



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza
Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

**Análisis del efecto de IL-2 sobre la producción de
ATP en células de cáncer de cérvix.**

T E S I S
P R E S E N T A:

MAYRA ISABEL MENDOZA ZEPEDA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Directora de Tesis: Dra. María Isabel Soto Cruz
Asesor Interno: QFB Arturo Valle Mendiola

Ciudad de México, 2022



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.

El presente trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM; bajo la dirección de la Dra. M. Isabel Soto Cruz y asesoría del Dr. Arturo Valle Mendiola, con financiamiento del proyecto CONACYT 253262

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de tesis, la Dra. Isabel Soto Cruz, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por proporcionarme los medios para mi desarrollo académico a través de la realización de este trabajo y por sus enseñanzas.

A mi asesor el Dr. Arturo Valle Mendiola, por haberme brindado su tiempo, su infinita paciencia y los conocimientos no sólo relacionados al área de investigación sino también sobre la vida en general.

A la Dra. María del Carmen Lagunas Cruz por compartir su conocimiento, consejos, apoyo y amistad.

Por último, agradezco a la UNAM por otorgarme un lugar dentro de sus instituciones, para formarme profesionalmente a través de sus profesores que además me instruyeron cómo persona y por ser la fuente de cientos de experiencias personales y académicas.

DEDICATORIA

A mis padres porque siempre me han apoyado, amado y enseñado que siempre hay que superarse a uno mismo, que cada reto es una oportunidad de crecer. Ustedes son mi inspiración.

A mis hermanos. La vida seria infinitamente diferente sin ustedes, son lo más importante para mí y siempre estaré cerca por si me necesitan.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEORICO	2
1. Cáncer.....	2
1.1 Cáncer cervicouterino (CaCu).....	3
1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)	4
2. Transducción de señales.....	6
3. Receptores.....	7
4. Citocinas	7
5. Interleucina-2 (IL-2)	8
6. Vía JAK/STAT activada por el receptor de IL-2 (IL-2R)	9
6.1 STAT5	10
7. Vía JAK/STAT activada por el receptor de IL-2 (IL-2R) en CaCu.....	11
8. Metabolismo y cáncer.....	11
8.1 El Efecto Warburg.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
CONCLUSIONES	35
PERSPECTIVAS	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
BIOGRAFÍA DE FIGURAS.....	39

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer cervicouterino se ha convertido en la segunda neoplasia más frecuente y mortal en la mujer, diagnosticándose cerca de 500,000 nuevos casos cada año. En México es la segunda causa de muerte por neoplasia desde 2006.

Con el establecimiento de modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión tumoral lo que ha dirigido su uso hacia la inmunoterapia. Un ejemplo de ello es el uso de la interleucina 2 (IL-2), un potente activador de células del sistema inmune que además estimula la liberación de varias citocinas más, como son la interferón-gama (IFN- γ), las IL-3, IL-5, IL-6, IL-10 y la TNF- α . Particularmente, el efecto adyuvante de la IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al virus del papiloma humano (VPH); además, la IL-2 también es muy importante para la activación de la vía de señalización JAK-STAT, reguladora principal en procesos de proliferación, ciclo celular, metabolismo, diferenciación celular, entre otros.

El grupo de trabajo de la Dra. Isabel Soto Cruz ha documentado que en las líneas celulares del epitelio de carcinoma cervical CALO, INBL y SiHa, se expresa el receptor para IL-2 (IL-2R) y que además este receptor es funcional. También se ha demostrado que las moléculas asociadas al IL-2R, JAK3 y STAT5 se encuentran activadas de manera constitutiva y que al estimular estas líneas celulares con 10 UI/mL de IL-2 la fosforilación de JAK3 y STAT5 aumenta, así como su proliferación; por el contrario, al estimular con 100 UI/mL, la fosforilación de estas moléculas disminuye junto con la multiplicación celular.

Es importante mencionar que la proliferación celular requiere de altas demandas, tanto bioenergética como biosintética para mantenerse, de manera que en la mayoría de los cánceres se presenta la capacidad de reprogramar el metabolismo energético haciendo uso del efecto Warburg, modificando componentes de vías como JAK/STAT; por lo que dirigir las investigaciones hacia esta característica podría otorgarnos un mejor entendimiento de la enfermedad y en el futuro ser usado en tratamientos dirigidos hacia moléculas específicas.

MARCO TEORICO

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, resultado de alteraciones en un conjunto de genes que pertenecen a dos grandes grupos: los oncogenes y los supresores de tumores, cuyos productos ejercen funciones básicas en las vías intracelulares que rigen la proliferación, la supervivencia celular y el buen funcionamiento de todas nuestras células.^{1,2}

Las células de los tumores malignos, a diferencia de las células normales, presentan principalmente las siguientes características:

- Se reproducen de manera descontrolada.
- Ignoran las señales que inhiben el crecimiento.
- Son capaces de invadir y colonizar órganos distantes a los de su origen.
- Se protegen contra el proceso de apoptosis.
- En la mayoría de los casos, presentan una fuerte dependencia a las vías metabólicas anaerobias (como la glucólisis). Esta última propiedad puede deberse a sus elevadas necesidades metabólicas y al riego sanguíneo insuficiente.²

En la mayoría de las ocasiones, las células de un tumor y sus metástasis se originan a partir de una sola célula aberrante, la cual puede aparecer a causa de un agente cancerígeno como pueden ser la radiación ionizante, la radiación ultravioleta o diversos virus de ADN y ARN, los cuales tienen la capacidad común de alterar el genoma.^{1,2}

Respecto a los virus, existen dos grandes grupos que pueden infectar y transformar las células de los mamíferos en células cancerosas: los de ADN y los de ARN de acuerdo con el tipo de ácido nucleico que se encuentre dentro de la partícula viral madura. Entre los virus de ADN capaces de infectar y transformar a las células figuran: el poliomavirus (virus de los simios 40 [SV40]); el adenovirus (virus del papiloma humano) y otros similares al del herpes. Por otro lado, los virus tumorales de ARN, o retrovirus, tienen una estructura semejante a la del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).³

1.1 Cáncer cervicouterino (CaCu)

Como es sabido, el cuello uterino se divide en dos partes: el endocérvix compuesto por células glandulares y el exocérvix compuesto por células escamosas. Se denomina adenocarcinoma si las mutaciones ocurren en las células del endocérvix y carcinoma en las células escamosas del exocérvix, siendo este último el más prevalente.⁴

El cáncer cervicouterino es un padecimiento que puede ser originado por una serie de mutaciones que ocurren en la unión escamocolumnar del epitelio del cuello uterino. Se manifiesta a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, durante las etapas de displasia leve, moderada y severa que evolucionan a cáncer *in situ* o neoplasia intraepitelial cervical, en grado variable.⁵

En México se ha reportado que el promedio de edad en que se presentan lesiones en pacientes con una neoplasia intraepitelial cervical (NIC) 1 es de 35.5 años; para aquellas con una NIC 2 es de 39.5 años; con relación a NIC 3 es de 42 años y con respecto a carcinoma invasor es de 49 años. Estos datos sugieren que el tiempo transcurrido entre la progresión de una lesión y otra es un promedio de 4 años, mientras que para llegar a un carcinoma invasor puede ser hasta de 14 años.⁶

El CaCu también es la segunda causa de muerte por cáncer en mexicanas desde 2006. Con la mortalidad más alta en el mundo, se reportan 3.7 defunciones por cada 100,000 mujeres (Figura 1).⁷

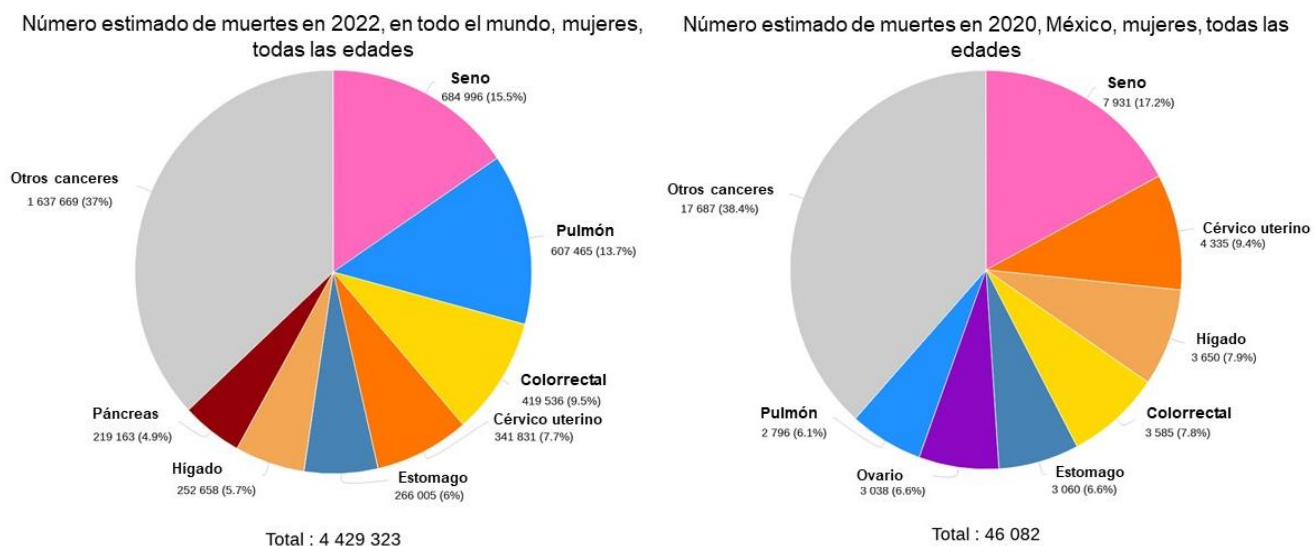


Figura 1. Muerte por cáncer en mujeres. Se muestran los tipos de cánceres con mayor incidencia de muerte en mujeres a nivel mundial y en México en 2020 según estadística de Globocan (International Agency for Research on Cancer, 2002)

1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH) se considera el agente causal más importante para el cáncer cervical; este virus cuenta con un genoma de ADN súper enrollado circular de doble cadena de 7900 pares de bases (pb) asociado con proteínas de histonas nucleosomales; es un virus no envuelto con estructura de cápside icosaédrica de 55 nm de diámetro, compuesta de 72 capsómeros^{6,8,9} conformado por tres regiones. La primera es una región reguladora o “región larga de control” (LCR, del inglés *Long Control Región*) que contiene secuencias de nucleótidos con blanco de acción hacia proteínas que controlan la transcripción y replicación del virus. La segunda región contiene los genes tempranos *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* y *E7* (E, del inglés *Early*), que son codificados en las etapas tempranas de la infección: *E1* controla la replicación del plásmido viral en colaboración con *E2*, que modula la transcripción viral; *E4* codifica las proteínas virales más abundantes, que se colocan con filamentos intermedios celulares. La proteína *E5* está asociada a la membrana citoplásmica causando la acidificación del endosoma favoreciendo la evasión inmunológica y también estimula la actividad celular mediada por el factor de crecimiento epidérmico, contribuyendo a la oncogenicidad. Por su parte, las proteínas producto de los genes *E6* y *E7* también tienen un papel central en la oncogenicidad del VPH a través de factores celulares de unión y proteínas supresoras de tumores.^{9,10,11} El gen *E6* conduce a la ubiquitinación de p53 y, en consecuencia, a su degradación, de manera que la célula no comprueba el estado de su ADN antes de la siguiente división y no es capaz de entrar en apoptosis; el gen *E7* se une principalmente a la forma activa de pRB conduciendo a la liberación de factores de transcripción, lo que promueve el progreso a la fase S del ciclo celular y por tanto a la replicación celular, de manera que la célula está en constante división e impedida para entrar en apoptosis.^{6,9} Por último, se encuentra la región de los genes *L1* y *L2* (L, del inglés *Late*) que codifican las proteínas estructurales de la cápside mayor y menor, útiles en el proceso de empaquetamiento del ADN viral en el ciclo replicativo del virus (Figura 2).^{6,8,9,10,11}

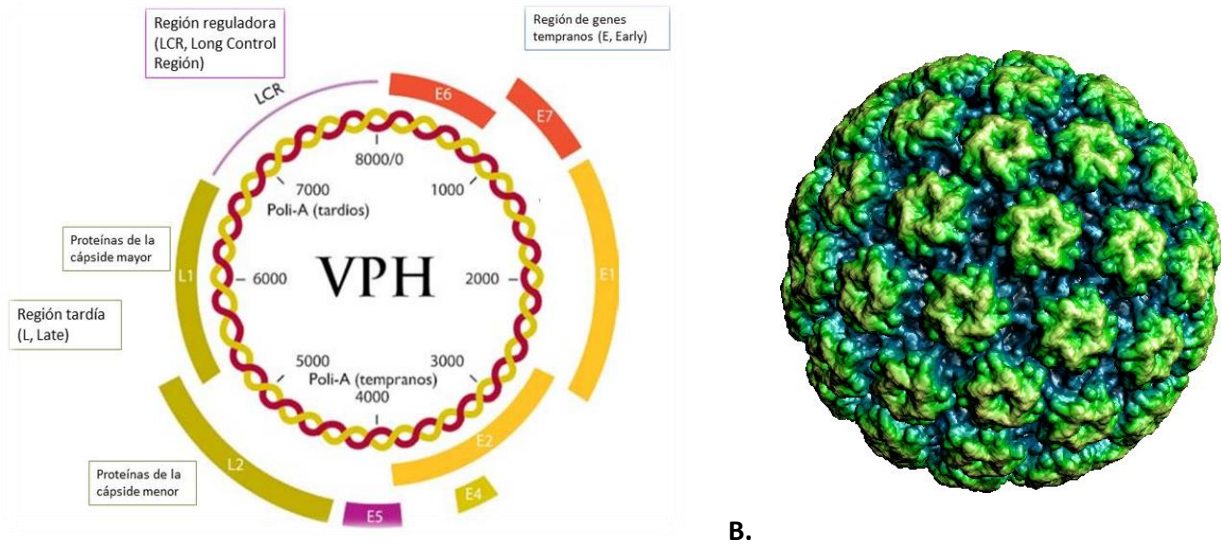


Figura 2. A. Diagrama del genoma del VPH16+ (Tomado y modificado de Prendiville, W. Davies, P. (2004))
B. Cápside de VPH16+. (Obtenido de <http://viperdbscripps.edu>.)

La infección por VPH comienza con el contacto de los viriones intactos por medio de dos proteínas de la cápside viral (L1 y L2), que median la unión celular e internalización del virus con las células inmaduras del epitelio escamoso. Después de la introducción del virus en el epitelio pueden ocurrir infecciones latentes (el ADN viral permanece en el núcleo; se mantiene en la superficie sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos identificables) e infecciones activas (intensa actividad de replicación de ADN viral en las capas intermedia y superficial del epitelio escamoso produciendo cambios celulares característicos).⁶ El VPH inicia la transcripción de sus genes en las capas basales del epitelio, las que alcanza a través de microlesiones o abrasiones del tejido. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo (Figura 3).^{6,11,12}

El VPH se divide en dos grupos: de alto o bajo riesgo determinados por su capacidad para provocar anomalías cancerígenas. Los tipos más vinculados al cáncer cervicouterino son el VPH16+ y VPH18+. El primero parece más asociado a lesiones del epitelio escamoso y se relaciona con los tipos 31, 33, 35, 52, 58, 67; a su vez, el VPH18+ es el tipo más frecuente en neoplasias glandulares y los tipos 39, 45, 59, 68 se comportan de manera similar a este.⁶

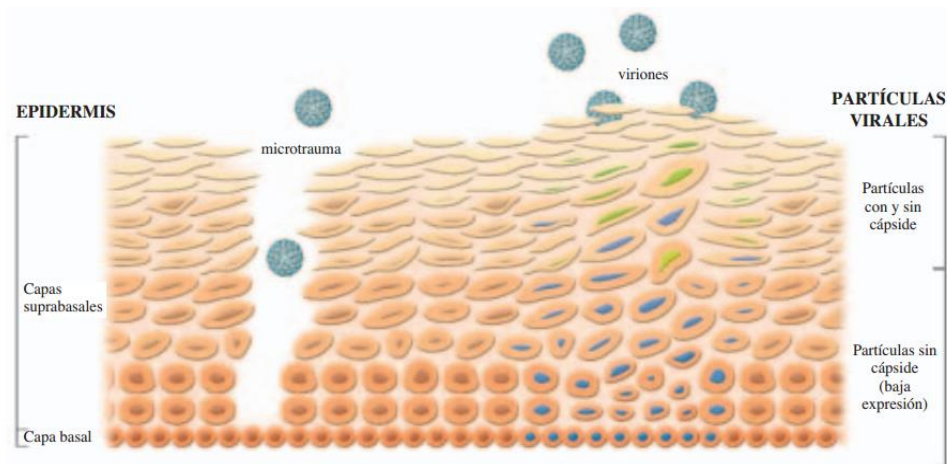


Figura 3. Ciclo de infección de VPH. Un microtrauma facilita la infección del virus en las capas basales. Después de la infección se expresan los genes de VPH tempranos y en las capas de epitelio medio y superficial se expresan los genes tardíos para encapsular los genomas virales que se liberan con la descamación de las células del epitelio escamoso. (Diestro, T. Serrano, V. y Gómez, P. (2007))

2. Transducción de señales

Un gran número de factores de crecimiento, citocinas, hormonas, y agentes químicos exógenos pueden inducir respuestas celulares que conllevan a la proliferación y/o diferenciación en células cancerígenas y normales. Estas señales son mediadas por factores de crecimiento autócrinos, parácrinos y endocrinos que activan sus receptores de superficie.¹³ El reconocimiento de la señal extracelular por su receptor es el comienzo de una serie de eventos que llevan la información desde el exterior de la célula a su interior para activar la síntesis de proteínas; esta transferencia de la información hacia el interior de la célula se conoce como transducción de señales.^{13,14}

Los componentes básicos de una vía de señalización intracelular incluyen: la señal extracelular, receptores, transductores, sensores, efectores y, finalmente, la activación de la respuesta celular para expresar un fenotipo particular y conducir a procesos de exocitosis, fagocitosis, remodelación de actina, activación de vías metabólicas y expresión génica.^{14,15,16}

Las señales que llegan a los receptores les confieren cambios covalentes y conformacionales específicos que inician sistemas de transmisión complejos formados por cascadas de moléculas de señalización intracelular. También se pueden generar segundos mensajeros para la transmisión y amplificación de mensajes; por ejemplo, en las vías de AMP cíclico, en la ruta de activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa, en las vías de MAPK, JAK/STAT y Notch, entre otras que participan en el metabolismo. La mayoría de las modificaciones covalentes son fosforilaciones, en residuos de tirosina o serina/treonina, por cinasas específicas. Algunas de estas proteínas cinasas son sustratos de otras cinasas o modulan su propia actividad por reacciones de autofosforilación.^{14,15,16}

3. Receptores

La activación de la ruta de transcripción ocurre por medio de las proteínas receptoras que están principalmente asociadas a canales iónicos, proteínas G (monoméricos y heterotriméricos), citocinas (asociados a cinasas citosólicas JAK y STAT por fosforilación), tirosina cinasa (que pueden llevar a la fosforilación de varios substratos clave por actividad intrínseca del receptor, un ejemplo de estos son los receptores para los factores de crecimiento epidérmico o plaquetario), receptores TGF β , Notch e intracelulares de hormonas esteroides, hormonas tiroideas, y para ácido retinoico.¹³ Estos detectan la señal a nivel de la membrana celular por interacción directa proteína-proteína o a través de modificaciones covalentes, cómo la fosforilación y la acetilación, para transmitirla a moléculas transductoras internas. Esta activación requiere la adecuada coordinación de sus componentes, ya que muchas moléculas de señalización extracelular interactúan con más de un tipo de receptor.^{13,14,15,16}

La gran mayoría de los receptores de las vías de señalización se activan mediante la unión de moléculas (neurotransmisores, hormonas, citocinas, factores de crecimiento, moléculas de superficie celular) secretadas o unidas a la membrana, otros son activados por cambios en la concentración de metabolitos o por estimulación física.^{14,15,16,17}

4. Citocinas

Las citocinas son importantes factores polipeptídicos producidos mayormente por células linfoides, monocíticas y hematopoyéticas que actúan cómo moléculas de señalización a muy bajas concentraciones; estas poseen una afinidad alta en la unión con su receptor específico y son reguladores centrales de la respuesta inmune y la inflamación. También conforman un grupo heterogéneo que incluye a las interleucinas (IL), los interferones (IFN), los factores de necrosis tumoral (TNF), la eritropoyetina, la hormona de crecimiento, la prolactina, entre otros.^{18,19,20}

La expresión genética celular es regulada por una variedad de citocinas, las cuales pueden incrementar o disminuir la síntesis de enzimas en una célula específica,¹⁷ uniéndose con receptores específicos generando cómo respuesta que la célula se prepare para activar genes, dividirse, diferenciarse, realizar movimiento celular, secretar sus propias citocinas o realizar apoptosis.^{4,20}

En general estas sustancias tienen acción transitoria. Además, actúan sobre diferentes tipos celulares e inducen respuestas diferentes, lo que se conoce cómo pleiotropismo; a su vez, una citocina puede actuar sinérgica o antagónicamente sobre el efecto de otra citocina.²⁰

5. Interleucina-2 (IL-2)

Es una citocina mediadora importante en la proliferación y activación de los linfocitos T; esta induce la generación de linfocitos T citotóxicos (LTC); facilita la proliferación y la síntesis de inmunoglobulinas por parte de las células plasmáticas e induce la generación y persistencia de células asesinas naturales (del inglés *natural killer*, NK). Asimismo, la IL-2 tiene un papel único en la muerte celular inducida por activación (AICD, *Activation-induced cell death*), participa en el buen funcionamiento de las células reguladoras T (T_{Reg}) $CD4^+$ $CD25^+$, y además está involucrada en la eliminación de células T autorreactivas, que tienen un papel patogénico en enfermedades autoinmunes.²¹ Su fuente principal son los linfocitos T activados. Es una glicoproteína de 15.5 kDa, cuyo gen se localiza en el cromosoma cuatro. La proteína posee tres cisteínas, dos de las cuales forman una unión disulfuro intracadena con un sitio de glicosilación sobre treonina, que están implicados con la interacción con su receptor.^{19,22}

La IL-2 es miembro de la familia de citocinas con cadena γ común con IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Para ejercer su efecto biológico, la IL-2 interacciona con su receptor específico en la superficie celular, el cual, está formado por tres subunidades denominadas en función de su peso molecular p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ). Las subunidades β y γ son de señalización y la α es moduladora de la afinidad.²⁴ Para que la IL-2 ejerza su efecto se necesita que se exprese el receptor de afinidad media compuesto por las subunidades β y γ , o el receptor de alta afinidad compuesto por las tres subunidades. Ninguna de las subunidades muestra actividad enzimática de forma individual; más bien, actúan similar a andamios para la asociación de factores de transducción como proteínas tirosina cinasas (PTK).²²

Dos de las PTK más importantes involucradas en la señalización dependientes de IL-2 son JAK1 y JAK3, cuyos sustratos primarios pertenecen a miembros de la familia STAT. Curiosamente, los sitios de unión para JAK1 Y JAK3 han sido identificados en la subunidad β indicando una participación relevante de la cadena β en la activación de la señalización de IL-2 (Figura 4).^{22,23,24}

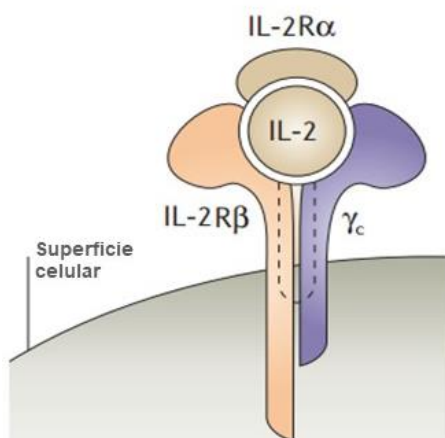


Figura 4. Interacción de la IL-2 con las subunidades de su receptor. La interleucina-2 (IL-2) es una citocina secretada que se une al receptor heterotrimérico de alta afinidad que comprende la cadena α del receptor IL-2 (IL-2R α), la cadena β (IL-2R β) y la cadena γ común (γ_c). (Modificado de Waldmann (2006))

6. Vía JAK/STAT activada por el receptor de IL-2 (IL-2R)

Los receptores del subgrupo de citocinas IL/IFN/eritropoyetina/hormona del crecimiento, carecen de actividad catalítica intrínseca; no obstante, su cascada de eventos de señalización se basa en una elegante y sencilla combinación de cinasas de tirosina y módulos acopladores con dominios SH2, que da inicio con la interacción de la IL-2 con su receptor.^{17,22}

La función y estructura de IL-2R han sido caracterizadas en linfocitos y se ha descrito que la señal intracelular comienza cuando el ligando induce una heteromerización de las cadenas de IL-2R β y γ , lo cual resulta en la activación de múltiples cinasas, incluyendo la familia JAK^{22,25}.

El IL-2R está asociado con las moléculas JAK1 y JAK3 que experimentan una rápida transfosforilación al unirse el ligando y desempeñan su función de señalización corriente abajo.

En los linfocitos, la activación de JAK1 activa JAK3 y viceversa; además, la presencia de ambas es necesaria para la correcta activación de la vía de IL-2.^{22,25} Una vez activadas las JAKs son capaces de fosforilar en residuos de tirosina en las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2) de STAT. Las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que a su vez sean fosforiladas por las JAKs. Las proteínas STATs después de ser fosforiladas, se dimerizan, se translocan al núcleo, y estimulan la expresión de genes asociados a regulación del ciclo celular, metabolismo, diferenciación, entre otros. (Figura 5).^{22,25}

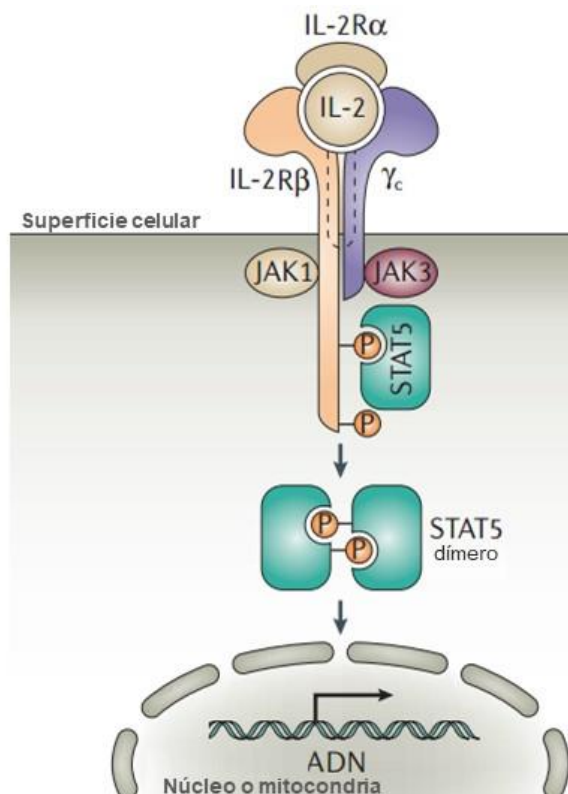


Figura 5. Estructura y vía de señalización de IL-2R. La interacción de IL-2 con la cadena β y la cadena γ conduce a la fosforilación del receptor y de JAK1 y JAK3, que están asociados con la cadena β y la cadena γ , respectivamente. STAT5 entonces, se asocia con el receptor fosforilado y se fosforila sobre un residuo de tirosina. Esto da lugar a la disociación de STAT5 del receptor y se dimeriza. Los dímeros de STAT5 fosforilados se traslocan al núcleo y promueven la transcripción de genes diana. (Modificado de Waldmann (2006))

6.1 STAT5

Una amplia variedad de citocinas hematopoyéticas, no hematopoyéticas y factores de crecimiento, que utilizan la vía de señalización JAK-STAT como su modo principal de transducción de señales, activan a la proteína STAT5. La proteína STAT5 regula de manera crítica las funciones celulares vitales (proliferación, diferenciación, supervivencia, migración y metabolismo). Si la STAT5 se encuentra constitutivamente expresada, funciona como un oncogén ya que se relaciona con algunos procesos de regulación oncogénica (ciclo celular, resistencia a la apoptosis y angiogénesis).²⁶

La proteína STAT5 puede ser activada por un grupo diverso de citocinas:

- IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, IL-9 e IL-15.
- La hormona de crecimiento (GH).
- Eritropoyetina (Epo).
- Trombopoyetina.
- El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).
- El factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- JAK1 y JAK3 (quinasas específicas para su señalización).^{27,28}

Se ha observado que en gran cantidad de tumores se produce una desregulación de STAT5 y se presenta la activación constitutiva de la proteína, lo que contribuye significativamente a la supervivencia de las células tumorales y la progresión del cáncer. También se ha observado que la localización mitocondrial de STAT5 coincide con el cambio metabólico a glucólisis aerobia observado en células linfocíticas, macrófagos y monocitos activados. Dentro de los genes blancos de STAT5 se encuentran HIF1 α , ciclina D1 y c-Myc. De igual forma, la señalización de STAT5 conduce al aumento en la absorción de lípidos a través de la translocasa CD36 y puede aumentar la transcripción de la cinasa de la piruvato deshidrogenasa (PDK) que regula el metabolismo oxidativo.^{26,27,28}

7. Vía JAK/STAT activada por el receptor de IL-2 (IL-2R) en CaCu

Nuestro grupo de trabajo ha documentado que en líneas celulares de epitelio de carcinoma cervical CALO, INBL y SiHa ^{29,30} se expresa el receptor para IL-2 de manera funcional, y que al ser activado por diferentes dosis de IL-2 se producen diversos efectos.

Entonces, se comprobó que al suministrar dosis de 10 UI/mL de IL-2 se aumenta la proliferación de estas células, incrementa la fosforilación de JAK3 y STAT5, incrementa la producción de lactato y la proporción de NAD⁺/NADH; por el contrario, al estimular con 100 UI/mL la multiplicación celular disminuye junto con la fosforilación de JAK3 y STAT5, la producción de lactato y la proporción de NAD⁺/NADH.³¹ De igual modo, las dosis de 100 UI/mL promueven la activación de linfocitos.

Así pues, la relevancia de JAK3 y STAT5 en el CaCu radica en que se encuentran activadas constitutivamente conduciendo a irregularidades en la proliferación, producción de ATP y en la supervivencia celular al verse activadas por IL-2. ^{22,25}

8. Metabolismo y cáncer

Los mecanismos que integran la transducción de señales y metabolismo celular se conservan en gran medida entre las células normales y las cancerígenas. La mayor diferencia es que en células normales, la iniciación de señales requiere de estimulación extracelular, mientras que en las cancerígenas generalmente tienen mutaciones que mejoran crónicamente estas vías, lo que les permite mantener un fenotipo metabólico de biosíntesis independiente de las restricciones fisiológicas normales.³²

En tejido normal, aproximadamente 10% de la energía de la célula se genera por glucólisis, mientras que la respiración aeróbica que tiene lugar en la mitocondria contribuye con 90%. Sin embargo, en tejidos tumorales, aproximadamente el 50% de la energía celular, se genera por glucólisis, y la energía restante es generada en la mitocondria. El tejido canceroso, entonces, consume grandes cantidades de glucosa independientemente de la disponibilidad de oxígeno. Ahora está claro que el aumento de la captación de glucosa y la actividad glucolítica en las células cancerígenas permiten la redirección de los metabolitos intermediarios hacia diversas vías anabólicas (Figura 6). ^{33,34}

Se ha observado que las células cancerígenas suprimen el ciclo de los ácidos tricarboxílicos así como la fosforilación oxidativa, provocando un déficit energético mitocondrial que compensan regulando al alza los transportadores de glucosa, así como las enzimas glucolíticas con la ayuda del HIF1 α , Ras y Myc, que son inductores maestros de la glucólisis en el cáncer. HIF1 α media esta conversión induciendo enzimas en la vía de glucólisis como hexocinasa y sobre expresando GLUT 1 y GLUT3. ³⁵

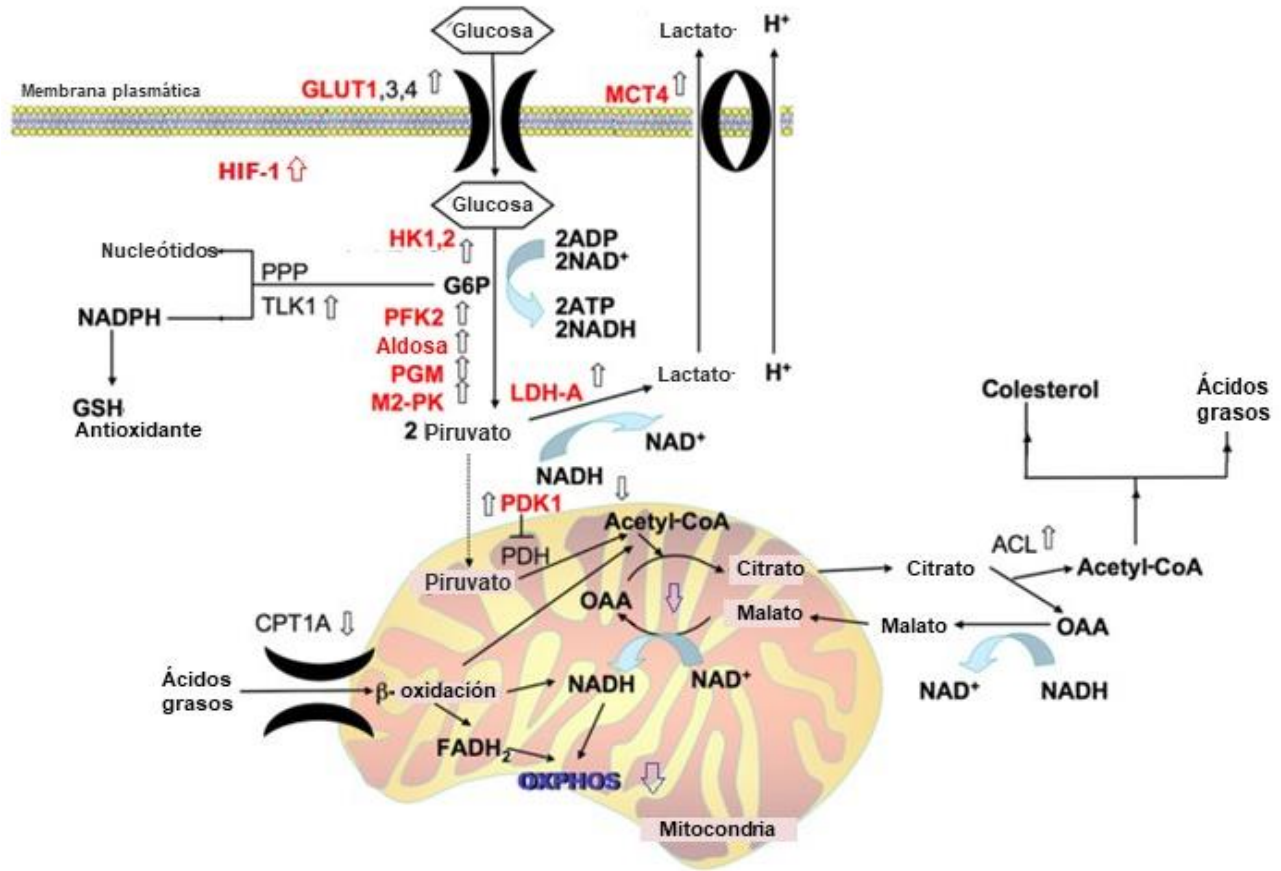


Figura 6: Reprogramación metabólica en células de cáncer. En las células normales ocurre la glucólisis que implica la conversión de glucosa a piruvato y acetyl-CoA para después completar su oxidación a través del ciclo del ácido tricarboxílico y fosforilación oxidativa a CO₂ y H₂O. En contraste, en células cancerígenas, acetyl-CoA tiende a introducirse en un ciclo del ácido tricarboxílico truncado, propiciando que, la acetyl-CoA se exporte al citosol y sirva como un bloque de construcción para el crecimiento y la proliferación celular. En este ciclo truncado, el citrato se exporta preferentemente al citosol a través del transportador de tricarboxilato. Una vez en el citosol, el citrato es escindido por la ATP citrato liasa (ACL) para generar oxaloacetato y acetyl-CoA. El acetyl-CoA queda disponible para la producción de ácidos grasos y colesterol mientras que el oxaloacetato se reduce a malato, luego se vuelve a importar a mitocondria y se reconvierte a oxaloacetato en la matriz (mientras genera NADH que reprime el ciclo del ácido tricarboxílico), y reacciona con acetyl-CoA para completar el ciclo del sustrato. Las flechas pequeñas indican regulación positiva o negativa asociada al cáncer. Las alteraciones indicadas en rojo pueden ser causadas por la activación de HIF-1. GLUT, transportador de glucosa; GSH, GLUTatión; HIF, factor inducible de hipoxia; HK, hexocinasa; OXPHOS, fosforilación oxidativa; LDHA, lactato deshidrogenasa A; MCT, transportador de monocarboxilato; PDH, piruvato deshidrogenasa; PDK, cinasa de la piruvato deshidrogenasa; PFK, fosfofructocinasa; PGM, fosfogliceratomutasa; PKM2, piruvato cinasa M2; PPP, vía pentosa fosfato.(Modificado de Kroemer G, Pouyssegur J. T(2008)).

8.1 El Efecto Warburg

En 1920, Otto Warburg hizo una publicación donde señaló que la proliferación rápida de células cancerígenas llevaba un gasto de glucosa veloz y alto en comparación con las células normales y que secretaban la mayor parte del carbono derivado en forma de lactato en lugar de oxidarlo.³⁶

Si bien todas las células necesitan una fuente de energía para mantener la homeostasis, las que se encuentran proliferando requieren una cantidad sustancial de nutrientes para producir bloques de construcción biosintéticos y macromoléculas para las células hijas recién producidas. Tanto la glucólisis como la respiración a través de la fosforilación oxidativa (OxPhos) pueden generar energía libre en forma de adenosina-5'-trifosfato (ATP). La mayoría de las células metabolizan la glucosa a piruvato a través de la glucólisis, y en condiciones normóxicas, el piruvato generado se oxida aún más a CO₂ en la mitocondria a través del ciclo de Krebs y de OxPhos, generando hasta 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Cuando el oxígeno se vuelve limitante, la OxPhos mitocondrial se restringe y la mayoría del piruvato se convierte en lactato en el citoplasma por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).³⁷ Sin embargo, se ha observado ampliamente en diferentes tipos de células que esto último puede predominar cuando el oxígeno es abundante. Una característica común entre las células que muestran este fenómeno donde predomina la glucólisis aeróbica es la "proliferación rápida" (Figura7). Aunque parece contraintuitivo, la proliferación rápida parece depender de la glucólisis aeróbica a pesar del hecho de que produce significativamente menos ATP/glucosa en comparación con la OxPhos.³⁸

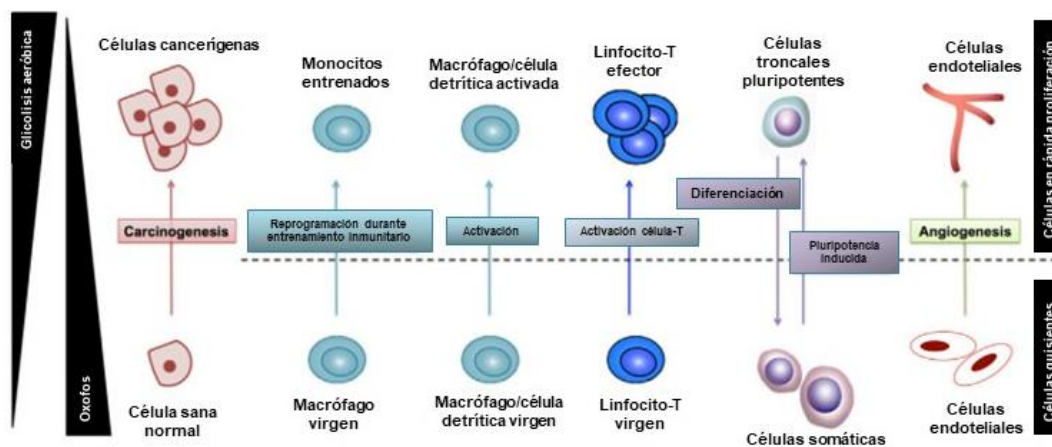


Figura 7. El efecto Warburg en células cancerígenas y normales. La mayoría de las células cancerosas muestran notables alteraciones en el metabolismo de la glucosa. En comparación con las normales, las cancerosas suelen mostrar un aumento drástico en la captación de glucosa. Lo cual genera más metabolitos intermedios glucolíticos y la cantidad significativa de ATP que se presenta por la alta actividad de la glucólisis. Además, una fracción de carbono de la glucosa, en forma de variados intermediarios glucolíticos, se derivan a múltiples vías biosintéticas como la vía de fosfato pentosa (PPP), síntesis de serina y triacilglicerol para la síntesis de novo para nucleótidos, aminoácidos y lípidos, en lugar de formar la molécula de piruvato. (Modificado de Alyaa M, Abdel H, Nathan EL, Neema J, Katsuhiko M, Xin Gao, and Takashi G. (2017)).

Mientras las células normales metabolizan la glucosa casi exclusivamente para la producción de energía, las células cancerosas aumentan el consumo de glucosa principalmente para proporcionar un suministro constante de productos intermedios glucolíticos y así satisfacer la necesidad anabólica al dividirse las células. En este sentido, el metabolismo de la glucosa favorece la conversión de la glucosa en biomasa y mantiene la naturaleza altamente proliferativa del cáncer.³⁷

Detrás del interruptor glucolítico de las células cancerosas se encuentran mutaciones oncogénicas que permiten la captación de nutrientes y reprogramación metabólica hacia vías anabólicas. El microambiente dentro de los tumores como la hipoxia, la acidificación extracelular y la cantidad de nutrientes contribuyen aún más al fenotipo metabólico anormal. La priorización de la glucólisis en las células cancerosas está mediada en parte por el factor inducible por hipoxia (HIF). Durante la hipoxia, HIF se estabiliza y media la transcripción de genes que promueven la supervivencia celular. También se expresa en exceso en las células cancerosas debido a la hipoxia y a la señalización de PI3K-Akt, que generalmente está regulada a la alta por mutaciones en cinasas de tirosina o por pérdida de la función de p53, proteína responsable de regular la proliferación y el metabolismo de la glucosa. Algunos de los genes activados por HIF promueven el fenotipo glucolítico regulando la expresión del transportador de glucosa, que regula la disponibilidad de nutrientes y la expresión de la isoenzima-1 de la cinasa piruvato deshidrogenasa, lo que evita la entrada del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico y promueve rutas biosintéticas como la vía de pentosas fosfato (Figura 6).

Durante la glucólisis se produce una gran cantidad de lactato, por lo que la regulación positiva por HIF de los transportadores de H⁺/lactato, son esenciales para prevenir la acidificación intracelular, lo que causa la detención del crecimiento en las células cancerosas. Debido a esto, la secreción del lactato no es solamente un mecanismo de eliminación de desechos, sino también un proceso que mantiene la tasa de glucólisis y promueve la progresión tumoral y la metástasis. El microentorno extracelular ácido resultante promueve la transición epitelial a mesénquima en las células cancerosas, contribuye a la resistencia a fármacos y perjudica la señalización inmunológica de las células. La dependencia de las células cancerosas a la glucólisis y la secreción de lactato sugieren razones adicionales para su uso, además de una generación rápida de ATP lo cual apoya la demanda de actividad del transporte de membrana para regular el flujo de nutrientes y la homeostasis del pH (Figura 8).³⁹

Célula cancerosa

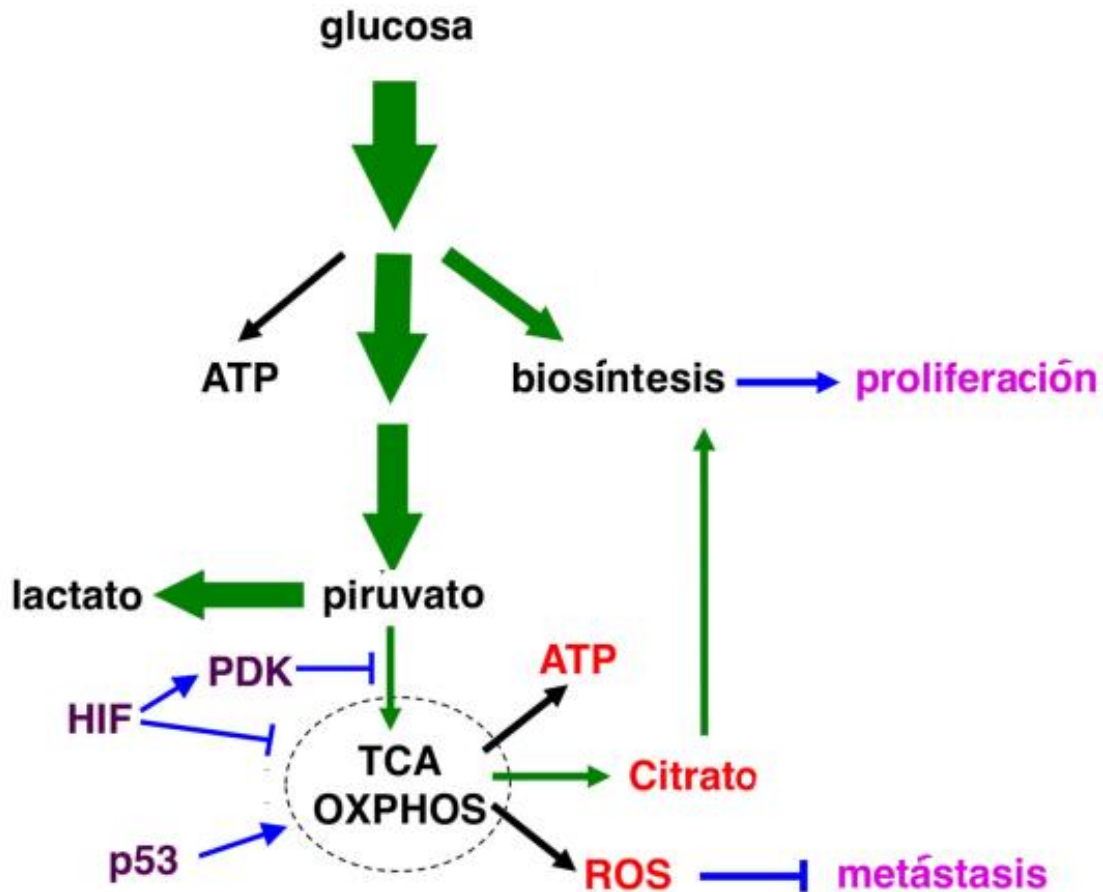


Figura 8. Metabolismo de la glucosa en células cancerosas bajo normoxia. Las células cancerosas aumentan dramáticamente la captación de glucosa y la glucólisis. Una parte significativa del carbono de la glucosa se desvía a vías biosintéticas como combustible para proliferación celular. El piruvato se desvía preferentemente a lactato. El metabolismo oxidativo persiste, pero se desacopla del aumento de la glucólisis. Los subproductos de la respiración ROS exhiben actividad anti-metástasis, lo que puede explicar por qué el cáncer mantiene la oxidación de la glucosa bajo control. (Modificado de Jianrong Lua, Ming Tanb, and Qingsong Caia (2015)).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México tiene una alta mortalidad por cáncer cervicouterino, el cual está asociado a infección por virus de papiloma humano en un 95% de los casos; dentro de este porcentaje, el 70% está asociado con el genotipo de VPH16+. Por otra parte, se ha determinado que las alteraciones metabólicas son un factor importante en el origen y progresión del cáncer lo que llevado a indagar el papel de la IL-2 y su interacción con la vía JAK/STAT, tanto en este ámbito como en el de la proliferación y ciclo celular.

De modo que, se han llevado a cabo estudios *in vitro* con la línea de carcinoma de cérvix SiHa, la cual está asociada a VPH16+; que expresa el receptor funcional para IL-2. En dichas investigaciones, se ha reportado que al estimular estas células con 10 UI/mL de IL-2, aumenta la fosforilación de JAK3 y STAT5, así como la proliferación; por el contrario, al estimular con 100 UI/mL la fosforilación de estas moléculas disminuye junto con la multiplicación celular. Sin embargo, aún se desconoce el efecto de estas dosis de IL-2 en la producción de energía y expresión de moléculas involucradas en el metabolismo celular, tales como: Flavoproteína, HIF1 α , Hexocinasa, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1). Al mismo tiempo, considerando el rol que juega STAT5 en células normales, incrementa el interés por examinar con más detalle su relevancia dentro del campo metabólico del cáncer cervicouterino por medio de observar el efecto que puede provocar el silenciamiento de la proteína bajo las mismas condiciones.

HIPÓTESIS

La activación de la vía JAK/STAT por 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 estimulará la expresión diferencial de genes y moléculas como flavoproteína, HIF1 α , hexocinasa, GLUT 1 y el complejo citocromo b relacionadas a la glucólisis y a la fosforilación oxidativa, lo que ocasionará cambios metabólicos reflejados en la producción de ATP y el silenciamiento de STAT5 disminuirá la expresión de las mismas moléculas y la producción de ATP.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 sobre la producción de ATP en células de cáncer de cérvix SiHa y SiHa con STAT5 silenciada.

Objetivos particulares

- Analizar el efecto de 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 sobre la producción de ATP en células de cáncer SiHa a 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h.
- Analizar el efecto del silenciamiento de STAT5 en células SiHa con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 sobre la producción de ATP a 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h.
- Comparar la producción de ATP de las células SiHa y SiHa con STAT5 silenciada contra células mononucleares adherentes.
- Analizar el efecto de 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 sobre la expresión de genes relacionados a la glucólisis y a componentes de los complejos de la cadena respiratoria cómo son flavoproteína, HIF1 α , hexocinasa 2, GLUT 1, subunidad 1 del complejo citocromo b, debido a la activación de la vía JAK-STAT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se cultivó la línea celular de cáncer de cérvix SiHa WT (VPH16+) y SiHa con silenciamiento en STAT5 con medio RPMI-1640 (Microlab, México) suplementado con 6% de suero fetal bovino (SFB), en un ambiente de 5% de CO₂, a 37° de temperatura y humedad saturada. La resiembra se realizó cuando las células se encontraban entre el 70-80% de confluencia.

Las células SiHa con STAT5 silenciada se obtuvieron del Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza por medio de la introducción de un shRNA utilizando un plásmido en células SiHa WT.

Obtención de linfocitos de sangre periférica

Para evaluar la producción de ATP en células mononucleares adherentes se obtuvieron dos tubos de 6 mL de sangre periférica de donadores sanos por punción con sistema Vacutainer con tubos de EDTA K2; la sangre fue centrifugada a 2500 rpm por 7min para separar el plasma del paquete celular mediante pipeteo; el paquete celular se lavó con RPMI (en un volumen igual al retirado), se resuspendió suavemente y se centrifugó nuevamente, este lavado se repite tres veces. Una vez finalizados los lavados, el paquete celular se resuspendió en RPMI y se vertieron alícuotas de 5 mL en tubos de 15 mL conteniendo 2.5 mL de Ficoll-paque (GE Healthcare) con una densidad de 1.077 g/mL, los cuales fueron centrifugados por 30 min a 1500 rpm. Al separarse las fases, los linfocitos se obtuvieron mediante pipeteo circular suave de la fase intermedia entre el RPMI y el Ficoll-paque. Se contaron por medio de la cámara de Neubauer y se cultivaron 45,000 células por pozo con RPMI con 20% de SFB y 10 UI/mL o 100 UI/mL de IL-2 o sin tratamiento en placas de 96 pozos. Este método se realizó por triplicado.

Cuantificación de ATP

Para cuantificar la cantidad de ATP producido en cada condición se utilizó el *ATP Assay Kit* de Merck Millipore. Se sembraron 15,000 células SiHa WT para cada condición en placas de 96 pozos. Los ensayos se realizaron a 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h. Los tratamientos se hicieron de la siguiente manera: estimulando con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 y otro sin tratamiento, esto para cada tiempo. Una vez cumplidos los tiempos, el ATP producido se midió por luminometría en un equipo *Fluoroskan Ascent* (Thermo Scientific). El procedimiento del *ATP Assay Kit* de Merck Millipore comenzó colocando en cada pozo 100 μ l de *nucleotide releasing Buffer* por 4min con movimiento suave. Se trasladaron las muestras a una placa blanca para luminometría. Se agregaron 10 μ l de *ATP monitoring enzyme* y después de 1-2 min, se leyó la placa en el luminómetro *Fluoroskan Ascent* de Thermo Scientific. La cantidad de ATP se calculó a partir de una curva estándar del *ATP Assay Kit*. Por cada molécula de ATP consumida se produce un fotón. Los ensayos se realizaron por triplicado. El mismo procedimiento se aplicó a las células SiHa con STAT5 silenciada. Los resultados fueron analizados estadísticamente en el software Prisma 6.0 usando la prueba *t de Student* con significancia de $p < 0.05$. y $p < 0.01$.

Extracción de ARN

Para evaluar la expresión de: Flavoproteína, HIF1 α , Hexocinasa, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1). Se sembraron 1×10^6 células SiHa WT sin tratamiento, con 10 UI/mL de IL-2, y con 100 UI/mL de IL-2 por 24 h y 48 h. Cumplido el tiempo se desechó el medio y se adicionaron 500 μ L de Trizol. Las muestras homogeneizadas se trasladaron a un tubo Eppendorff de 1.5mL. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (t.a). Se agregaron 100 μ L de cloroformo y se agitaron

vigorosamente hasta formar una emulsión, se incubaron por 2-3 min a t.a. se centrifugaron en microtubos a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa obtenida a un tubo Eppendorff y se adicionaron 400 µL de isopropanol; se invirtieron las muestras tres veces y se agregaron 400 µL más de isopropanol para precipitar el ARN. Se incubaron por 10 min. a t.a. para luego centrifugar a 12,000 rpm por 10 min. a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó el botón de ARN con etanol (75%), se mezcló por inversión y se centrifugó a 7,500 rpm por 5min. a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el ARN se dejó secar cubierto con parafilm toda la noche. El ARN se rehidrató con 40 µL de agua libre de nucleasas. Se cuantificó disolviendo 1 µL de ARN en 199 µL de agua libre de nucleasas para tener una dilución de 1:200. Se determinó la concentración de ARN en un biofotómetro Eppendorf a una absorbancia de 260 nm.

Retrotranscripción (RT-PCR)

Una vez purificado el ARN, se procedió a obtener el ADNc (ADN complementario) con 3 µg de ARNm usando 1 µL de RevertAid M-MuLV RT, 5 µL de First Strand Buffer 5X, 1.5 µL de dNTP mix 10mM, 1.5 µL de oligo (dT) o 1.5 µL de hexámeros aleatorios para la subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1) llevado a un volumen de 25 µL con agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción en el termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler ALO28386) fueron 37°C por 90 min.

PCR

El ADNc se amplificó usando 3 µL de Taq Buffer de reacción 10X, 0.2 µL de Taq Polimerasa, 0.9 µL de dNTPs 10 mn, 0.5 µL de cebador correspondiente y 3 µL de ADNc para llevar a un volumen total de 20 µL con agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador (PTC-200 *Peltier Thermal Cycler* ALO28386) por 2 minutos a 94°C; seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 60 s; y 10 minutos a 72°C. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 1.5% a 90 Voltios, teñido con 3 µL de SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, USA).

En las bandas obtenidas, se realizó un análisis densitométrico comparado contra β-actina en un equipo ChemiDoc de Bio Rad.

Conjunto de cebadores utilizados			
Cebador	Forward	Reverse	pb
Flavoproteína (NDUFV1)	GGCACCAAACACTATTCAACTCATC	CAGCATGCTTCTCATCAAGTTC	100
HIF1α	CCAGAGTCACTGGAACCTTTCTT	GCTCAGGTGAACTTTGTCTAGT	129
Hexocinasa	CCTCCTACTTCTCTGGCTCTTA	GACTTACACGAGGTCACATAGC	94
GLUT 1	CCACCTCACTCCTGTTACTTAC	CCCCTTACTTCTGTCTCACTC	122
UQCRC1	CGAGTACCTCAGCACACATTAC	CTCTGCATATGTCCATGGGATG	127

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE ATP

Para determinar el efecto de la IL-2 sobre la producción de ATP se realizaron ensayos por triplicado utilizando el *ATP Assay Kit* de Merck Millipore. Los resultados se leyeron por medio de un fluorómetro para después transformar la absorbancia obtenida en concentración, por medio de una curva estándar generada a partir del patrón de ATP contenido en el kit.

La estimulación con 10 UI/mL de IL-2 aumenta la producción de ATP en células mononucleares adherentes

Para determinar el efecto de IL-2 sobre la producción de ATP en células mononucleares, se les estimuló con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 durante 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h, para hacer una comparación con el efecto de esta citocina sobre la producción de ATP en células de cáncer de cérvix.

Las células mononucleares presentaron un aumento significativo en la producción de ATP, comparando con su respectivo control sin tratamiento (S/T), al ser estimuladas con 10 UI/mL y 100 UI/mL, a excepción de las 10 h donde se observa que la mayor concentración es 0.43 µg/mL de ATP con estímulo o sin él (Figura 9).

Producción de ATP en células mononucleares adherentes

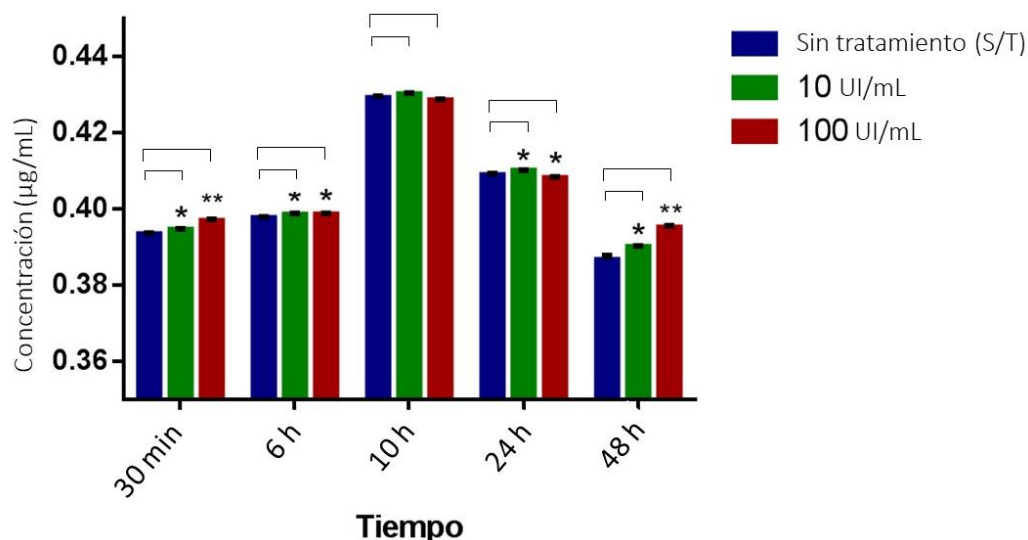


Figura 9. Análisis de la producción de ATP en células mononucleares adherentes de individuos sanos tratadas con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2. Se utilizaron 45,000 células para cada ensayo por triplicado. Se retiró el medio antes de estimular. Las células se estimularon con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 por los tiempos establecidos. Cada grupo estimulado fue comparado estadísticamente con su grupo control (S/T). Por medio del análisis *t de Student* se encontró significancia a los 30 min, 6 h, 24 h y 48 h con una * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

La estimulación con 100 UI/mL de IL-2 aumenta la producción de ATP en la línea celular SiHa WT

Para determinar el efecto de IL-2 sobre la producción de ATP en células de cáncer de cérvix se utilizaron las células SiHa WT (VPH16+).

Las células SiHa WT se estimularon con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 durante 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h para analizar el efecto de esta citocina sobre la producción de ATP.

Las células SiHa WT presentaron aumento significativo en la producción de ATP al ser estimuladas con IL-2. Además, se observa aumento del 16% con 0.83µg/mL de concentración de ATP hacia las 10 h comparado con su control S/T. (Figura 10).

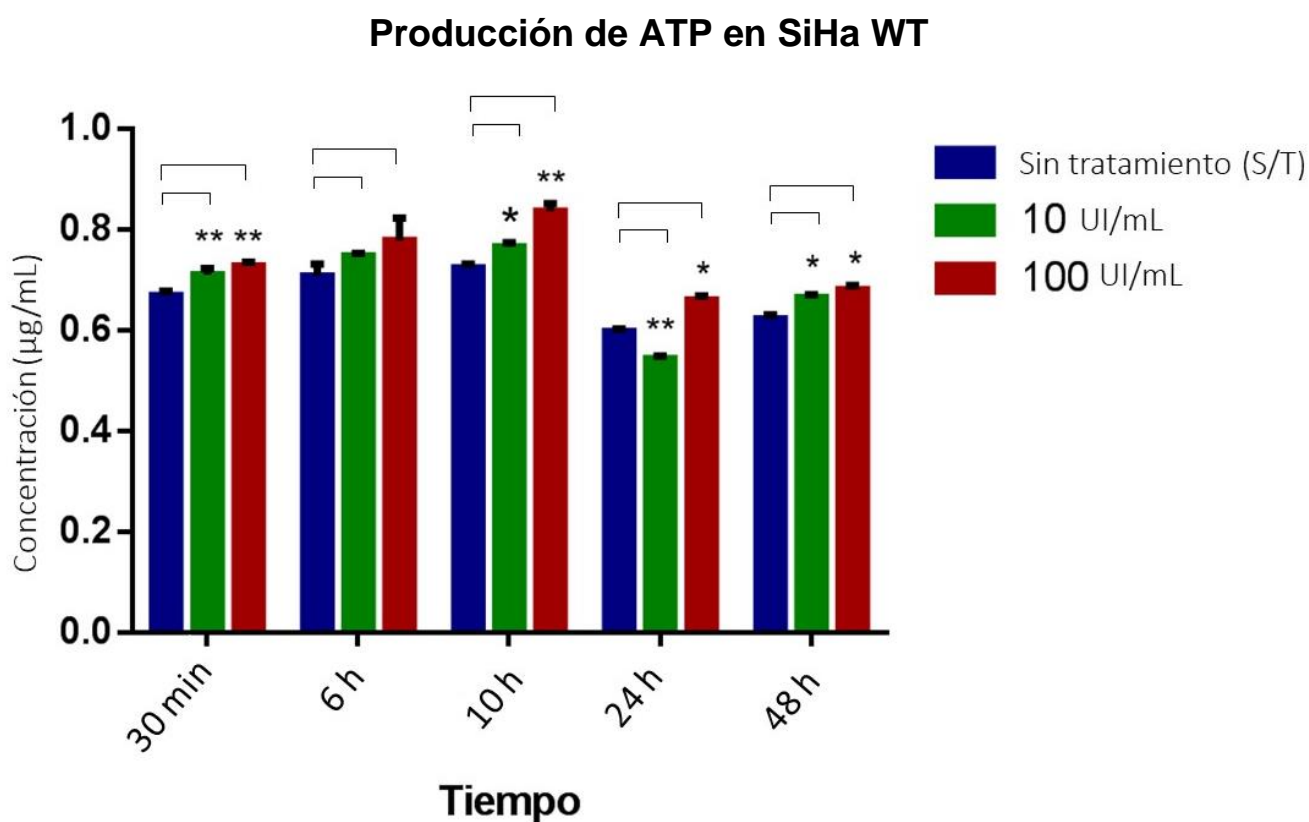


Figura 10. Análisis de la producción de ATP en células de cáncer de cérvix SiHa con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2. Se utilizaron 15,000 células de la línea SiHa para cada ensayo por triplicado. Las células se estimularon con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 por los tiempos establecidos. Cada grupo estimulado fue comparado estadísticamente con su grupo control (S/T). Por medio del análisis t de Student se encontró significancia a los 30 min, 10 h, 24 h y 48 h con una * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

La estimulación con 10 UI/mL de IL-2 disminuye la producción de ATP en la línea celular SiHa con STAT5 silenciada

En el Laboratorio de Oncología Molecular se transfectaron células con siRNA para silenciar a la proteína STAT5. Estas células se utilizaron para determinar el papel de STAT5 en el metabolismo de las células de cáncer de cérvix.

Las células SiHa con STAT5 silenciada se estimularon con 10UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 durante 30 min, 6 h, 10 h, 24 h y 48 h para analizar el efecto de esta citocina sobre su producción de ATP.

Las células SiHa con STAT5 silenciada presentaron reducción en la producción de ATP total. Además, se observa disminución de 12% con 0.48µg/mL de concentración de ATP entre las 6 h y 10 h con las células estimuladas y sin estimular. Cada tiempo fue comparado con su respectivo control sin tratamiento (S/T) (Figura 11).

Producción de ATP en SiHa con STAT5 silenciada

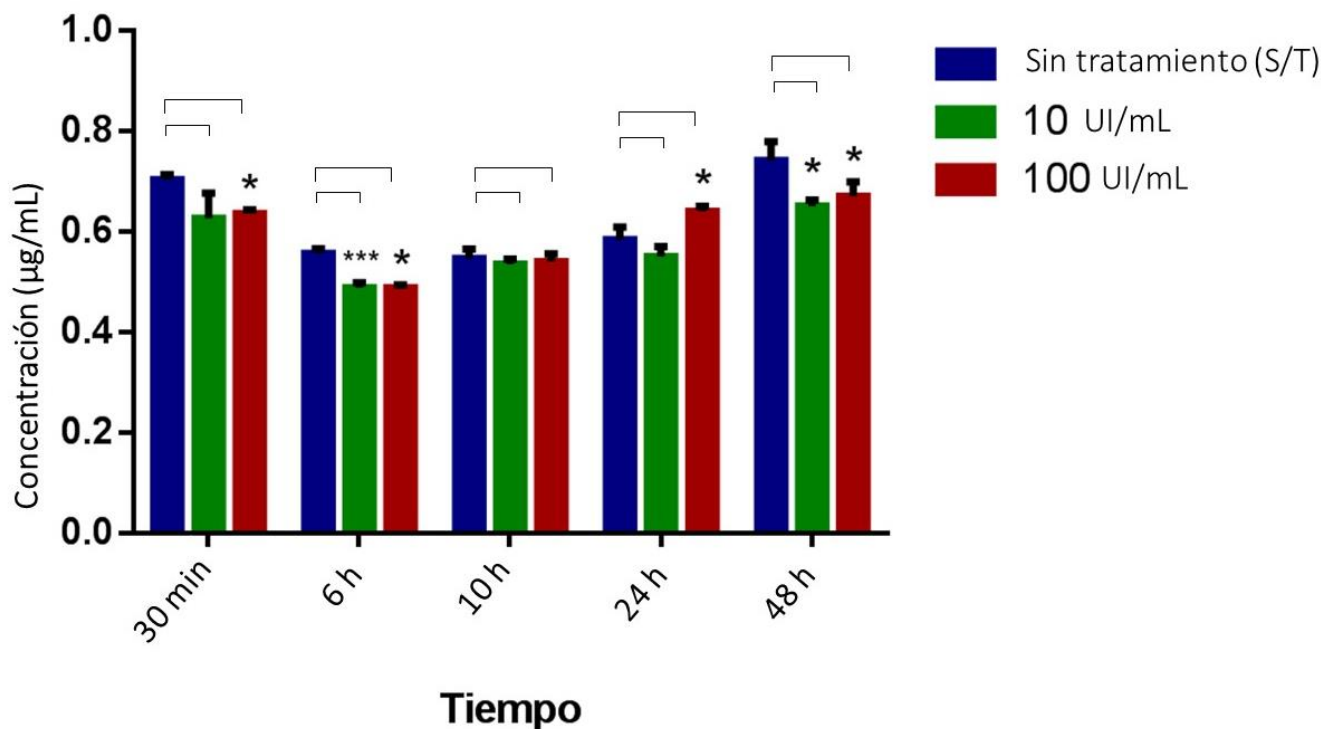


Figura 11. Análisis de la producción de ATP en células SiHa con STAT5 silenciada tratadas con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2. Se utilizaron 15,000 células de la línea SiHa transfectada para cada ensayo por triplicado. Las células se estimularon con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 por los tiempos establecidos. Cada grupo estimulado fue comparado estadísticamente con su grupo control (S/T). Por medio del análisis *t de Student* se encontró significancia a los 30 min, 6 h, 24 h y 48 h con una * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

EXPRESIÓN DE GENES BLANCO DE STAT5

Se ha informado que STAT5 tiene un papel relevante en algunos tipos de cáncer, de entre ellos figura el cáncer de cérvix; además es una molécula central en la regulación de funciones celulares vitales, por ejemplo, la proliferación y metabolismo. Se decidió analizar cómo afecta el silenciamiento de esta proteína a la expresión de moléculas relacionadas con el metabolismo, tales como flavoproteína, HIF1 α , Hexocinasa, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1). Se comparó la expresión de estas moléculas en la línea celular SiHa y células SiHa con STAT5 silenciada. Las líneas celulares se estimularon con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 por 24 h y 48 h. Cada tiempo fue comparado con su respectivo control sin tratamiento (S/T).

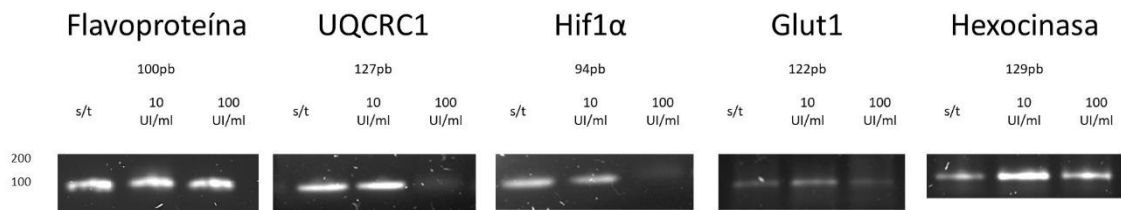
Expresión de las moléculas asociadas con el metabolismo celular (Flavoproteína, HIF1 α , Hexocinasa, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1)) en la línea celular SiHa WT tratada con IL-2

Los resultados muestran que la expresión de flavoproteína en células tratadas con 10 UI/mL de IL-2 por 24 h aumenta significativamente (50.6%), mientras que a las 48 h de tratamiento con 100 UI/mL la expresión disminuye significativamente (2.1%). En la expresión de UQCRC1 a las 24 h con 10 UI/mL se observa un aumento significativo de 54% y a las 48 h la expresión disminuye 44%. Por otro lado, el tratamiento con 100 UI/mL a las 24 h y 48 h induce disminución en la expresión de la molécula en un 33%. Para HIF1 α la expresión es mucho mayor a las 24 h que a las 48 h. El estímulo con 10 UI/mL por 24 h aumenta la expresión 21% mientras que con 100 UI/mL a las 24 h y 48 h se observa el efecto contrario disminuyendo 52% y 28% respectivamente. Con respecto a la expresión del transportador GLUT1, se observa que el estímulo con 10 UI/mL aumenta 13.4% a las 24 h; mientras que con 100 UI/mL a las 24 h y 48 h la expresión disminuye 11% y 33% respectivamente. La hexocinasa tiene mayor expresión con el estímulo de 10 UI/mL de IL-2, a las 24 h aumenta más del doble comparado con el control sin tratamiento. Conserva este efecto en un 58% a las 48 h. Con 100 UI/mL a las 24 h también aumenta 57%. Sin embargo, a las 48 h el estímulo con 100 UI/mL induce una menor expresión de la molécula en un 16%.

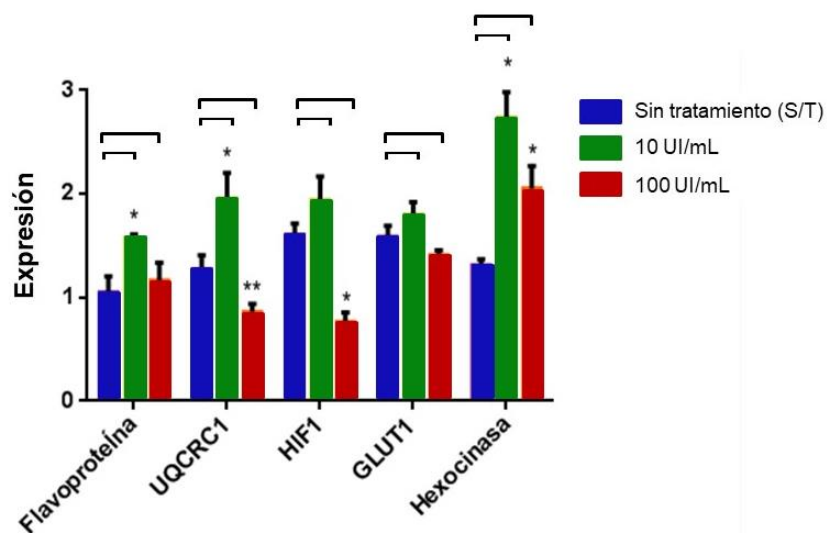
En general, se observa que a las 24 h el estímulo con 10 UI/mL aumenta la expresión de las moléculas mientras que a las 48 h el estímulo con 100 UI/mL induce una disminución en la expresión. (Figura 12).

Expresión de genes metabólicos en SiHa WT estimuladas por 24h y 48h con IL-2.

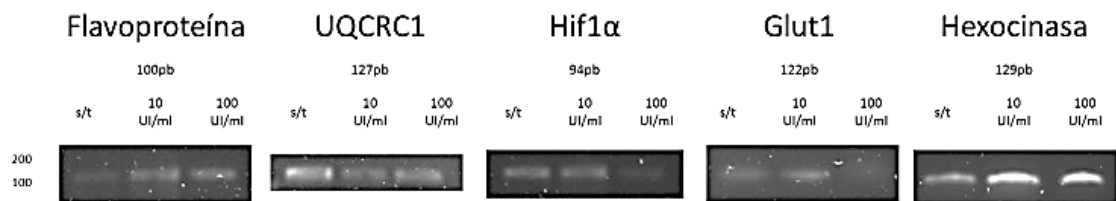
A.



B.



C.



D.

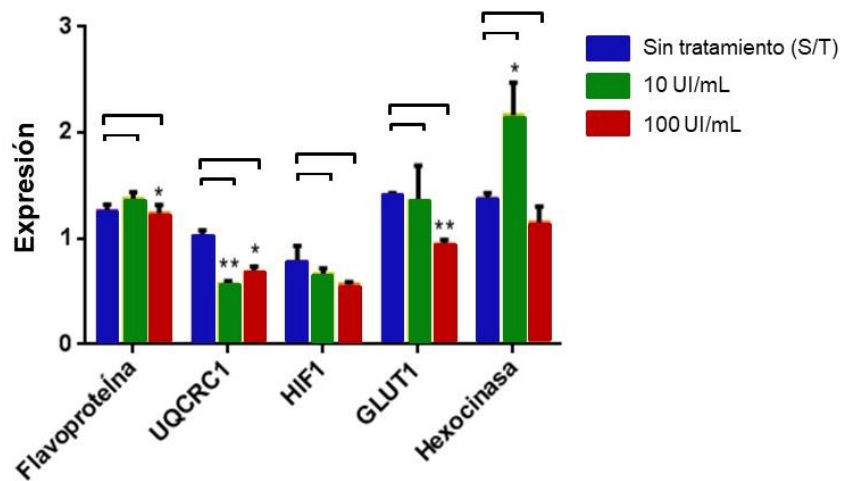


Figura 12. Expresión de genes metabólicos en SiHa WT estimuladas por 24h y 48h con IL-2. El ensayo se realizó por triplicado. Los productos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa contra β -actina en el equipo ChemiDoc de Bio Rad. Se realizó un análisis densitométrico para medir la expresión. Cada grupo estimulado fue comparado con sus células control (s/t) por medio de *t de Student* con $*p<0.05$ y $**p<0.01$. **A.** Resultado representativo de uno de los tres ensayos independientes con SiHa tratada con IL-2 por 24 h. **B.** Representación gráfica del promedio de tres ensayos independientes de SiHa tratada con IL-2 por 24 h. **C.** Resultado representativo de uno de los tres ensayos independientes con SiHa tratada con IL-2 por 48 h. **D.** Representación gráfica del promedio de tres ensayos independientes de SiHa tratada con IL-2 por 48 h.

Expresión de las moléculas asociadas con el metabolismo celular (Flavoproteína, HIF1 α , Hexocinasa, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1)) en la línea celular SiHa con STAT5 silenciada tratada con IL-2

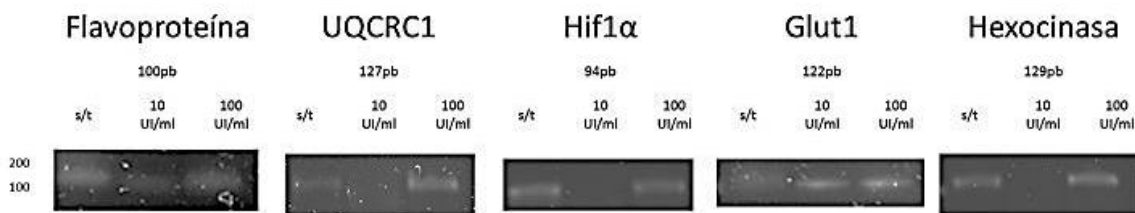
Los resultados muestran que la expresión de flavoproteína tratada con 10 UI/mL se ve afectada significativamente, a las 24 h disminuye un 79% y a las 48 h aumenta un 38%. El estímulo con 100 UI/mL de IL-2 solo aumenta significativamente 28% a las 48 h. La expresión de UQCRC1 aumenta significativamente un 51% a las 24 h y un 33% a las 48 h con el tratamiento de 100 UI/mL. Con el estímulo de 10 UI/mL la expresión disminuye significativamente 39% solo a las 48 h. El mismo efecto se observa con HIF1 α aumentando 37% a las 24 h y 48% a las 48 h con 100 UI/mL, pero el estímulo con 10 UI/mL disminuye la expresión significativamente un 64% a las 24 h. La expresión del transportador GLUT1 solo muestra una disminución significativa del 70% a las 48 h. La hexocinasa tiene menor expresión a las 24 h con el estímulo de 10 UI/mL, disminuyendo un 82% y muestra una expresión mayor, de 19%, a las 48 h con estímulo de 100 UI/mL de IL-2.

En general, se observa que a las 24 h y 48 h el estímulo con 100 UI/mL aumenta la expresión todas las moléculas significativamente y el estímulo con 10 UI/mL solo aumenta la expresión de flavoproteína a las 48 h. Aunque se observa un nivel de expresión más alto de todas las moléculas a las 48 h. (Figura 13).

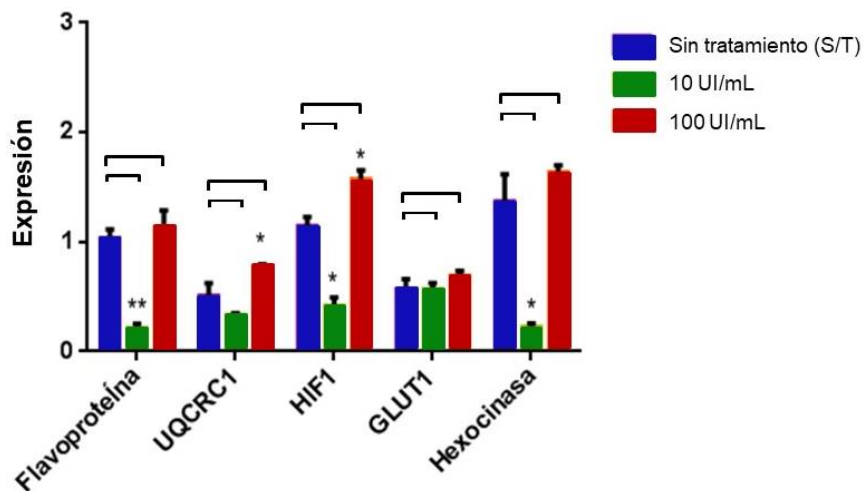
A manera comparativa el estímulo con IL-2 en SiHa WT produce una expresión más rápida cuando la dosis es menor mientras que en SiHa con STAT5 silenciada se requiere una mayor dosis y tiempo de exposición para la expresión.

Expresión de genes metabólicos en SiHa con STAT5 silenciada estimuladas por 24h y 48h con IL-2.

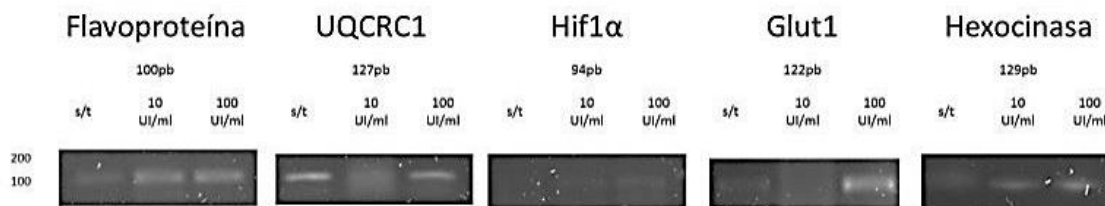
A.



B.



C.



D.

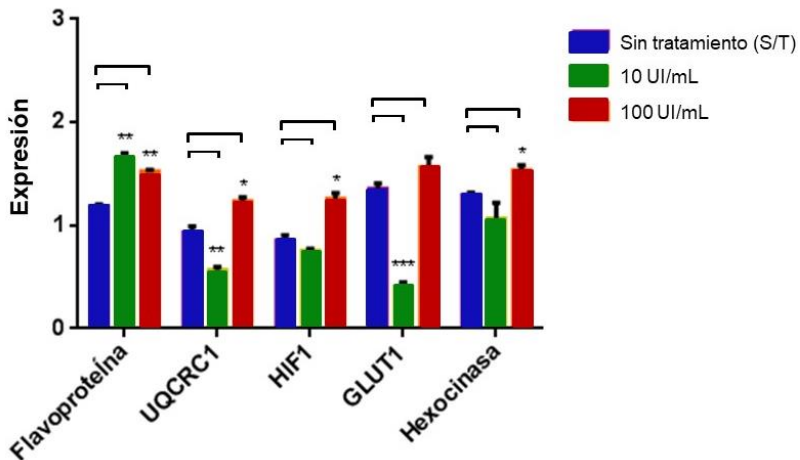


Figura 13. Expresión de genes metabólicos en SiHa con STAT5 silenciada estimulas por 24 h y 48 h con IL-2. El ensayo se realizó por triplicado. Los productos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa contra β -actina en el equipo ChemiDoc de Bio Rad. Se realizó un análisis densitométrico para medir la expresión. Cada grupo estimulado fue comparado con sus células control (s/t) por medio de t de Student con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. **A.** Resultado representativo de uno de los tres ensayos independientes con SiHa con STAT5 silenciada tratada con IL-2 por 24 h. **B.** Representación gráfica del promedio de tres ensayos independientes de SiHa con STAT5 silenciada tratada con IL-2 por 24 h. **C.** Resultado representativo de uno de los tres ensayos independientes con SiHa con STAT5 silenciada tratada con IL-2 por 48 h. **D.** Representación gráfica de tres ensayos independientes de SiHa con STAT5 silenciada tratada con IL-2 por 48 h.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En varios modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión tumoral. Las citocinas recombinantes se han utilizado preferentemente como inmunoterapia contra el cáncer, por ejemplo, IL-2 es una potente activadora de células del sistema inmune y estimula la liberación de varias citocinas. Particularmente, el efecto adyuvante de la IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al VPH. La IL-2 también es muy importante para la activación de la vía de señalización JAK-STAT, la cual está involucrada en procesos de proliferación, ciclo celular, metabolismo, diferenciación, etc.⁴⁰

Para que la IL-2 ejerza su acción requiere unirse a su receptor. Hasta hace algunos años se pensaba que IL-2R era exclusivo de células del sistema inmune, no obstante, se ha informado su presencia en células cancerígenas de diversos órganos, tales como el epitelio intestinal, las células epiteliales del túbulo proximal, los fibroblastos,²⁵ o cáncer de cérvix. El grupo de trabajo de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en la FES Zaragoza, determinó la presencia de IL-2R en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL²⁹, al igual que en la línea celular SiHa.³⁰ También se demostró que al tratar las líneas SiHa con 10 UI/mL de IL-2 aumenta la proliferación, mientras que al utilizar 100 UI/mL la proliferación disminuye.⁴¹

Cómo ya se ha mencionado, en tejidos tumorales una producción de ATP del 50% producida por la glucólisis genera ventajas porque permite que las células cancerígenas usen el nutriente extracelular más cuantioso (la glucosa), para producir abundante ATP; aunque el rendimiento de ATP por glucosa es bajo, si el flujo glucolítico es suficientemente alto, el porcentaje de ATP producido por glucólisis puede exceder el producido a partir de la fosforilación oxidativa. Otra ventaja es que la degradación de la glucosa proporciona a las células los productos intermedios necesarios para diversas vías, beneficiando el efecto biosintético.

Producción de ATP (mononucleares VS SiHa WT).

Entonces, el tejido canceroso consume grandes cantidades de glucosa independientemente de la disponibilidad de oxígeno.^{32,33} Como se observa en los resultados obtenidos, en su mayoría las células cancerígenas presentan casi el doble de la producción de ATP comparado con las células mononucleares (Figuras 9, 10 y 11). En cuanto a las células mononucleares, se observa que existe un aumento en la producción de ATP a los 30 min, 6 h, 24 h y 48 h con IL-2. Sin embargo, a las 10 h, que es donde se produce la mayor concentración de ATP (0.43 µg/mL), la producción no se ve afectada por la IL-2; mientras que en las células SiHa WT, generalmente ocurre un aumento significativo con

100 UI/mL de IL-2, y algo similar ocurre con el estímulo de 10 UI/mL, salvo a las 24 h donde disminuye significativamente (figuras 9 y 10).

Comparando estos resultados con observaciones obtenidas en cuanto a proliferación en células SiHa, se observa que el aumento significativo de ATP que ocurre con el estímulo de 100 UI/mL se produce cuando hay disminución en la proliferación con la misma dosis.²⁵ Por lo tanto, al encontrarse las células en estado no proliferativo o quiescente, pueden ocupar el ATP en otras actividades celulares como biosíntesis y preparación para entrar a alguna fase del ciclo celular.

Se ha observado en células normales y cancerígenas que el periodo de tiempo en el que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, que corresponde a la fase G1, es de 6 a 12 horas.⁴² Además se ha observado en células de cáncer de colon⁴³ que la producción de ATP aumenta durante la transición de G0 a G1. Este efecto también se observó en las células SiHa control y estimuladas con IL-2. Estos resultados, en la escala de un ciclo celular, pueden sugerir un cambio global en el recambio de ATP en la población de células cancerosas.

Producción de ATP (SiHa WT VS SiHa con STAT5 silenciada).

En otro orden de ideas, STAT5 es un regulador de la proliferación y la supervivencia celular por su capacidad para modular la expresión de varios genes involucrados en apoptosis o progresión del ciclo celular, así como la codificación de genes de citocinas o factores de crecimiento. Además, se encuentra activada constitutivamente o sobreactivada por una cinasa y/o por pérdida de reguladores negativos en muchos tipos de células cancerosas^{44,45} incluidas las células de cáncer cervical. En líneas celulares de cáncer cervical se demostró que las moléculas asociadas al receptor de IL-2, JAK3 y STAT5 se encuentran activadas de manera constitutiva; al estimular estas líneas celulares con 10 UI/mL de IL-2 la fosforilación de JAK3 y STAT5 aumenta, al igual que la proliferación. Por el contrario, al estimular con 100 UI/mL la fosforilación de estas moléculas disminuye al igual que la proliferación.^{22,25} También se ha observado que la expresión de STAT5 está vinculada al estado de las células cervicales. Un estudio presentó que en casi el 58% de los casos de cáncer, las células cervicales invasivas mostraron un alto nivel de expresión de STAT5 en comparación con las lesiones cervicales pre-cancerosas en las que el 33% de los casos mostraron una alta expresión de la proteína STAT5 y sus controles normales demostraron una expresión casi insignificante de STAT5.⁴⁶

Hay estudios que señalan la capacidad de la IL-2 para reclutar a STAT5 hacia la mitocondria. Se ha observado que después que STAT5 transloca a mitocondria ocurre el cambio metabólico hacia glucólisis,²⁷ por lo que se especuló que STAT5 debería tener un papel importante en el metabolismo de las células cancerígenas.⁴⁷ Al comparar los resultados obtenidos de las células SiHa con STAT5

silenciada con los resultados de las células SiHa WT, se observa que en general la concentración de ATP es menor cuando se silencia a STAT5 (figura 11). Se observa que con STAT5 silenciada la estimulación con IL-2 conduce a una disminución en la concentración de ATP, más significativamente con la dosis de 10 UI/mL a las 6 h disminuyendo a 0.53 µg/mL. Con este resultado se puede inferir que, al no expresarse una cantidad significativa de STAT5, es posible que la IL-2 administrada active su receptor para interactuar con otras vías que también son activadas por el IL-2R, como Ras/Raf/MAPK, PI-3K/AKT, Src, inducción de Bcl-2, entre otras, las cuales activan diferentes moléculas blanco cuya función es regular y promover la supervivencia y proliferación a través de la progresión del ciclo celular, procesos antiapoptóticos, reorganización del citoesqueleto e interacción de moléculas que limitan el efecto Warburg.^{48,49}

Por ejemplo, los metabolitos producto de un ciclo de Krebs activo indican un abastecimiento adecuado de energía, por lo que, por retroalimentación negativa suprimen alostéricamente la actividad de PFK1 y la glucólisis. Por lo tanto, la oxidación activa de glucosa generalmente no es compatible con un alto índice de glucólisis.³⁷ Tomando en cuenta los resultados de la producción de ATP de SiHa con STAT5 silenciada (Figura 11), es posible que las células cancerígenas con STAT5 silenciada se acerquen a un modelo normal donde hay menor producción de ATP entre las 6 y 12 horas, que corresponden a la fase G1/S.⁴³ También se observa que el silenciamiento de STAT5 no impide que se dé una respuesta diferente en la célula cuando se estimula con 10 o 100 UI/mL de IL-2.

Expresión de moléculas.

Cómo se ha mencionado anteriormente, el metabolismo de las células cancerígenas se asemeja al de algunos tipos de células no cancerígenas cuando éstas están proliferando. Por ejemplo, las células madre embrionarias, que necesitan mantener altas tasas glucolíticas o aumentar la masa celular interna, regulan al alza GLUT1, GLUT3, hexocinasa y fosfofructocinasa 1, lo cual conduce al aumento de la síntesis de lactato.³⁸ Durante su transformación, las células cancerígenas priorizan la proliferación incontrolada lo que conduce al aumento de la glucólisis, hipoglucemia y producción aumentada de lactato, que son características del efecto Warburg. Dentro de las contribuciones a este efecto, a nivel molecular c-Myc induce la sobreexpresión de transportadores de glucosa (GLUT), de enzimas glucolíticas y de lactato deshidrogenasa.⁵⁰ De manera similar las mutaciones en p53, que en cáncer cervicouterino se asocian a E6 del genoma del VPH,^{5,7} permiten la desregulación de la expresión de transportadores GLUT1 y GLUT4. También aumentan la actividad de las enzimas glucolíticas, fosfofructocinasa y fosfogliceratomutasa e inhiben la síntesis de citocromo-c-oxidasa-2. Además, permiten la activación de HIF a través de la vía PI3K/AKT, para contribuir más al efecto Warburg.⁵⁰

Se ha reportado que STAT5 transloca a mitocondria después de la estimulación con citocinas (como IL-2 e IL-3), donde se une al bucle D del ADN mitocondrial y cumple una función en la regulación del metabolismo en células cancerosas.⁴⁷ Teniendo en cuenta ese papel, se decidió medir de manera global el metabolismo en células SiHa y SiHa con STAT5 silenciada, con moléculas de la cadena de transporte de electrones (flavoproteína y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1)), con hexocinasa que cataliza la primera reacción de la glucólisis, el transportador de glucosa GLUT1 y el factor inducible de hipoxia (HIF1 α) y comparar la expresión estimulando las células con IL-2, que activa vías asociadas al efecto Warburg. Se encontró que, generalmente a las 24 h de ser estimuladas con 10 UI/mL de IL-2, las células SiHa aumentan la expresión de las moléculas: flavoproteína (51%), HIF1 α (20%), Hexocinasa (108%), GLUT1 (13%) y subunidad 1 del complejo citocromo b (UQCRC1) (54%) (Figura 12). Este fenómeno puede relacionarse con el aumento en la proliferación de células SiHa al tratarlas con 10 UI/mL de IL-2,⁴¹ donde la sobreexpresión de ciertas proteínas le permite a la célula mantener un constante flujo energético y de biomoléculas de construcción para las células hijas.

Por otro lado, al estimular las células durante 48 h con 100 UI/mL (Figura 12), la expresión de las moléculas disminuye significativamente para flavoproteína, UQCRC1 y GLUT1. Aun así, se puede apreciar disminución en HIF1 α y hexocinasa, lo que también puede relacionarse con disminución en la proliferación encontrada con dicho estímulo en la misma línea celular.⁴¹ En las células SiHa con STAT5 silenciada, el aumento en la expresión de todas las moléculas se llevó a cabo con el estímulo de 100 UI/mL durante las 24 h y 48 h (Figura 13). Es decir, para que se lleve a cabo la expresión de genes en mitocondria como moléculas de la cadena respiratoria y moléculas citoplasmáticas como HIF1 α , GLUT1 y hexocinasa2, se necesita una mayor dosis de IL-2. Por otro lado se comprobó que el silenciamiento de STAT5 deprime la proliferación en células de cáncer de cérvix HeLa e induce la apoptosis celular.⁵¹ Además la inhibición de la actividad STAT5 suprime el crecimiento celular e induce apoptosis en líneas celulares de leucemia (Ph + ALL).⁵² Esto se puede asociar con la menor expresión de las moléculas mostrada en los resultados a las 24 h y que la síntesis de moléculas se lleve a cabo más lento, por lo cual se observa aumento general de expresión a las 48 h (Figura 13).

La cadena de transporte de electrones en las células cancerígenas se encuentra restringida o alterada en parte por el efecto Warburg y en general por las mutaciones en las moléculas reguladoras del ciclo celular, que se presentan durante la transformación celular. Por lo tanto, sus moléculas también presentan alteraciones, tal es el caso de la flavoproteína1 que se encarga de transferir electrones en la ubiquinona y el complejo citocromo b que es parte del complejo III. En cuanto a la flavoproteína1 se observó que su eliminación aumenta el comportamiento metastásico de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.⁵³ Otro estudio mostró que no se encontraba presente en 75% de las muestras de

carcinoma cervical estudiadas.⁵⁴ Por lo tanto, es posible que tenga otras funciones en la célula que contribuyen con el carácter cancerígeno de las células SiHa.

Cómo componente del complejo III se encuentra la subunidad 1 (UQCRC1) esta proteína puede mediar la formación del complejo entre los citocromos c y c1. Un estudio ha informado que UQCRC1 está desregulado en cáncer. Por ejemplo, en los cánceres de mama y de ovario la expresión de UQCRC1 está aumentada y se ha encontrado en osteosarcoma que al disminuir la expresión de UQCRC1 se promueve la proliferación celular.⁵⁵ Los resultados muestran que el estímulo con 10 UI/mL de IL-2 aumenta la expresión de flavoproteína1 (51%) y UQCRC1 (54%) a las 24 h (Figura 12). Tomando en cuenta reportes anteriores sobre la diferente respuesta de las células a dosis altas y bajas de IL-2,^{22,25} es posible que se activen diferentes mecanismos de regulación sobre la fosforilación oxidativa y que estos tengan relación con otros mecanismos celulares cómo proliferación. La disminución en la expresión de ambas moléculas a las 48 h puede estar relacionada con la generación tanto de energía cómo de biomoléculas necesitadas a lo largo del ciclo celular. En cuanto a las células SiHa con STAT5 silenciada, se observa que el estímulo con 10 UI/mL de IL-2 disminuye la expresión significativamente a las 24 h de flavoproteína-1 (79%) y la aumenta a las 48 h con ambas dosis. Mientras que para UQCRC1 la expresión disminuye con 10 UI/mL a las 48 h y aumenta al estimular con 100 UI/mL por 24 y 48 h (Figura 13). Es probable que las células cancerígenas utilicen STAT5 constitutiva para mediar el efecto con las diferentes dosis de IL-2.

Una característica destacada del cáncer cervical es la presencia de hipoxia y con ella la expresión de HIF1 α . Múltiples estudios clínicos han sugerido que HIF1 α es importante en la progresión del cáncer cervical, ya que su presencia se incrementa conforme al grado de displasia. HIF-1 α aumenta la expresión de moléculas que regulan la angiogénesis, el transporte de glucosa, la glucólisis, la invasión de tejidos/metástasis y proliferación celular.⁵⁶ El factor inducible por hipoxia 1 se relaciona con STAT5 al inducir su fosforilación y aumentar su actividad de unión a ADN de manera que STAT5 puede actuar como mediador en la expresión génica mediada por hipoxia.^{57,58} En los resultados se muestra que HIF1 α en las células SiHa tienen una mayor expresión (21%) con 10 UI/mL de IL-2 que con 100 UI/mL a las 24 h (Figura 12), lo cual puede estar relacionado con la proliferación celular reportada con las mismas dosis de IL-2,³⁸ ya que esta molécula media los factores que contribuyen a este proceso. En las células con STAT5 silenciada ocurre un efecto opuesto (Figura 13) demostrando que una menor presencia de este transductor de señal obliga a HIF1 α a requerir dosis más altas de IL-2 para estimular su expresión.

Uno de los blancos de acción de HIF1 α es el transportador de glucosa GLUT1. Múltiples estudios demuestran que la expresión de GLUT1 se correlaciona con el grado de la lesión en el cáncer

cervical,^{59,60} por lo que se decidió investigar cómo afecta la IL-2 la expresión. Los resultados muestran que en las células SiHa con 10 UI/mL de IL-2 a las 24 h la expresión aumenta (13%) (Figura 12), similar a lo reportado con HIF1 α . Mientras que en las células SiHa con STAT5 silenciada la expresión disminuye con 10 UI/mL de IL-2 a las 48 h (70%) (Figura 13). La estimulación con IL-2 y el silenciamiento de STAT5 afectan a HIF1 α , que a su vez afecta al transportador de glucosa 1 y su expresión, ya que es uno de sus principales blancos.^{61,62}

Se sabe que la alteración del metabolismo de las células cancerígenas implica una desregulación en la vía de glucólisis, considerada una de las características principales del cáncer.³⁵ Para mantener esta alta tasa metabólica las células regulan los transportadores de glucosa al alza, así como enzimas glucolíticas como la hexocinasa-2. Se ha observado en tejidos y líneas celulares de cáncer de cérvix que se expresan niveles elevados de la hexocinasa-2 en comparación con el tejido cervical sano.^{63,64} La hexocinasa-2 está activa por el constante flujo de glucosa para la generación de energía y biomoléculas durante el ciclo celular.

A su vez, la IL-2 puede alterar el ciclo proliferativo de la célula y por consiguiente la regulación de la vía de glucólisis modificando la expresión de hexocinasa-2 que también está relacionada con el mantenimiento del estado proliferativo de las células.⁶³ Asociado a estos antecedentes, la hexocinasa muestra más del doble de expresión con 10 UI/mL de IL-2 comparadas con las células sin tratamiento en SiHa (Figura 12). Por otro lado, dentro del cambio metabólico que ocurre en las células de cáncer, STAT5 se sobre expresa incrementando aún más la actividad de la glucólisis. En las células silenciadas se observa que la expresión de hexocinasa se incrementa con 100 UI/mL (19%) (Figura 13) por lo que el efecto que produce la estimulación con diferentes dosis de IL-2 se ve alterada por la presencia de STAT5, que cambia la actividad de la glucólisis por medio de otras moléculas como HIF1 α y GLUT1.

Con base en estos resultados y en otras investigaciones sobre el cáncer cervicouterino, afirmamos que STAT5 puede ser un blanco terapéutico, a través de inhibidores específicos, así como apuntar a la vía JAK-STAT para limitar la replicación descontrolada y regular el cambio metabólico que acompaña a las células en proliferación.

CONCLUSIONES

- La estimulación con IL-2 provoca que la producción normal de ATP se altere al estimular algunas de las moléculas relacionadas al metabolismo: flavoproteína-1, HIF1 α , hexocinasa-2, GLUT 1 y subunidad 1 del complejo citocromo b.
- La disminución en la expresión de STAT5 en las células cancerígenas altera la producción de ATP y el modo en que éste se distribuye a lo largo de su ciclo celular. Además, la expresión de las moléculas (flavoproteína-1, HIF1 α , hexocinasa-2, GLUT 1, subunidad 1 del complejo citocromo) se ve afectada en comparación con las células sin silenciar. Por lo tanto, STAT5 es capaz de interactuar con los ADN nuclear y mitocondrial, y también se confirma la importancia de la presencia de esta molécula para la progresión del fenotipo canceroso en células de cáncer cervical.

PERSPECTIVAS

Analizar la producción de ATP en otras líneas celulares de cáncer de cuello uterino: HeLa (VPH18+), INBL (VPH18+), HER3+ (VPH18+), Caski (VPH16+) y C33A (VPH-).

Analizar el efecto del silenciamiento de STAT5 en otras líneas celulares, centrándose en la expresión de moléculas asociadas con la vía de glucólisis y ciclo de Krebs.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boticario, C. y Cáscales Angosto, M. (2012). *Innovaciones en cáncer*. Universidad Nacional de educación a Distancia.
2. Valle Mendiola, A. y Weiss Steider, B. (2003). Origen molecular del cáncer. *Vertientes*, 6(1), 3-8.
3. Karp, G. (2008). *Biología celular y molecular conceptos y experimentos*. McGraw Hill.
4. American Cancer Society. (2 de septiembre de 2022). *¿Qué es el cáncer de cuello uterino (cervical)?* <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
5. Boletín de información científica ICCE/ SS. (junio de 2007). *Prevención de Cáncer cervicouterino*.
6. Alonso de Ruiz, P., Lazcano Ponce, E. y Hernández Avila, M. (2005). Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. *Salud Publica de México*, 42(6), 57-67.
7. Meza Junco, J., Montano Loza, A. y Aguayo Gonzalez, A. (2006). Bases Moleculares del Cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70.
8. Costa Rodriguez, J. y De Agustín Vázquez, D. (2016) *Cuadernos de citopatología*. Díaz de Santos. (pp. 55-57).
9. Guerrant, R., Walker, D. y Weller, P. (2011). *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*. Elsevier. (pp. 1082-1130).
10. Montiel Ramos, J., Bedoya A., Flores García, V. y Sánchez Vásquez, G. (2010). Variantes del Papilomavirus Humano 16 y su asociación con el HLA en cáncer cervical HLA-I y cáncer cervical. *Rev. Univ. Ind. Santander, Salud*, 42(3), 272-280.
11. UNAM [Internet]. Departamento de microbiología y parasitología-recursos en virología. Infecciones de transmisión sexual. Virus del papiloma humano [Consultado 29 de mayo 2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infecciones-transmision-sexual.html>
12. Sanabria Negrín, J. (2009). Virus del Papiloma humano. Human Papilloma virus (HPV). *Revista de Ciencias Médicas*, 13(4), 168-187.
13. Soto Cruz, I. (2003). Transducción de señales y cáncer. *Vertientes*, 6(1), 45-50.
14. Taleisnik, S. (2006). *Receptores celulares y la transducción de señales*. Encuentro Grupo Editor. (pp. 272).
15. Valdespino Gómez, V., Valdespino Castillo, P. y Valdespino Castillo, V. (2015). Cell signaling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2), 165-174. DOI: 10.1016/j.circir.2015.04.015
16. Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L. (2008). *Bioquímica*. Reverté. (pp. 381-401).
17. Lodish, H., Baltimore, D. y Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*. Freeman and company. (pp. 533-535).
18. Jiménez, L.F. y Merchant, H.(2003). *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. (pp. 209).
19. Weiss Steider, B., Soto Cruz, I., Caceres Cortes, J. y Mendoza Rincon, J. (1999). *Las citocinas en la hematopoyesis y sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares*. Plaza y Valdés Editores. (pp. 143-160).
20. Rugeles López, M. y Patiño Grajales, P. (2009). *Inmunología Una ciencia activa*. Editorial Universidad de Antioquia. (pp. 332-360).
21. Waldmann, T. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 595-601.
22. Rocha Zavaleta, L., Huitrón, C., Cacéres Cortés, J., Alvarado Moreno, J., Valle Mendiola, A. Soto Cruz, I., Weiss Steider, B. y 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. *Cellular Signalling*, 16(11), 1239–1247.
23. Rebollo A, Silva A. (1994). Estructura y Función del Receptor de IL-2. *Inmunología*. (pp. 39-47).
 24. Valle Mendiola, A., Gutiérrez Hoya, A., Lagunas-Cruz, M., Weiss Steider, B. y Soto Cruz, I. (2016). Pleiotropic effects of IL-2 on cancer: its role in cervical cancer. *Mediators of inflammation*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2849523>
 25. Valle Mendiola, A., Weiss Steider, B., Rocha Zavaleta, L. y 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 investigation*, 32(4), 115-125.
 26. Rani, A. y Murphy, J. (2015). STAT5 in Cancer and Immunity. *Journal of interferon & cytokine research*, 36(4), 54. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0054>
 27. Fu Yu, C., King Fu, L. y Chao Lan, Y. (2010). Mitochondrial translocation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in leukemic T cells and cytokine-stimulated cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(4), 778–783.
 28. Mohamed, E., Al Khami A. y Rodriguez P. (2018). The cellular metabolic land scape in the tumor milieu regulates the activity of myeloid infiltrates. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(5), 421-427.
 29. Rangel Corona, R., Corona Ortega, T., Soto Cruz, I., López Labra, A., Pablo Arcos, T., Torres Guarneros, C. y Weiss Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Science direct*, 50(3), 1239-1234.
 30. Valle Mendiola, A., Lagunas Cruz, M., Weiss Steider, B. y Soto Cruz, I. (2018). Effect of IL-2 on the secretion of lactate and the NADH/NAD plus ratio in cervical carcinoma cell line SiHa. *FEBS OPEN BIO*, 8, 344-344.
 31. Artículo enviado para su publicación.
 32. DeBerardinis, R., Lum, J., Hatzivassiliou, G., y Thompson, C. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7(1), 11-20.
 33. Brault, C. y Schulze, A. (2016). The role of glucose and lipid metabolism in growth and survival of cancer cells. *Metabolism in cancer*, 207, 1-2.
 34. Valle Mendiola, A. y Soto Cruz, I. Metabolismo energético y cáncer. *Vertientes*, 17(2), 108-113.
 35. Marbaniang, C. y Kma, L. (2018). Dysregulation of glucose metabolism by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 19(9), 2377.
 36. Koppenol, W., Bounds, P. y Dang, C. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(5), 325-37.
 37. Lu, J., Tan, M. y Cai, Q. (2015). The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer letters*, 356(2), 156-164.
 38. Abdel Haleem, A., Lewis, N., Jamshidi, N., Mineta, K., Gao, X. y Gojobori, T. (2017). The emerging facets of non-cancerous Warburg effect. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 279.
 39. Allison, K., Coomber, B., y Bridle B. (2017). Metabolic reprogramming in the tumor microenvironment: a hall mark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology*, 152(2), 175-184.
 40. Bermúdez Morales, V., Peralta Zaragoza, O. y Madrid Marina V. (2005). Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. Gene therapy with cytokines against cervical cancer. *Salud pública*, 47(6).
 41. Morelos Lopez D. (2019). *Efecto de interleucina 2 (IL-2) sobre la proliferación celular, la activación de STAT5 y su translocación a núcleo en la línea celular SiHa* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.

42. Lagunas Cruz M., Valle Mendiola, A. y Soto Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *VERTIENTES*, 17(2), 98-107.
43. Moreira, J., Hamraz, M., Abolhassani, M., Bigan, E., Pérès, S., Paulevé, L., Levy Nogueira, M., Steyaert, J. y Schwartz, L. (2016). The redox status of cancer cells supports mechanisms behind the Warburg effect. *Metabolites*, 6(4), 33.
44. Cholez, E., Debuysscher, V., Bourgeais, J., Boudot, C., Leprince, J., Tron, F., Brassart, B., Regnier, A., Bissac, E., Pecnard, E., Gouilleux, F., Lassoued, K. y Gouilleux Gruart, V. (2012). Evidence for a protective role of the STAT5 transcription factor against oxidative stress in human leukemic pre-B cells. *Leukemia*, 26(11), 2390-2397.
45. Walker, S., Xiang, M. y Frank, D. (2014). Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), 616-621.
46. Sobti, R. y Singh, N. (2010). Deregulation of STAT-5 isoforms in the development of HPV-mediated cervical carcinogenesis. *Receptors and signal transduction*, 30(3), 178-188.
47. Meier, J. y Larner, A. (2014). Toward a new state: The role of STATs in mitochondrial function. *Seminars in immunology*, 26(1), 20-28.
48. Plum, M. y Brieger, A. (2014). PTEN-inhibition by zinc ions augments interleukin-2-mediated Akt phosphorylation. *Metallomics*, 6(7), 1277-1287.
49. Fehniger, T. y Cooper, M. (2002). Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 169-183.
50. Soleja, M., Mims, M. y Rivero, G. (2016). Uncovering molecular abnormalities leading to the Warburg effect in primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer*, 6(12), 502.
51. Xi, Z. (2009). Influence of STAT5 siRNA on HeLa cell proliferation and apoptosis and its molecular mechanism. *Clinic Oncologic*, 14(10), 879-883.
52. Minieri, V., Dominici, M., Nevalainen, M. y Calabretta, B. (2018). Targeting the STAT5 pathway in Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*, 9(95), 36726.
53. Urrea, F., Muñoz, F., Lovy, A. y Cárdenas, C. (2017). The mitochondrial complex(I) y of cancer. *Frontiers in oncology*, 7, 118.
54. Fragoso Ontiveros, V., Álvarez García, R., Contreras Paredes, A., Vaca Paniagua, F., Herrera, L., López Camarillo, C., Jacobo Herrera, N., Lizano Soberón, M. y Pérez Plasencia C. (2012). Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV-18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis. *Virology*, 432(1), 81-90.
55. Zhao, X., Wang, Q., Lin, F., Wang, X., Wang, Y., Wang, J. y Wang, C. (2019). RNA sequencing of osteosarcoma gene expression profile revealed that miR-214-3p facilitates osteosarcoma cell proliferation via targeting ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 (UQCRC1). *Med Sci Monit*, 25, 4982-4991.
56. Lu, Z., Wright, J., Belt, B., Cardiff, R. y Arbeit, J. (2007). Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *The American journal of pathology*, 171(2), 667-681.
57. Joung, Y., Park, J., Park, T., Lee, C., Kim, O., Ye, S., Yang, U., Lee, K. y Yang Y. (2003). Hypoxia activates signal transducers and activators of transcription 5 (STAT5) and increases its binding activity to the GAS element in mammary epithelial cells. *Experimental & molecular medicine*, 35(5), 350-357.
58. Ahmed, M. y Miller, E. (2018). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the development and progression of pulmonary arterial hypertension. *Global cardiology science & practice*, 2018, (2), 2.

59. Rudlowski, C., Becker, A., Schroder, W., Rath, W., Büttner, R. y Moser, M. (2003). GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *American journal of clinical pathology*, 120(5), 691-698.
60. Mendez, L., Mancini, N., Cantuaria, G., Gómez Marín, O., Penalver, M., Braunschweiger, P. y Nadji, M. (2002). Expression of glucose transporter-1 in cervical cancer and its precursors. *Gynecologic oncology*, 86(2), 138-143.
61. Pawlus, M. y Hu, C. (2013). Enhances some as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cellular signalling*, 25(9), 1895-1903.
62. Ebert, B., Firth, J. y Ractliffe, P. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *Journal of biological Chemistry*, 270(49), 29083-29089.
63. Alcántara, Q., Gallegos, G. y Terán, F. (2019). Expresión de CD43, piruvato cinasa II y hexocinasa II en carcinoma epidermoide cervicouterino. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 2019(77), 56-62.
64. Moreno Acostaa, P., Carrillo, S., Gamboa, O., Acosta, Y., Balart Serra, J., Magne, N., Melo Uribe, M. y Romero Rojas, A. (2013). Expresión de marcadores hipóxicos y glucolíticos CAIX, GLUT-1, HKII y su relación con la respuesta temprana al tratamiento en carcinoma escamocelular del cuello uterino. *Progresos de obstetricia y ginecología*, 56(8), 404-413.

BIOGRAFÍA DE FIGURAS

Figura 1. International Agency for Research on Cancer. (8 de septiembre de 2022). *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

Figura 2. A. Prendiville, W. Davies, P. (2004) *Human papiloma virus and cervical cáncer HPV handbook*. Taylor & Francis Grup.

B. Montiel-Garcia, D., Santoyo-Rivera, N., Ho, P., Carrillo-Tripp, M., Johnson, J. E., & Reddy, V. S. [VIPERdb v3. 0: a structure-based data analytics platform for viral capsids. http://viperdbscripps.edu](http://viperdbscripps.edu).

Figura 3. Diestro, T., Serrano, V. y Gómez, P. (2007). Cáncer de cuello uterino. Estado actual de las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). *Oncología*, 2(30).

Figura 4 y 5. Waldmann, T. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Publishing Group*, 6, 595-601.

Figura 6. Kroemer, G. y Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles'heel. *Cancer Cell*, 13(6), 472-482.

Figura 7. Alyaa, M., Abdel, H., Nathan, E., Neema, J., Katsuhiko, M., Xin, G. y Takashi, G. (2017). The emerging facets of non-cancerous warburg effect. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 279.

Figura 8. Jianrong, L., Ming, T. y Qingsong, C. (2015). The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*, 356(2), 156-164.