuye con el tratamiento de 10 UI/mL de IL-2 (en las líneas HeLa e INBL). Un comportamiento totalmente opuesto a lo esperado de acuerdo a nuestra hipótesis.

Proyecciones futuras

- Analizar el efecto de IL-2 sobre proteínas clave en la progresión del ciclo celular como ciclina E, ciclina A, CDK1 y sus respectivos inhibidores.
- Determinar si la IL-2 puede desencadenar algún daño al ADN en células de cáncer de cérvix.
- Dilucidar si CDK2 es responsable de la activación en la respuesta por daño al ADN en células de cáncer de cérvix.

Referencias

- [1] Raya Pérez JC. (2006). Las bases moleculares del cáncer. *Acta Universitaria*; 16(1):40-49.
- [2] Hajjawi OS. (2015). Ribonucleic acid (RNA) biosynthesis in human cáncer. *Cancer Cell Int*; 15:22. Doi: 10.1186/s12935-015-0167-3
- [3] <https://www.who.int/cancer/es/> (Consultado el 6 de febrero 2019).
- [4] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2010). *Biología molecular de la célula*. 5ª edición. Ediciones Omega. España. Páginas consultadas: 1205-1211.
- [5] Hanahan D & Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*; 100(1):57-70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [6] Hanahan D & Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [7] Sonnenschein C & Soto AM. (2013). The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J Biosci*; 38(3):651-63. doi: 10.1007/s12038-013-9335-6
- [8] Baker SG. (2014). A cancer theory kerfuffle can lead to new lines of research. *J Natl Cancer Inst*; 107(2): dju405. doi: 10.1093/jnci/dju405.
- [9] <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Consultado el 18 de febrero 2019).
- [10] https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292:cancer-program&Itemid=3904&lang=es (Consultado el 18 de febrero 2019).
- [11] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*; 65(2):87-108. doi: 10.3322/caac.21262.
- [12] Reynoso-Noverón N, Torres-Domínguez JA. (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*; 8(1): 9-15.
- [13] <https://gco.iarc.fr/today/home> (Consultado el 4 de marzo 2019).
- [14] <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf> (Consultado el 4 de marzo 2019).
- [15] Roura E, Castellsague X, Pawlita M, et al. (2014). Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*; 135:453–66. doi: 10.1002/ijc.28666.

- [16] Bond S. (2014). Large prospective study finds no association between oral contraceptive use and breast cancer but increased risk for cervical cancer. *J Midwifery Womens Health*; 59:218–9. doi: 10.1111/jmwh.12179_3
- [17] Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsagué X, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, Franceschi S, Muñoz N, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2009). Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer*; 100(7):1191-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6604974.
- [18] Gonzalez D, Suarez EL, Ortiz AP. (2015). Cervical cancer screening and sexual risky behaviors among a population of hispanic origin. *Womens Health Issues*; 25:254–61. doi: 10.1016/j.whi.2015.01.002.
- [19] Nott JP, Bonney EA, Pickering JD, Simpson N. (2016). The structure and function of the cervix during pregnancy. *Translational Research in Anatomy*; 2:1-7. doi: 10.1016/j.tria.2016.02.001.
- [20] Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Münger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. (2012). A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109(26):10516-21. doi: 10.1073/pnas.1202684109
- [21] Doorbar J, Griffin H. (2019). Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. *Papillomavirus Res*; 7:176-179. doi: 10.1016/j.pvr.2019.04.005.
- [22] Wang X, Huang X, Zhang Y. (2018). Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol*; 9:2896. doi: 10.3389/fmicb.2018.02896
- [23] Syrjänen KJ. (2017). Two Landmark Studies Published in 1976/1977 Paved the Way for the Recognition of Human Papillomavirus as the Major Cause of the Global Cancer Burden. *Acta Cytol*; 61(4-5):316-337. doi: 10.1159/000477372.
- [24] Walker PG, Colley NV, Grubb C, Tejerina A, Oriel JD. (1983). Abnormalities of the uterine cervix in women with vulval warts. A preliminary communication. *Br J Vener Dis*; 59(2):120-3. doi: 10.1136/sti.59.2.120.
- [25] Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 80(2):560-3. doi: 10.1073/pnas.80.2.560.
- [26] Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*; 3(5):1151-7.
- [27] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*; 100(Pt B):1-441.

- [28] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*; 348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641
- [29] Organización Panamericana de la Salud. 2016. Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales. 2 ed. Washington, DC: OPS.
- [30] Nazzari N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F, Bronda M. (2006). Lesiones preinvasoras de cuello uterino: una visión actual. *Rev Chil Obstet Ginecol*; 71(5):341-348. doi: 10.4067/S0717-75262006000500009
- [31] Serrano B, Alemany L, Ruiz PA, Tous S, Lima MA, Bruni L, Jain A, Clifford GM, Qiao YL, Weiss T, Bosch FX, de Sanjosé S. (2014). Potential impact of a 9-valent HPV vaccine in HPV-related cervical disease in 4 emerging countries (Brazil, Mexico, India and China). *Cancer Epidemiol*; 38(6):748-56. doi: 10.1016/j.canep.2014.09.003.
- [32] Tommasino M. (2014). The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*; 26:13-21. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.11.002.
- [33] Harden ME, Munger K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*; 772:3-12. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.07.002.
- [34] Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Garibay-Cerdenares OL, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguir B. (2019). Cervical cancer stem cell-associated genes: Prognostic implications in cervical cancer. *Oncol Lett*; 18(1):7-14. doi: 10.3892/ol.2019.10307.
- [35] Boda D, Docea AO, Calina D, Ilie MA, Caruntu C, Zurac S, Neagu M, Constantin C, Branisteanu DE, Voiculescu V, Mamoulakis C, Tzanakakis G, Spandidos DA, Drakoulis N, Tsatsakis AM. (2018). Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). *Int J Oncol*; 52(3):637-655. doi: 10.3892/ijo.2018.4256.
- [36] Jin XW, Sikon A, Yen-Lieberman B. (2011). Cervical cancer screening: Less testing, smarter testing. *Cleve Clin J Med*; 78(11):737-47. doi: 10.3949/ccjm.78a.11033.
- [37] Piersma SJ. (2011). Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients. *Cancer Microenviron*. 2011 Dec; 4(3):361-75. doi: 10.1007/s12307-011-0066-7.
- [38] Horvath CA, Boulet GA, Renoux VM, Delvenne PO, Bogers JP. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology*; 7:11. doi: 10.1186/1743-422X-7-11.
- [39] Sapp M, Day PM. (2009). Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology*; 384(2):400-9. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.022.

- [40] Letian T, Tianyu Z. (2010). Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Viol J*; 7:2. doi: 10.1186/1743-422X-7-2.
- [41] Sapp M, Bienkowska-Haba M. (2009). Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J*; 276(24):7206-16. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x.
- [42] Gheit T. (2019). Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol*; 9:355. doi: 10.3389/fonc.2019.00355.
- [43] Aksoy P, Gottschalk EY, Meneses PI. (2017). HPV entry into cells. *Mutat Res Rev Mutat Res*; 772:13-22. doi: 10.1016/j.mrrev.2016.09.004.
- [44] Ozbun MA. (2019). Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial wounding to cell signaling involved in virus entry. *Papillomavirus Res*; 7:188-192. doi: 10.1016/j.pvr.2019.04.009.
- [45] Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. (2012). Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog*; 8(2):e1002519. doi: 10.1371/journal.ppat.1002519.
- [46] Scheffer KD, Berditchevski F, Florin L. (2014). The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses*; 6(2):893-908. doi: 10.3390/v6020893.
- [47] Mikuličić S, Finke J, Boukhallouk F, Wüstenhagen E, Sons D, Homsy Y, Reiss K, Lang T, Florin L. (2019). ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic human papillomavirus entry platform assembly. *Elife*; 8. pii: e44345. doi: 10.7554/eLife.44345.
- [48] Mikuličić S, Florin L. (2019). The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses. *Papillomavirus Res*; 7:135-137. doi: 10.1016/j.pvr.2019.03.004.
- [49] Gräßel L, Fast LA, Scheffer KD, Boukhallouk F, Spoden GA, Tenzer S, Boller K, Bago R, Rajesh S, Overduin M, Berditchevski F, Florin L. (2016). The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. *Sci Rep*; 6:32337. doi: 10.1038/srep32337.
- [50] Campos SK. (2017). Subcellular Trafficking of the Papillomavirus Genome during Initial Infection: The Remarkable Abilities of Minor Capsid Protein L2. *Viruses*; 9(12). pii: E370. doi: 10.3390/v9120370.
- [51] Siddiq A, Broniarczyk J, Banks L. (2018). Papillomaviruses and Endocytic Trafficking. *Int J Mol Sci*; 19(9). pii: E2619. doi: 10.3390/ijms19092619.
- [52] Jo H, Kim JW. (2005). Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Therapy*; 3(2): 419-434.
- [53] McBride AA. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*; 445(1-2):57-79. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.006.

- [54] Graham SV. (2016). Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *J Virol*; 90(19):8384-8. doi: 10.1128/JVI.00502-16.
- [55] Bergvall M, Melendy T, Archambault J. (2013). The E1 proteins. *Virology*; 445(1-2):35-56. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.020.
- [56] Suarez I, Trave G. (2018). Structural Insights in Multifunctional Papillomavirus Oncoproteins. *Viruses*; 10(1). pii: E37. doi: 10.3390/v10010037.
- [57] Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*; 445(1-2):115-37. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.
- [58] Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, Buonaguro L, Buonaguro FM. (2018). Human Oncoviruses and p53 Tumor Suppressor Pathway Deregulation at the Origin of Human Cancers. *Cancers (Basel)*; 10(7). pii: E213. doi: 10.3390/cancers10070213.
- [59] Roman A, Munger K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*; 445(1-2):138-68. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.013.
- [60] Van Doorslaer K, Burk RD. (2010). Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res*; 77:41-62. doi: 10.1016/B978-0-12-385034-8.00002-8.
- [61] Buitrago-Pérez A, Garaulet G, Vázquez-Carballo A, Paramio JM, García-Escudero R. (2009). Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Curr Genomics*; 10(1):26-34. doi: 10.2174/138920209787581235.
- [62] Graham SV. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond)*; 131(17):2201-2221. doi: 10.1042/CS20160786.
- [63] Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*; 10:140. doi: 10.1186/1476-4598-10-140.
- [64] Moody CA, Laimins LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*; 10(8):550-60. doi: 10.1038/nrc2886.
- [65] Manzo-Merino J, Contreras-Paredes A, Vázquez-Ulloa E, Rocha-Zavaleta L, Fuentes-Gonzalez AM, Lizano M. (2014). The role of signaling pathways in cervical cancer and molecular therapeutic targets. *Arch Med Res*; 45(7):525-39. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.10.008.
- [66] Bello JO, Nieva LO, Paredes AC, Gonzalez AM, Zavaleta LR, Lizano M. (2015). Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. *Viruses*; 7(8):4734-55. doi: 10.3390/v7082842.

- [67] Senapati R, Senapati NN, Dwibedi B. (2016). Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agent Cancer*; 11:59. doi: 10.1186/s13027-016-0107-4
- [68] Gao G, Smith DI. (2016). Role of the Common Fragile Sites in Cancers with a Human Papillomavirus Etiology. *Cytogenet Genome Res*; 150(3-4):217-226. doi: 10.1159/000455287.
- [69] del Toro-Arreola S, García-Chagollán M, Jave-Suárez LF. (2015). Mecanismos de escape a la respuesta inmune innata en cáncer cervicouterino asociado a VPH. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 53 Suppl 2:S194-9.
- [70] Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. (2007). Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*; 7(1):79-89. doi: 10.2174/156800907780006869
- [71] Yang X, Cheng Y, Li C. (2017). The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. *Signal Transduct Target Ther*; 2:17055. doi: 10.1038/sigtrans.2017.55.
- [72] Murphy K, Travers P, Walport M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. 7ª edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México. Páginas consultadas: 344-346.
- [73] Mindiola R, Caulejas D, Núñez-Troconis J, Araujo M, Delgado M, Mosquera J. (2008). Increased number of IL-2, IL-2 receptor and IL-10 positive cells in premalignant lesions of the cervix. *Invest Clin*; 49(4):533-45.
- [74] Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, Weiss-Steider B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*; 50(3):273-7. doi: 10.1016/j.cyto.2010.02.013.
- [75] Oppenheim JJ. (2007). IL-2: more than a T cell growth factor. *J Immunol*; 179(3):1413-4. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1413.
- [76] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. (2013). Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*; 38(1):13-25. doi: 10.1016/j.immuni.2013.01.004.
- [77] Jiang T, Zhou C, Ren S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*; 5(6):e1163462. doi: 10.1080/2162402X.2016.1163462.
- [78] Malek TR, Castro I. (2010). Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity*; 33(2):153-65. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.
- [79] Ross SH, Cantrell DA. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*; 36:411-433. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053352.
- [80] Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I. (2005). Vía JAK-STAT: Una visión general. *Vertientes*; 8(1-2):14-25, 2005.

- [81] Doersch KM, DelloStritto DJ, Newell-Rogers MK. (2017). The contribution of interleukin-2 to effective wound healing. *Exp Biol Med (Maywood)*; 242(4):384-396. doi: 10.1177/1535370216675773.
- [82] Rosenberg SA. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*; 192(12):5451-8. doi: 10.4049/jimmunol.1490019.
- [83] Dutcher JP, Schwartzentruber DJ, Kaufman HL, Agarwala SS, Tarhini AA, Lowder JN, Atkins MB. (2014). High dose interleukin-2 (Aldesleukin) - expert consensus on best management practices-2014. *J Immunother Cancer*; 2(1):26. doi: 10.1186/s40425-014-0026-0
- [84] Choudhry H, Helmi N, Abdulaal WH, Zeyadi M, Zamzami MA, Wu W, Mahmoud MM, Warsi MK, Rasool M, Jamal MS. (2018). Prospects of IL-2 in Cancer Immunotherapy. *Biomed Res Int*; 2018:9056173. doi: 10.1155/2018/9056173.
- [85] Ridolfi L, de Rosa F, Ridolfi R, Gentili G, Valmorri L, Scarpi E, Parisi E, Romeo A, Guidoboni M. (2014). Radiotherapy as an immunological booster in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma treated with high-dose Interleukin-2: evaluation of biomarkers of immunologic and therapeutic response. *J Transl Med*; 12:262. doi: 10.1186/s12967-014-0262-6.
- [86] Carmenate T, Pacios A, Enamorado M, Moreno E, Garcia-Martínez K, Fuente D, León K. (2013). Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. *J Immunol*; 190(12):6230-8. doi: 10.4049/jimmunol.1201895.
- [87] Dhupkar P, Gordon N. (2017). Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. *Adv Exp Med Biol*; 995:33-51. doi: 10.1007/978-3-319-53156-4_2.
- [88] Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Cacéres-Cortés JR, Alvarado-Moreno JA, Valle-Mendiola A, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, Rangel-Corona R. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cell Signal*; 16(11):1239-47. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.03.011.
- [89] Rangel-Corona R, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, Weiss-Steider B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*; 50(3):273-7. doi: 10.1016/j.cyto.2010.02.013.
- [90] Valle-Mendiola A, Weiss-Steider B, Rocha-Zavaleta L, Soto-Cruz I. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Invest*; 32(4):115-25. doi: 10.3109/07357907.2014.883526.
- [91] Valle-Mendiola A, Gutiérrez-Hoya A, Lagunas-Cruz Mdel C, Weiss-Steider B, Soto-Cruz I. (2016). Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer. *Mediators Inflamm*; 2016:2849523. doi: 10.1155/2016/2849523.

- [92] Schafer KA. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol*; 35(6):461-78. doi: 10.1177/030098589803500601.
- [93] Israels ED, Israels LG. (2001). The cell cycle. *Stem Cells*; 19(1):88-91. doi: 10.1634/stemcells.19-1-88.
- [94] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*; 36(3):131-49. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.
- [95] Malumbres M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*; 15(6):122. doi: 10.1186/gb4184
- [96] Fisher RP. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci*; 118(Pt 22):5171-80. doi: 10.1242/jcs.02718.
- [97] Park MH, Kim SY, Kim YJ, Chung YH. (2014). ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochem Biophys Res Commun*; 450(1):129-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.070.
- [98] Grant GD, Cook JG. (2017). The Temporal Regulation of S Phase Proteins During G1. *Adv Exp Med Biol*; 1042:335-369. doi: 10.1007/978-981-10-6955-0_16.
- [99] Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 14(8):518-28. doi: 10.1038/nrm3629.
- [100] Nigg EA, Blangy A, Lane HA. (1996). Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res*; 229(2):174-80. doi: 10.1006/excr.1996.0356.
- [101] Santo L, Siu KT, Raje N. (2015). Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers. *Semin Oncol*; 42(6):788-800. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.024.
- [102] Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*; 14(2):159-69. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.013.
- [103] Lim S, Kaldis P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*; 140(15):3079-93. doi: 10.1242/dev.091744.
- [104] Abraham RT. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*; 15(17):2177-96. doi: 10.1101/gad.914401.
- [105] Weber AM, Ryan AJ. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther*; 149:124-38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.001.
- [106] Pietenpol JA, Stewart ZA. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*; 181-182:475-81. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00460-2

- [107] Valle-Mendiola A, Weiss-Steider B. (2003). Origen molecular del cáncer. *Vertientes*; 6(1):3-8.
- [108] Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris MC. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers (Basel)*; 7(1):179-237. doi: 10.3390/cancers7010179.
- [109] Chohan TA, Qian H, Pan Y, Chen JZ. (2015). Cyclin-Dependent Kinase-2 as a Target for Cancer Therapy: Progress in the Development of CDK2 Inhibitors as Anti-Cancer Agents. *Curr Med Chem*; 22(2):237-63. doi: 10.2174/0929867321666141106113633.
- [110] Bártová I, Koca J, Otyepka M. (2008). Functional flexibility of human cyclin-dependent kinase-2 and its evolutionary conservation. *Protein Sci*; 17(1):22-33. doi: 10.1110/ps.072951208.
- [111] De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*; 363(6430):595-602. doi: 10.1038/363595a0.
- [112] Li Y, Zhang J, Gao W, Zhang L, Pan Y, Zhang S, Wang Y. (2015). Insights on Structural Characteristics and Ligand Binding Mechanisms of CDK2. *Int J Mol Sci*; 16(5):9314-40. doi: 10.3390/ijms16059314.
- [113] Brown NR, Noble ME, Lawrie AM, Morris MC, Tunnah P, Divita G, Johnson LN, Endicott JA. (1999). Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity. *J Biol Chem*; 274(13):8746-56. doi: 10.1074/jbc.274.13.8746.
- [114] Lolli G, Johnson LN. (2007). Recognition of Cdk2 by Cdk7. *Proteins*; 67(4):1048-59. doi: 10.1002/prot.21370.
- [115] Tetsu O, McCormick F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell*; 3(3):233-45. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00053-9
- [116] McCurdy SR, Pacal M, Ahmad M, Bremner R. (2017). A CDK2 activity signature predicts outcome in CDK2-low cancers. *Oncogene*; 36(18):2491-2502. doi: 10.1038/onc.2016.409.
- [117] Kim YT, Zhao M. (2005). Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*; 46(5):597-613. doi: 10.3349/ymj.2005.46.5.597.
- [118] Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. (2009). Molecular Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. *Public Health Genomics*; 12(5-6):268-80. doi: 10.1159/000214918.
- [119] Wu K, Yi Y, Liu F, Wu W, Chen Y, Zhang W. (2018). Identification of key pathways and genes in the progression of cervical cancer using bioinformatics analysis. *Oncol Lett*; 16(1):1003-1009. doi: 10.3892/ol.2018.8768.
- [120] van Dam PA, van Dam PJ, Rolfo C, Giallombardo M, van Berckelaer C, Trinh XB, Altintas S, Huizing M, Papadimitriou K, Tjalma WA, van Laere S.

(2016). In silico pathway analysis in cervical carcinoma reveals potential new targets for treatment. *Oncotarget*; 7(3):2780-95. doi: 10.18632/oncotarget.6667.

[121] Hernández-Hernández DM, Apresa-García T, Patlán-Pérez RM. (2015). Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*; 53 (Supl 2):S154-61.

[122] Coronel-Martínez J, Rivera-Rubí LM, Azuara-Forcelledo H, Floriano-Sánchez E. (2014). Tratamiento en cáncer cervicouterino localmente avanzado. *GAMO*; 13(Supl 4):67-70.

[123] Cetina-Pérez L., Enríquez-Aceves MI, Gómez-García EM, Martínez-Cedillo J. (2014). Terapias blanco en cáncer cervicouterino. *GAMO*; 13(Supl 4):83-90.

[124] An HJ, Kwak SY, Yoo JO, Kim JS, Bae IH, Park MJ, Cho MY, Kim J, Han YH. (2016). Novel miR-5582-5p functions as a tumor suppressor by inducing apoptosis and cell cycle arrest in cancer cells through direct targeting of GAB1, SHC1, and CDK2. *Biochim Biophys Acta*; 1862(10):1926-37. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.017.

[125] Liu FY, Wang LP, Wang Q, Han P, Zhuang WP, Li MJ, Yuan H. (2016). miR-302b regulates cell cycles by targeting CDK2 via ERK signaling pathway in gastric cancer. *Cancer Med*; 5(9):2302-13. doi: 10.1002/cam4.818.

[126] Nian W, Ao X, Wu Y, Huang Y, Shao J, Wang Y, Chen Z, Chen F, Wang D. (2013). miR-223 functions as a potent tumor suppressor of the Lewis lung carcinoma cell line by targeting insulin-like growth factor-1 receptor and cyclin-dependent kinase 2. *Oncol Lett*; 6(2):359-366. doi: 10.3892/ol.2013.1375.

[127] Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. (2011). MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem*; 286(29):25556-63. doi: 10.1074/jbc.M111.221564.

[128] Lagunas-Cruz M del C. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias Biológicas. 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. México, CDMX. 2014.

[129] Lagunas-Cruz MDC, Valle-Mendiola A, Trejo-Huerta J, Rocha-Zavaleta L, Mora-García ML, Gutiérrez-Hoya A, Weiss-Steider B, Soto-Cruz I. (2019). IL-2 Induces Transient Arrest in the G1 Phase to Protect Cervical Cancer Cells from Entering Apoptosis. *J Oncol*; 2019:7475295. doi: 10.1155/2019/7475295.

[130] Shin JS, Hong SW, Lee SL, Kim TH, Park IC, An SK, Lee WK, Lim JS, Kim KI, Yang Y, Lee SS, Jin DH, Lee MS. (2008). Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *Int J Oncol*; 32(2):435-9. doi: 10.3892/ijo.32.2.435.

[131] He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR, Kuang J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both

Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*; 24(18):2929-43. doi: 10.1038/sj.onc.1208474.

[132] Long XE, Gong ZH, Pan L, Zhong ZW, Le YP, Liu Q, Guo JM, Zhong JC. (2010). Suppression of CDK2 expression by siRNA induces cell cycle arrest and cell proliferation inhibition in human cancer cells. *BMB Rep*; 43(4):291-6. doi: 10.5483/bmbrep.2010.43.4.291.

[133] Liu Q, Liu X, Gao J, Shi X, Hu X, Wang S, Luo Y. (2013). Overexpression of DOC-1R inhibits cell cycle G1/S transition by repressing CDK2 expression and activation. *Int J Biol Sci*; 9(6):541-9. doi: 10.7150/ijbs.5763.

[134] Goodwin EC, DiMaio D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(23):12513-8. doi: 10.1073/pnas.97.23.12513.

[135] Tetsu O, McCormick F. (2003). Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer Cell*; 3(3):233-45. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00053-9.

[136] Martín A, Odajima J, Hunt SL, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell*; 7(6):591-8. doi: 10.1016/j.ccr.2005.05.006.

[137] Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*; 448(7155):811-5. doi: 10.1038/nature06046.

[138] Hwang CY, Lee SM, Park SS, Kwon KS. (2014). CDK2 differentially controls normal cell senescence and cancer cell proliferation upon exposure to reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*; 425(1):94-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.059.

[139] Chung JH, Bunz F. (2010). Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control. *PLoS Genet*; 6(2):e1000863. doi: 10.1371/journal.pgen.1000863.

[140] Deans AJ, Khanna KK, McNees CJ, Mercurio C, Heierhorst J, McArthur GA. (2006). Cyclin-dependent kinase 2 functions in normal DNA repair and is a therapeutic target in BRCA1-deficient cancers. *Cancer Res*; 66(16):8219-26. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3945.

[141] Neganova I, Vilella F, Atkinson SP, Lloret M, Passos JF, von Zglinicki T, O'Connor JE, Burks D, Jones R, Armstrong L, Lako M. (2011). An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells*; 29(4):651-9. doi: 10.1002/stem.620.

[142] Wohlbold L, Merrick KA, De S, Amat R, Kim JH, Larochelle S, Allen JJ, Zhang C, Shokat KM, Petrini JH, Fisher RP. (2012). Chemical genetics reveals a specific requirement for Cdk2 activity in the DNA damage response and identifies

Nbs1 as a Cdk2 substrate in human cells. *PLoS Genet*; 8(8):e1002935. doi: 10.1371/journal.pgen.1002935.

[143] Zhou C, Bi F, Yuan J, Yang F, Sun S. (2018). Gain of UBE2D1 facilitates hepatocellular carcinoma progression and is associated with DNA damage caused by continuous IL-6. *J Exp Clin Cancer Res*; 37(1):290. doi: 10.1186/s13046-018-0951-8.

[144] Maddika S, Ande SR, Wiechec E, Hansen LL, Wesselborg S, Los M. (2008). Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Sci*; 121(Pt 7):979-88. doi: 10.1242/jcs.009530.

[145] Guo XX, Kim H, Li Y, Yim H, Lee SK, Jin YH. (2011). Cdk2 acts upstream of mitochondrial permeability transition during paclitaxel-induced apoptosis. *Protein Cell*; 2(7):543-53. doi: 10.1007/s13238-011-1071-9.

[146] Kurokawa M, Kornbluth S. (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell*; 138(5):838-54. doi: 10.1016/j.cell.2009.08.021.

[147] Megyesi J, Tarcsfalvi A, Seng N, Hodeify R, Price PM. (2016). Cdk2 phosphorylation of Bcl-xL after stress converts it to a pro-apoptotic protein mimicking Bax/Bak. *Cell Death Discov*; 2. pii: 15066. doi: 10.1038/cddiscovery.2015.66.

[148] Sun Y, Peng S, Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. (2017). Coinjection of IL2 DNA enhances E7-specific antitumor immunity elicited by intravaginal therapeutic HPV DNA vaccination with electroporation. *Gene Ther*; 24(7):408-415. doi: 10.1038/gt.2017.38.