



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

Análisis del efecto de derivados de la capsaicina sobre el patrón de fosforilación inducido por la IL-2 en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARIA DEL PILAR MEZA VALVERDE

DIRECTOR

DR. ARTURO VALLE MENDIOLA

ASESOR

DRA. M. ISABEL SOTO CRUZ



México D.F, 3 de Diciembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

Resumen

I. Resumen.....	1
II. Marco Teórico,.....	2
• El cáncer es una enfermedad genética.....	2
• Factores de riesgo.....	4
• Cáncer cervicouterino (CaCu): <i>Perspectiva del cáncer cervicouterino como problema de salud pública.</i>	5
1. Etapas de evolución de CaCu.....	6
2. Principales factores para el desarrollo de CaCu.....	8
3. las infecciones con VPH.....	8
• Desarrollo de las líneas celulares CALO e INBL.....	10
• Transducción de señales.....	10
1. Principales receptores utilizados en la transducción de señales y sus principales funciones biológicas.....	13
• Citocinas.....	15
1. Propiedades generales.....	16
• Interleucina 2 (IL-2).....	17
1. Acciones biológicas de IL-2.....	17
2. Receptor de IL-2.....	18
3. Cascada de de señalización de IL-2.....	21
• Lck: características principales de la proteína.....	22
1. Características principales de la proteína Lck.....	22
2. Estructura de Lck.....	23
3. Actividad de Lck.....	24
• Historia del desarrollo de terapias en contra del cáncer.....	26
1. Los primeros 5000 años.....	26
2. Los últimos 200 años.....	27

3. Evolución de las terapias en contra del cáncer.....	27
• Nuevas Alternativas terapéuticas : Capsaicinoides.....	31
1. Capsaicina	32
2. Canal/ receptor.....	33
3. Desensibilización inducida por la capsaicina.....	33
4. Análogos de capsaicina.....	34
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
IV. HIPOTESIS.....	39
V. OBJETIVOS.....	40
• OBJETIVOS GENERAL.....	40
• OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
VI. METODOLOGÍA.....	41
• Material Biológico.....	41
• Obtención de linfocitos de sangre periférica.....	41
• Inhibición con Fenil-acetil-rinvanil y Rinvanil.....	42
• Electroforesis (SDS-PAGE).....	43
• Western-Blot.....	44
• Incubación de Anticuerpos.....	44
• Elución de anticuerpos.....	44
VII. Resultados.....	45
• Efecto de los análogos de capsaicina sobre la fosforilación en tirosina.....	45
• Efecto de capsaicina sobre cinasas Src.....	48
• El efecto de r y far sobre linfocitos de sangre periférica de donadores sanos.....	50
• Efecto de rinvanil y fenilacetilrinvanil sobre la viabilidad celular.....	52

VIII. Análisis y Discusión de resultados.....	56
IX. CONCLUSIONES.....	62
X. PERSPECTIVAS.....	62
XI. ANEXOS.....	63
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	65

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Oncología Molecular, L-9 Planta Baja de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, bajo la supervisión y Dirección del Dr. Arturo Valle Mendiola y la Dra. M. Isabel Soto Cruz.

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA

A mis padres por la vida, el amor y comprensión, quienes siempre han sido mi inspiración y motor principal para ser mejor profesionalista, persona; a los que les debo lo que soy, por dejarme la herencia más valiosa, mi admiración y respeto eternamente.

A mis hermanos por compartir su vida, cariño, en los momentos más difíciles de mi vida motivándome a seguir adelante, no rendirse y conseguir todas mis metas anheladas. Siempre se encuentran presentes en mi vida.

A mi tía Reyna Valverde quien ha sido parte de mi formación y que además compartió su cariño y apoyo.

A toda mi Familia y padrinos por estar presentes en mi vida y saber lo importante que esto representa para mi: la Fam. Reyes Meza, la Fam Ríos Meza, Fam. Villagran Berrocal, Fam, Escobar Yedra e hijos, Fam .Meza Lopéz y Fam. Meza Hernández, Rubelio Arellano, Eluterio Valverde, Fam Vara Celis a mis todos mis primos en especial a Yunavi por todas sus muestras de afecto y confianza que me han brindado.

A mi amigo y sensei Don Profesor por brindarme su confianza y amistad durante todo el tiempo.

A todos mis amigos que desde hace años comparten mis sueños y me apoyan para poder conseguirlos en especial a Susana, Yared, Aline, Ferchuchis, Angelica Bruno, Raúl, David, Aime, Tania, Jacqueline, Gabriela, Roberto, Ivonee, Diana, Marycruz, Lalo, Cynthia gracias por todos los momentos inolvidables juntos.

A la Patrulla 2 de la Brigada del Socorro Alpino por permitirme formar parte de sus elementos y enseñarme que los límites solo te los pones tú, por el empuje que siempre me otorgaron para lograr todas mis metas.

"La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen el mal sino por las que se sientan a ver lo que pasa" ALBERT EINSTEIN

"El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad." VICTOR HUGO

Agradecimientos

A la Dra. Isabel Soto Cruz por todas sus enseñanzas y apoyo en la revisión del proyecto de tesis, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo en el Laboratorio de Oncología Molecular.

Al Dr. Arturo Valle Mendiola por apoyo incondicional en el desarrollo y revisión de mi proyecto de tesis.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio: Evelyn, Cristina, Tania, Octavio, Marcela, José, y todos los chicos nuevos, por formar parte de mi vida y por todos los días de convivencia y aprendizaje juntos, quienes hicieron mi estancia amena, divertida dentro de mi segundo hogar.

A Don Joe quien trae la música y felicidad por dentro, y forma una pieza clave en el L-9.

A todos mis profesores de la carrera quienes con todas sus enseñanzas impulsan a seguir tus sueños y cumplir todas tus metas, en especial M en C Raquel Retana, Miriam, a Dr. Rubén Marroquín, M en C Fernando Clemente, Dra. Juana Rosado por el apoyo en la revisión de este trabajo.

A todas las personas formaron parte de este ciclo tan importante para mi y que de manera directa o indirecta, me motivaron creer y tener la confianza necesaria para no desistir de esta meta que inicia con el término de este ciclo.

A la FES Zaragoza

A la UNAM

A Dios.

El futuro es hacia delante.... la ciencia marca la pauta.

I. RESUMEN

Los compuestos químicos que contienen la molécula (4-hidroxi-3-metoxibenzilo) son clasificados como vainilloides, estos productos botánicos han sido utilizados alrededor del mundo desde la antigüedad, como alimento o en la práctica clínica para diferentes tratamientos de enfermedades por sus propiedades toxicológicas y farmacológicas siendo el tratamiento de cáncer una de ellas, es conocido que causa inhibición del crecimiento o por eliminar varios tipos de células cancerosas humanas. Recientes estudios bioquímicos revelaron que los capsiatos (derivados no pungentes de la capsaicina) entre ellos el rinvanil y el fenilacetilrinvanil, se unen eficientemente y son inhibidores ultrapotentes de los receptores Vainilloides de Potencial Transitorio tipo I (TRPV I), sin embargo también se han encontrado que inhiben la actividad catalítica de la cinasa Src, la cual es un blanco importante del receptor VEGF KDK/FIk1, uniéndose de manera eficiente a la región de unión al ATP de la cinasa Src a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas; siendo posible que actúen sobre otros miembros de la familia Src, en particular Lck.

En las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia del receptor de IL-2 además de estar presente la proteína cinasa Lck de manera constitutiva, así como la participación en la vía activada por IL-2. Los resultados sugieren estos análogos utilizados en concentraciones de 50mM, fueron capaces afectar la viabilidad celular, además de inhibir el patrón de fosforilación y la presencia de Lck en la vía de señalización que se desencadena con la estimulación de IL-2, teniendo un mayor efecto en estadios menos invasivos, comparando los resultados con los linfocitos de sangre periférica obtenidos de pacientes sanos en donde no se muestran efectos significativos, por lo que estos análogos de capsaicina rinvanil y el fenilacetilrinvanil tienen un potencial considerable como un nuevo modelo de compuesto farmacológico para el desarrollo y diseño de antagonistas de Src e inhibidores de la angiogénesis.

II. MARCO TEORICO

Las células que conforman el tejido normal responden a estímulos de señales tanto externas como internas que les indican si deben proliferar o detener su división. Cuando este control se pierde, se establece el cáncer debido a la expresión errónea de genes que codifican proteínas reguladoras de este proceso ya sea por mutaciones genéticas o epigenéticas.¹⁻⁵

El adulto humano está compuesto aproximadamente por 10^{15} células, muchas de las cuales requieren dividirse y diferenciarse para responder a las células que se pierden en tejidos y órganos, todo esto se lleva por una rutina metabólica conocida como ciclo celular, el cual es una serie de eventos bioquímicos y moleculares en donde la célula duplica su material genético y se divide dando lugar a dos células hijas. Este proceso esta controlado por múltiples mecanismos moleculares los cuales van a determinar el comportamiento de la célula. Cualquier factor que altere el equilibrio entre el nacimiento y la muerte puede ser capaz, si no es corregido, de alterar el número total de células en un órgano o tejido.¹⁻⁴

El cáncer es la segunda causa de muerte detrás de las enfermedades cardíaca. La morbilidad y mortalidad por cáncer en los países subdesarrollados presenta un claro patrón ascendente; México no es la excepción ya que el número de neoplasias malignas actualmente va en ascenso y en consecuencia se ha convertido en un problema de salud pública, lo que constituye un reto para el Sistema Nacional de Salud, por la alta demanda de usuarios, el alto costo y la falta de recursos e insumos durante la atención de los mismos.⁶⁻⁸

El cáncer es una enfermedad genética

El cáncer aparece como consecuencia de una serie de alteraciones en el DNA en genes específicos que involucran activación de proto-oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores que culminan en una proliferación celular desmedida.^{1,4} Se inicia casi siempre como una enfermedad localizada. Casi todas las alteraciones en cuestión comprenden, cambios de secuencias del DNA (mutaciones).⁹ En casi todos los tipos de cáncer nacen de una sola célula (origen clonal) signo determinante y que permite diferenciar entre las neoplasias e hiperplasias. Se necesitan invariablemente innumerables

fenómenos de mutación, que se acumulan para que un fenotipo normal evolucione y se transforme en otro totalmente canceroso.^{1,9}

Estas alteraciones pueden ser heredadas o adquiridas, resultado de errores aleatorios durante la replicación, por exposición a carcinógenos (físicos, como la radiación, infecciosos, químicos o deficiencias de los procesos de reparación del DNA. Por lo tanto, al igual que la mayor parte de enfermedades humanas, el cáncer proviene de una interacción entre la genética y las exposiciones ambientales.¹

Casi todos los cánceres ocurren de manera esporádica, pero en algunas familias portadoras de una mutación de la línea germinativa en un gen cancerígeno se advierte agrupamiento de las neoplasias, es decir, casos múltiples en un mismo grupo familiar.⁹

El cáncer se caracteriza por una pérdida en la regulación de la diferenciación, proliferación y muerte celular. La alteración de estos procesos celulares se debe a la acumulación de mutaciones y modificaciones epigenéticas en un gran número de genes involucrados en el desarrollo tumoral. De manera general, los genes implicados en la carcinogénesis se han dividido en dos grupos: Los oncogenes y los genes supresores de tumores.²⁻⁴ Las mutaciones en el contexto de la carcinogénesis podrían definirse como, los cambios en el genoma de una célula particular, esto incluye las mutaciones puntuales (las cuales causan sustituciones en aminoácidos); mutaciones dentro del marco de lectura o dentro de los codones de terminación (crean proteínas truncadas o cambios en su secuencia), inestabilidad cromosómica (la cual resulta en amplificación, sobreexpresión o expresión inapropiada de ciertos genes); pérdida de genes o su fusión con otros (resultando una proteína quimérica alterada); modificaciones epigenéticas (la más importante es la metilación de citosina en las islas CpG), la cual lleva al silenciamiento de genes. Las células cancerosas en desarrollo seleccionan dos tipos de mutaciones; las que incrementan la actividad de las proteínas codificadas por genes modificados (son llamados oncogenes como: STAT3, Ras etc.) o mutaciones que disminuyen o inactivan un gen funcional (son llamados genes supresores de tumores como: p53, Rb, BRCA1, etc.).¹

De manera normal los oncogenes participan en la regulación de diversas etapas de la homeostasis celular, sin embargo la adquisición de mutaciones en

secuencias, les confiere ganancia de función: debido al aumento en los niveles de expresión del oncogen o en la actividad de su producto proteico, la ganancia de función del oncogen actúa de manera dominante en el ambiente celular o la evasión de la muerte entre otras alteraciones.^{3, 5}

El gen que se encuentra con mayor frecuencia mutado en tumores sólidos es p53 el llamado “Guardián del Genoma” este gene codifica un factor de transcripcional multifuncional, entre sus funciones tiene el control del ciclo celular, diferenciación, desarrollo, estabilidad genómica, replicación del DNA, trascricpción y reparación. Si el daño al DNA es muy extenso, induce una serie de eventos que llevan a la apoptosis de la célula dañada.^{10,11}

De esta forma la alteración de oncogenes y genes supresores de tumor a consecuencia de la exposición a diversos carcinogénicos, permite la adquisición de una serie de características celulares necesarias para el desarrollo de un tumor. Dichas características son: autosuficiencia en señales proliferativas, pérdida de la respuesta a señales anti-proliferativas, evasión de la apopsis, capacidad ilimitada para la división celular, angiogénesis exacerbada y adquisición de la capacidad de invasión y metástasis, recientemente; se ha incorporado a estos seis eventos la inflamación crónica.^{3,5}

Factores de riesgo

Los carcinogénicos poseen mecanismos tumorogénicos similares a los presentados por los carcinógenos producidos por el metabolismo normal (especies reactivas de oxígeno, radicales libres, etc.), los cuales pueden interactuar con el DNA induciendo mutaciones y/o cambios genotóxicos. En la Figura II.1 se observan los principales eventos de transformación celular.

Las diferencias de las incidencias de los tipos específicos de cáncer son muy variados en cada país. Los patrones de riesgo de poblaciones migrantes generalmente es determinado de su país de origen pero sus descendientes tienden a presentar cambios para adaptarse a ese país. Lo que se sugiere que los cánceres humanos podrían derivarse del estilo de vida, dieta y factores ambientales.¹²

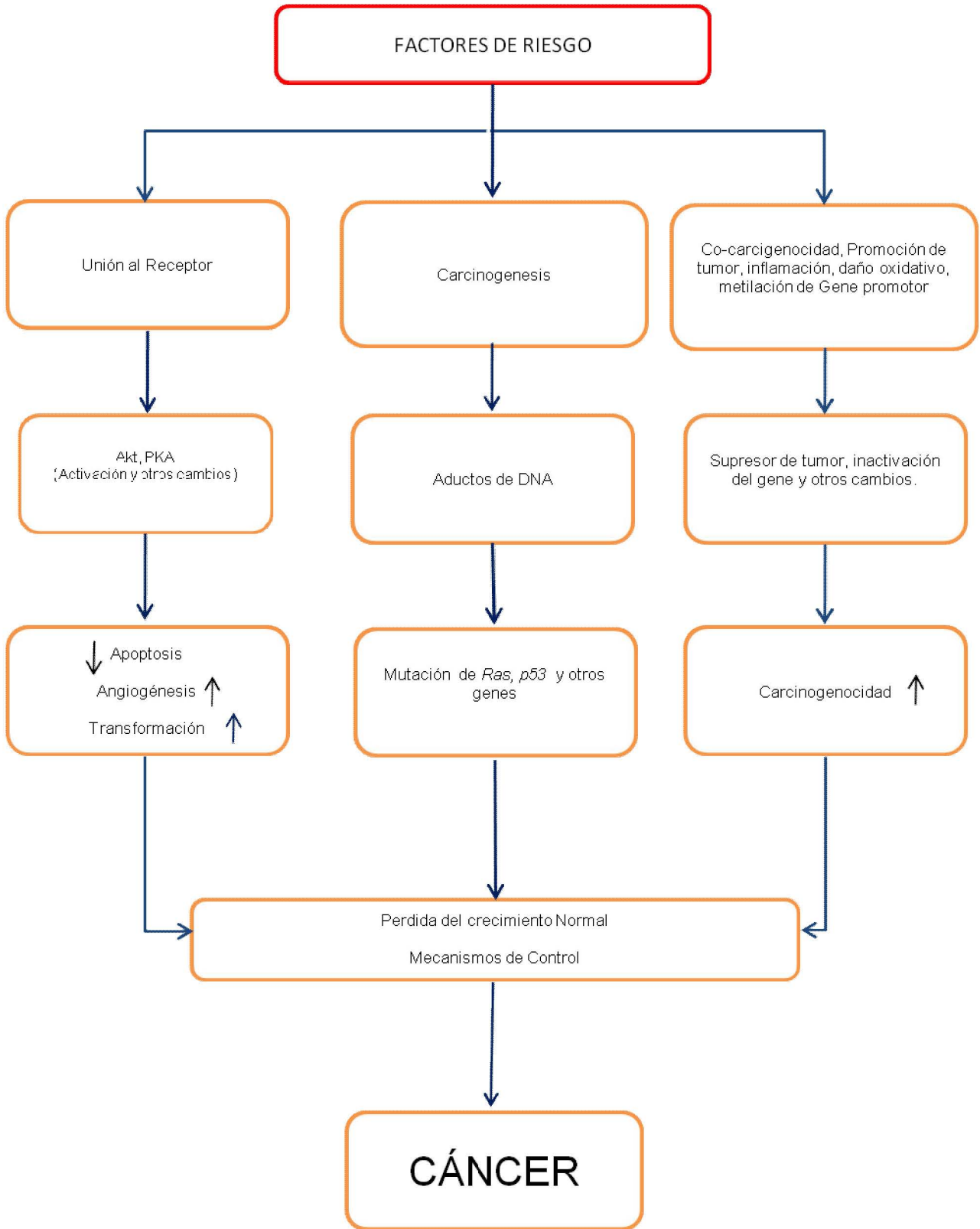


Figura II.1 Principales factores de riesgo y eventos para la transformación celular ¹²

Cáncer cérvicouterino (CaCu)

Perspectiva del cáncer cérvicouterino como problema de salud pública.

Cada año se diagnostican más de 500,000 nuevos casos por CaCu en el mundo. De acuerdo con estudios epidemiológicos a nivel mundial una mujer muere cada dos minutos por cáncer cérvicouterino y en México es la segunda causa de muerte con aproximadamente 6000 decesos anuales lo que representa que una mujer muera cada 2 horas por este tipo de cáncer. En América Latina se reportan 68, 000 casos al año, las tasas más altas corresponden a Chile y México y las más bajas a Cuba, Puerto Rico y Argentina.^{7, 8,9} El grupo más afectado es el de 35 a 64 años de edad lo que representa un sector productivo del país y representa la segunda causa de mortalidad en mujeres.¹³ En la Figura II.2 se observa la variación de las tasas de mortalidad por cáncer cérvicouterino en México.^{13,14}

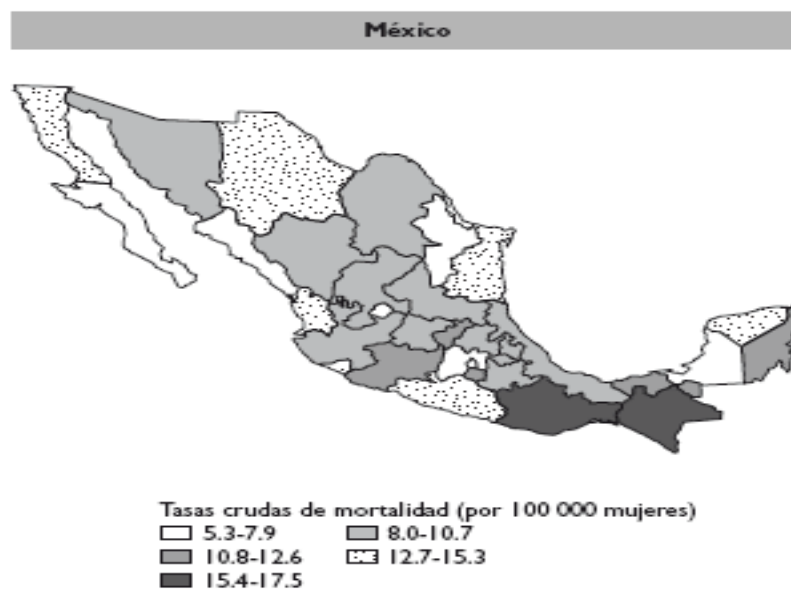


Figura II.2. Variación de las tasas de mortalidad por CaCu en México 2010.¹³

El (CaCu) es una mutación en la unión escamocolumnar en el epitelio del cuello uterino; aproximadamente el 90% de los casos es carcinoma de células escamosas. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), clasificada en grados 1, 2,3 de lenta y progresiva evolución, se refiere a células pre-cancerosas que se encuentran en el cuello uterino y entre mayor sea el grado mayor es la probabilidad de progresión de que las células anormales se conviertan en

células cancerosas. En la figura II.3 se observa las Etapas de evolución en el desarrollo de CaCu.

Etapas de evolución de CaCu

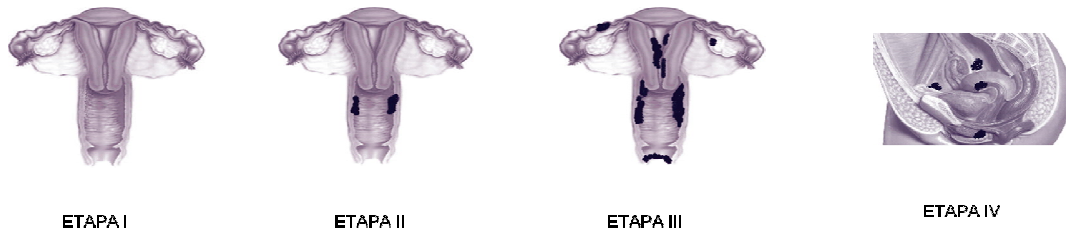


Figura II.3. Etapas presentes en el desarrollo de CaCu

Las etapas presentes en la evolución del cáncer son:

Etapa 0: carcinoma *in situ* es un cáncer en su etapa inicial. Las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden los tejidos más profundos del mismo. Después se produce una mutación incipiente del estroma.

Etapa IA: una cantidad muy pequeña de cáncer que sólo es visible a través del microscopio se encuentra en el tejido más profundo del cuello uterino

Etapa IB: una cantidad mayor de cáncer se encuentra en el tejido del cuello uterino

Etapa II: El cáncer se ha diseminado a regiones cercanas, pero aún se encuentra en la región pélvica.

Etapa IIA: El cáncer se ha diseminado fuera del cuello uterino a los dos tercios superiores de la vagina.

Etapa IIB: el cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

Etapa III: el cáncer se ha extendido a toda la región pélvica.

Etapa IV: el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Etapa IVA: el cáncer se ha diseminado a la vejiga o al recto (órganos cerca al cuello uterino).

Etapa IVB: el cáncer se ha diseminado a órganos distales como los pulmones.

Principales factores para el desarrollo de CaCu

Existen diversos factores de riesgo de los cuales podemos mencionar algunos de ellos: factores virales (el principal factor etiológico es el Virus del Papiloma Humano (VPH)), factores del hospedero (como situación socioeconómica), estado de inmunidad, factores celulares (como coinfecciones (VIH), infecciones venéreas recurrentes no tratadas), el hábito de fumar, el uso de anticonceptivos hormonales, múltiples parejas sexuales, multiparidad, inicio de la vida sexual a temprana edad.¹⁴⁻¹⁶

El VPH es transmitido sexualmente, y provoca una de las infecciones más comunes en ambos sexos, siendo el principal factor etiológico para evolucionar a CaCu. La prevalencia de la infección por VPH se caracteriza en América Latina por un primer pico cercano a 25-30% antes de los 25 años, representando infecciones recientes. Esta prevalencia decrece con la edad pero en varios estudios en esta región se ha observado un segundo pico en mayores de 55 años, lo cual podría ser explicado por el comportamiento sexual de las mujeres o de sus compañeros, un efecto de cohorte o la reactivación de infecciones latentes. La mayoría de las infecciones por VPH prevalentes en una población desaparecen en los siguientes tres años.^{13, 14}

Infecciones con VPH

Los *papilomavirus* son agentes infecciosos transmitidos sexualmente, con más de 100 genotipos identificados hasta ahora los cuales están asociados con diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentran el cervical, el de cabeza y de cuello entre otros. Los genotipos virales están divididos en dos categorías: de bajo y de alto riesgo, basado en el espectro de lesión que inducen. Los de bajo riesgo inducen únicamente verrugas genitales benignas e incluyen el VPH 6 y 11. El grupo de alto riesgo VPH 16, 18, 31, 33,35, 39 45 52, 56, 58,59 y 68. Siendo los genotipos 16 y 18 los más agresivos, con desarrollo de lesiones más tempranas y mucho mayor riesgo que otros tipos oncogénicos, están asociados al desarrollo de cáncer anogenital, y pueden ser detectados en el 99% de casos de cáncer cervical invasor a nivel mundial, con pocas variaciones regionales. En la Figura II.4 se muestra la estructura del VPH-16

con todas las proteínas oncogénicas que se expresan como las L (tardías) y las E (tempranas).^{13, 14}

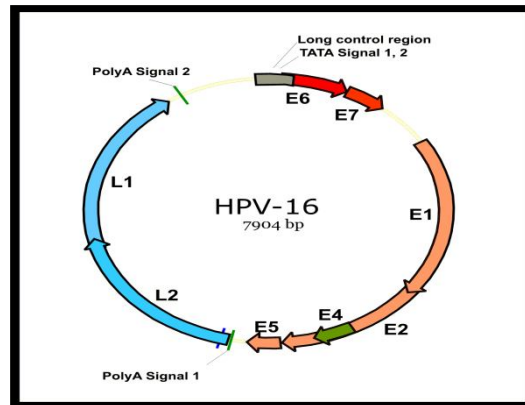


Figura II.4. Estructura del VPH -16 asociado con el desarrollo de cáncer.

El genoma de los VPH de más alto riesgo codifica para dos oncoproteínas de expresión temprana E6 y E7 respectivamente, (como se observan en la figura II.4) que inactivan a genes de supresión tumoral (pRb y p53) llevando a la célula nuevamente a la fase S del ciclo celular. Otros muchos tipos, se asocian también a neoplasia intraepitelial cervical (NIC).^{10,11} La oncoproteína E7, un producto del VPH-16, se une al gen supresor tumoral Rb, inactivándolo, y a la oncoproteína E6 del VPH-18 que tiene una secuencia de aminoácidos homóloga al antígeno T grande SV40 y capacidad para unirse al gen supresor tumoral p53 e inactivarlo. Las oncoproteínas E6 y E7 son necesarias y suficientes como para causar la transformación celular *in vitro*. Estos fenómenos de unión e inactivación pueden explicar los efectos cancerígenos de los virus.^{10, 13,14}

Aunque la infección del epitelio genital por los tipos oncogénicos del VPH sea considerado como el factor de riesgo principal para el cáncer cérvicouterino, es claro que el tumor es el resultado de la acumulación de mutaciones en genes que controlan la muerte celular (apoptosis) y los mecanismos de regulación para la supervivencia.¹⁶

Desarrollo de las líneas celulares CALO e INBL

Debido a la limitada disponibilidad de modelos apropiados y a que se desconocían aspectos relevantes acerca del carcinoma de cérvix. En la Unidad de Investigación y Diferenciación Celular y Cáncer de entre 60 diferentes muestras de carcinoma cervical, se establecieron dos líneas celulares provenientes de pacientes mexicanas diagnosticadas con carcinoma cervical epidermoide compuestas de células largas no queratinizadas metastásicas (INBL, tipo IVA) y tumores no metastásicos (CALO, tipo IIB). Ambas pacientes no recibieron tratamiento al momento de la extracción del tumor. Las biopsias fueron obtenidas y tratadas de acuerdo con las guías de Instituto Nacional de Cancerología. Posteriormente se demostró que ambas líneas expresan las tres subunidades del receptor IL-2. (17) También se ha demostrado que estas líneas reproducen el patrón de c-Kit (ligando) / SF (receptor, Steam Cell Factor) observadas en muestras de tumor primario. Usando una estrategia antisentido con oligonucleótidos modificados con fosforotionato dirigidos contra SF, se proporcionó una evidencia directa para el papel de mSF y c-Kit en la interacción y la supervivencia celular en estas líneas celulares tumorales.^{17, 18}

Transducción de Señales

Dentro de los sistemas y mecanismos desarrollados por los organismos para llevar a cabo la comunicación y transmisión de información, se encuentra el que se realiza a través de moléculas cuyo objetivo final es producir cambios en el metabolismo acordes al estímulo que desencadenó tal respuesta; tales sistemas celulares de producción y reconocimiento de una señal extracelular son los llamados sistemas de transducción de señales; la molécula de señalización actúa como ligando (aminoácidos, proteínas, nucleótidos, esteroides, derivados de ácidos grasos y gases), el cual se une a un sitio extracelular estructuralmente complementario. La unión del ligando con su receptor causa un cambio conformacional en el dominio citosólico o en los dominios del receptor lo que induce a una respuesta celular. Dicho proceso es un conjunto de procesos o etapas bioquímicas que ocurren de forma concatenada dentro de una célula y convierte una determinada señal o estímulo exterior, en otra señal o respuesta específica, se lleva a cabo a través de enzimas unidas a otras moléculas denominados segundos mensajeros. En

muchos procesos de transducción de señales se implican cada vez más un número creciente de enzimas y segundos mensajeros desde el inicio del estímulo, el cual parte desde la adhesión de un ligando al receptor de membrana, hasta la activación en el receptor, que convierte el estímulo en respuesta, la cual dentro de la célula, provoca una cadena de pasos (cascada de señalización o ruta del segundo mensajero) cuyo resultado es la ampliación de la señal, es decir, que un pequeño estímulo provoca una gran respuesta celular. Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción incluyen la regulación de la expresión genes cuyos productos son enzimas, factores de transcripción u otras proteínas reguladoras de la actividad metabólica, la regulación de una vía metabólica (producción de energía) y la locomoción celular por medio de cambios en el citoesqueleto.^{3, 5,19}

La comunicación por señales extracelulares usualmente involucran los siguientes pasos: síntesis, liberación de la molécula de señalización, transporte de la señal a la célula blanco, unión del ligando al receptor específico que conduce a su activación; iniciación de una o más vías de transducción de señales intracelulares activadas por el receptor, cambios específicos en funciones, metabolismo o desarrollo celular y la eliminación de la señal la cual termina con la respuesta celular. La gran mayoría de receptores son activados por la unión de moléculas secretadas o unidos a la membrana (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y feromonas). Algunos receptores, sin embargo; son activados por cambios en la concentración de un metabolito (oxígeno o nutrientes) o por estímulos físicos (luz, calor etc.).

En animales, la señalización por moléculas solubles extracelulares pueden ser clasificadas dentro de tres tipos: endocrina, paracrina y autocrina y estos criterios están basados en la distancia sobre la cual van a dirigir la señal.

- **Endocrina:** las moléculas de señalización son conocidas como hormonas, y actúan sobre células diana distantes de su lugar de síntesis, en animales estas hormonas circulan en el torrente sanguíneo o por otros fluidos del sitio de donde son liberados.¹⁹
- **Paracrina:** las moléculas de señalización liberadas por la célula sólo afecta a células diana cercanas como por ejemplo: la conducción por un neurotransmisor de una señal de una célula nerviosa a otra ó de una célula nerviosa a una célula muscular se produce a través de

señalización paracrina; muchos factores de crecimiento que regulan el desarrollo en los organismos multicelulares también actúan a corta distancia.¹⁹

- **Autocrina:** las células responden a sustancias que ellas mismas liberan, por ejemplo; las células cultivadas a menudo secretan factores de crecimiento que estimulan a su propio crecimiento y proliferación. Este tipo de señalización es particularmente común en tumores celulares, muchos de los cuales sobreproducen y liberan factores de crecimiento que estimulan una proliferación inadecuada, no regulada de sí mismos así como las células no tumorales adyacentes, lo que puede conducir a la formación de masa tumoral.¹⁹

Los receptores celulares presentan en su estructura dos regiones o dominios funcionales bien diferenciados, uno de reconocimiento o detección de estímulos, que presenta una diversidad paralela a la de los estímulos, y otro dominio efector que pertenece a unos pocos tipos fundamentales, por lo que la secuencia de eventos que son capaces de iniciar es limitada. En la Figura II.5 se pueden observar dos moléculas de señalización localizadas en la membrana citoplásmica y las vías que pueden tener funciones como genes reguladores de proteínas.¹⁹

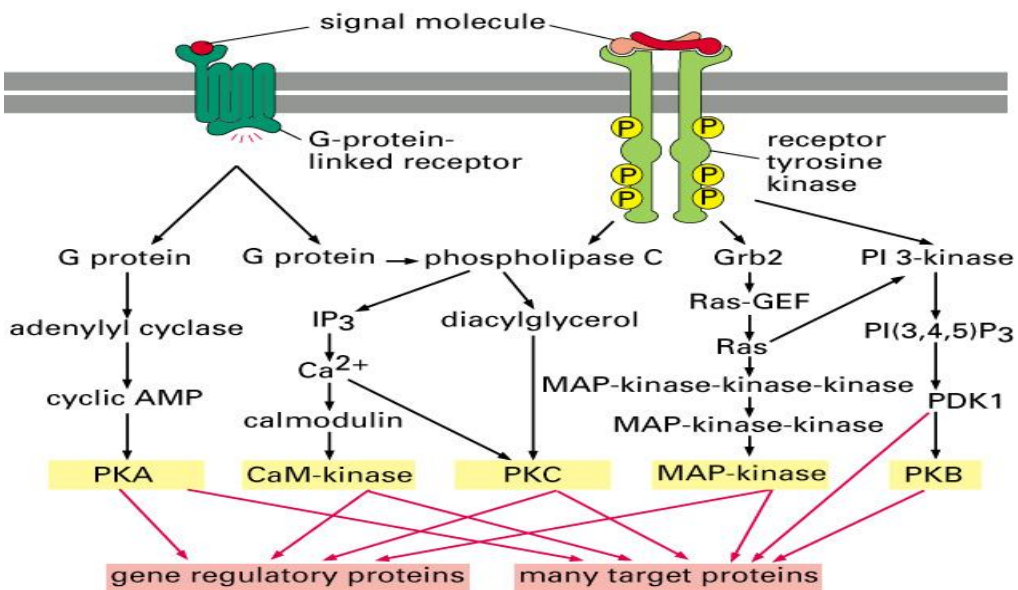


Figura II. 5. Adaptado de Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Principales receptores utilizados en la transducción de señales y sus funciones biológicas

En general, los receptores son glicoproteínas ancladas o unidas en la membrana citoplasmática que interaccionan con un ligando, la mayoría tienen un carácter constitutivo y son inducidos o reprimidos por diferentes estímulos durante sus etapas de proliferación y diferenciación. En la Tabla I.1 se describen los tipos de receptores y sus características principales.¹⁹

Tabla II.1. ¹⁹ Principales receptores utilizados en transducción de señales y sus funciones biológicas.

RECEPTOR	CARACTERISTICA
<i>Receptor acoplado a proteína G (GPCR)</i>	<p>Vinculado a una proteína G trimérica modulan la actividad de adenilciclase, producción de cAMP como segundo mensajero.</p> <p>Activan a la fosfolipasa C (PLC) y que lleva a cabo la hidrólisis de los polifosfoinositoles (PIP₂)</p> <p>Activan fosfodiesterasa que lleva a una disminución en los niveles de cGMP</p>
<i>Citocina (PTK)</i>	<p>Activación citosólica de los factores de transcripción STAT por fosforilación.</p> <p>Son responsables de fosforilar una variedad de proteínas en sus residuos de la tirosina después de activar señales de proliferación y crecimiento.</p> <p>Proteína de transformación en el sarcoma de Rous (SRC) y la cinasa Janus (JAK).</p>

<p><i>Con actividad de tirosina cinasa</i> (RTKs)</p>	<p>Contienen 4 dominios importantes: un dominio extracelular que se une al ligando, un dominio intracelular tirosina cinasa, un dominio intracelular regulatorio, un dominio transmembranal. Sus dominios de tirosina cinasa son muy conservadas con relación a las regiones de unión al ATP y de unión al sustrato de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA)</p> <p>Se clasifican de acuerdo a sus características estructurales en sus porciones extracelulares.</p> <p>Dominio citosólico con actividad de tirosina cinasa que transloca al núcleo y activa factores de transcripción por fosforilación.</p>
<p><i>Con actividad de cinasa de serina/treonina</i> (RSTK)</p> <p><i>TGF-β</i></p>	<p>Dominio Citosólico con actividad de serina/treonina</p> <p>Activa factores de transcripción Smad</p> <p>Induce y/o inhibe la proliferación o diferenciación celular, regula la migración, adherencia de varios tipos de células</p>
<p><i>No serina/treonina</i></p>	<p>Proteincinasa dependiente de cAMP(PKA) ,la proteincinasa C (PKC) y las proteincinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas)</p>

Las células normales proliferan en respuesta a una serie señales externas, la mayoría producidas de manera local, estas señales externas son factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), diversas interleucinas (IL-2, IL-6, etc.) entre otros. Estos factores de crecimiento ejercen sus acciones proliferativas después de unirse a un receptor apropiado e inducen a cascadas de respuesta,

las cuales involucran eventos de fosforilación. Las células tumorales han encontrado mecanismos para activar estas señales de proliferación de manera constante, estos mecanismos difieren de cáncer a cáncer, dependiendo del tipo celular, e incluso puede cambiar dentro del mismo tumor, pero el resultado es el mismo, una constante estimulación mitogénica.^{3, 4}

En células cancerosas, los elementos de las vías de transducción de señales a menudo están mutados o son sobreexpresadas en comparación con células normales.³

Citocinas

Las citocinas son glicoproteínas o péptidos que son sintetizadas y secretadas rápidamente por los diferentes tipos celulares de la inmunidad innata y adaptativa. Tienen pesos moleculares que van desde 5000-70 000 daltones (Da). Ellas actúan como mediadores de señalización y como son esenciales en reacciones inflamatorias e infecciosas, pueden tener función local, sin embargo las de importancia clínica tienen su función a nivel sistémico como factores pleiotrópicos.^{20, 21}

En la inmunidad natural, los efectores de citocinas son producidas en su mayoría por fagocitos mononucleares y son comúnmente llamados monocinas. Muchas citocinas en inmunidad específica son producidas por la activación de células T; estas moléculas son denominadas comúnmente linfocinas. Las células T producen muchas citocinas que principalmente sirven para regular el crecimiento y la diferenciación de distintos tipos de linfocitos los cuales juegan un papel importante en fases de activación. Otras citocinas derivadas de las células T tienen como función activar y regular células de respuesta inflamatoria, como los fagocitos, neutrófilos y eosinófilos. Estas citocinas derivadas de las células T son moléculas activadoras de la respuesta inmune y también son responsables de la comunicación entre células de respuesta inmune y sistemas inflamatorios.^{20, 21}

Propiedades generales:

Las citocinas son un grupo de proteínas y comparten algunas propiedades:

1. Son producidas durante fases efectoras e inmunidad específica y sirve como mediadores y reguladores de la respuesta inmune y respuestas inflamatorias.
2. La secreción de citocinas es breve y autolimitada
3. Algunas citocinas pueden ser producidas por diversos tipos celulares
4. Actúan sobre diversos tipos celulares esto es denominado pleotropismo
5. Las citocinas frecuentemente tienen diferentes efectos sobre la misma célula.
6. Frecuentemente una citocina influye en la síntesis de otra citocina
7. Las citocinas tienen influencia sobre la acción de otra citocina
8. Las citocinas así como otras hormonas inician su acción por la unión con receptores específicos de la superficie celular
9. La expresión de los receptores de citocinas es regulado por señales específicas.
10. Muchas respuestas celulares para las citocinas requieren un nuevo mRNA y síntesis de proteínas
11. Para muchas células blanco, las citocinas actúan como reguladores de la división celular.

De acuerdo a su función están organizadas en tres categorías: mediadores y reguladores de la inmunidad innata, mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa y estimuladores de la hematopoyesis. Esta clasificación es basada en su principal acción biológica particular de la citocina, Aunque muchas de estas pueden estar en más de una categoría.^{20, 22}

Las citocinas regulan la activación, crecimiento y diferenciación de linfocitos, además median la activación de la respuesta específica inmune. Muchas de estas citocinas son producidas por células T.²⁰ En general, las citocinas de la inmunidad adaptativa e innata son producidas por diferentes poblaciones de células y actúan sobre diferentes células blanco. Sin embargo estas distinciones no son absolutas porque la misma citocina puede producirse durante reacciones de inmunidad innata o adaptativa.²²

INTERLEUCINA-2

La interleucina-2 (IL-2) originalmente llamada factor de crecimiento de células T (TCGF). Es una glicoproteína de 14-17 KDa localizada en el cromosoma 4, es la principal citocina responsable por la progresión de linfocitos T, desde la fase G hasta la fase S del ciclo celular. Es transcrita, sintetizada y secretada por los linfocitos CD4+ (linfocitos cooperadores) y en menor cantidad por los linfocitos CD8+ (linfocito citotóxico), actúa de forma autocrina y sólo es activada por antígenos que reconocen al receptor. La IL-2 presenta un pico temprano de secreción después de unas 4 horas hasta 12 horas después de la activación del linfocito.²⁰⁻²³

El tamaño heterogéneo de la proteína madura es debido a la variable glicosilación de aproximadamente 130 residuos de aminoácidos. Estudios estructurales demuestran que la IL-2 se pliega en una proteína globular que contiene dos conjuntos de pares de α -hélices anfipáticas orientadas de manera antiparalela con cada hoja en un ligero ángulo respecto a la otra lo que hace un núcleo hidrofóbico más estable. Este plegamiento α -helicoidal es común a todas las citocinas que interactúan con los receptores con la secuencia WSXWS, incluyendo IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF y G-CSF.^{20, 24, 25} Un enlace disulfuro entre los aminoácidos 58 y 105 es esencial para la estabilidad de la estructura terciaria y para la actividad biológica de la IL-2.²⁵

Acciones biológicas de IL-2

La IL-2 fue originalmente descrita como un factor de crecimiento de células T, esto basado en estudios *in vitro*, pero recientes estudios indican otras acciones *in vivo*.

- La IL-2 es requerida para la sobrevivencia y para funciones regulatorias en células. La expresión constitutiva de los receptores de IL-2 para regular las células T es consistente con sus necesidades para sobrevivir.²²

1. La interleucina-2 es el mayor factor de crecimiento de células T y la cantidad de IL-2 sintetizada por células activadas por linfocitos T CD4⁺ es un determinante importante de la magnitud de las respuestas inmunes dependientes de células T. La IL-2 también estimula la síntesis de otras citocinas derivadas de células T, como Interferón gamma (IFN- γ) y la

linfotóxina (LT). La disminución en la síntesis de cantidades adecuadas de IL-2 ha sido descrito como una causa de anergia de células T antígeno-específico. La acción de IL-2 en células T es mediada por el receptor de IL-2, este es probablemente el sistema mejor entendido de todos los receptores de citocinas.

2. La IL-2 estimula el crecimiento de las células NK (células natural killer) y mejora su función citolítica, produciendo a las células efectoras citotóxicas LAK (lymphokine-activated killer cells). Las células NK muestran cierto parecido a las células T en reposo, expresan IL-2R $\beta\gamma$ y pueden ser estimuladas por los altos niveles de IL-2. Las células NK, sin embargo no expresan IL-2R α y por lo tanto no reducen sus exigencias de IL-2, incluso después de la activación. Por tanto, sólo las altas concentraciones de IL-2 darán lugar a la formación de células LAK. La IL-2 sinergiza con otras citocinas, sobre todo IL-12, para inducir la secreción de INF- γ por las células NK.

3. La IL-2 actúa sobre las células B tanto como un factor de crecimiento y como estimulador de síntesis de anticuerpos; no parece causar el cambio de isotipo.^{20,21}

RECEPTOR de IL-2

La interacción de la IL-2 con su receptor (IL-2R) inicia con una compleja cascada de eventos de señalización. El receptor de alta afinidad del IL-2R está compuesto por tres diferentes subunidades las cuales se asocian en la superficie celular por enlaces no covalentes para formar un complejo funcional, estas subunidades no presentan actividad enzimática intrínseca, más bien actúan como plataformas para la asociación de otras moléculas que funcionan como transductoras de señales, tal como las proteínas tirosina cinasas (PTKs) de la familia JAK.^{20,21}

La primera subunidad, identificada como **IL-2R α (Tac)** es una glicoproteína de 55KDa, esta aparece en células T activadas, es capaz de unirse con baja afinidad, aproximadamente Kd=10nM. La unión de IL-2 a células que sólo expresan la IL-2R α no tiene ninguna respuesta biológica. Los 219 aa terminales forman un dominio extracelular. Este dominio contiene dos sitios potenciales de N-glicosilación y múltiples sitios posibles uniones a carbohidratos. Los residuos de cisteína identificados participan en la formación de enlaces disulfuro requeridos para la unión con IL-2. Un segundo dominio

contiene una región hidrofóbica simple próxima al carboxilo terminal de 19 aa, la cual es una región transmembranal. El tercer y último dominio es una región citoplasmática muy corta de 13 aa cargados positivamente. Los sitios potenciales aceptores de fosfato (serina, treonina, pero no tirosina) están presentes en el dominio intracitoplasmático. El gen que codifica para la subunidad IL-2R α consiste en 8 exones y 7 intrones empalmados en una distancia mínima de 24Kb.^{20, 21}

La segunda subunidad es **IL-2R β (p70 ò p75)**. La estructura de este componente fue confirmada a través de la expresión clonal de ADN para el IL-2R β humano, utilizando anticuerpos monoclonales contra esta proteína. Es miembro de la familia de receptores de citocinas de clase I, la cual se caracteriza por la secuencia WSXWS o región WS en el dominio extracelular. El gen consta de 10 exones y 9 intrones empalmados en 24 Kb en el cromosoma 22q. La región WS es importante para la unión del ligando y la transducción de señal. La porción citoplasmática del IL-2R β es más grande que la del IL-2R α , pero ésta no contiene ningún dominio aparente de cinasa. Posee una región rica en prolina (24/286) y en residuos de serina (30/286), y ésta es notablemente inclinada y torcida por los aminoácidos cargados negativamente; esta región contiene 40 aa cargados negativamente (ácido glutámico y aspártico), y solamente 18 aa cargados positivamente (lisina y arginina). La región citoplasmática de IL-2R β se puede dividir en tres subregiones basadas en su composición de aa. Estas subregiones se han designado: como la “región rica en serina”, “región ácida” y “región rica en prolina”.^{20,21}

Al hacer ensayos de co-inmunoprecipitación para la subunidad IL-2R β , se descubrió una molécula de 64kDa, la cual correlacionó bien con el nivel de afinidad intermedio de los sitios de unión para IL-2, lo que sugirió la posibilidad de que esta molécula era la tercera subunidad de la IL-2. Con base en la secuencia de aa, se aisló el clon completo de ADN que codificó una molécula de 64 KDa, que demostró ser el tercer componente de IL-2R conocido como cadena γ (IL-2R γ) del receptor para IL-2. La forma madura de la cadena p64, consiste de 347 residuos de aa con una secuencia típica que lo incluye en la familia de receptores de clase I, al igual que la cadena β . El dominio extracelular contiene 86 residuos de aa, presenta un dominio SH2 intracelular,

que es homólogo a los dos subdominios de la región SH2 (de las inglés Src Homology 2) compuesta de 5 subdominios conservados.²⁰

La subunidad γ (**IL-2R γ**) está involucrada en la formación de los receptores de IL-2 de afinidad alta e intermedia. El IL-2R γ (p64) se puede co-precipitar con el IL-2R β en presencia de IL-2 en células linfoides produciendo IL-2R de alta afinidad. La proteína posee 22 aa en el extremo amino terminal y con 347 aa conforma la proteína madura. En esta cadena, las regiones de los aminoácidos 239, 29 y 86 constituyen la longitud extracelular que atraviesa la membrana y la región citoplasmática respectivamente. La región citoplasmática de IL-2R γ es considerablemente más corta que el IL-2R β . El dominio extracelular de IL-2R γ contiene importantes regiones que se conservan en otros receptores de citocinas, lo que indica que el IL-2R γ pertenece a la familia de receptores hematopoyéticos de clase I.²¹

El papel crítico de la IL-2R γ en la señalización por IL-2 se ha estudiado ampliamente. Primero, se ha mostrado que una línea mutante de células T, la cual ha perdido la capacidad de expresar IL-2R γ , pero que retiene a la IL-2R α y a IL-2R β , pierden la habilidad de responder a IL-2. Segundo, se ha encontrado que un ratón mutante en el que la IL-2 se une a IL-2R α y a IL-2R β , pero no a IL-2R γ , falla en la transmisión de las señales proliferativas. El papel crítico de la región citoplasmática de IL-2R γ se hace evidente, cuando se ha perdido la mayor parte del dominio citoplásmico, esta situación inhibe la habilidad del IL-2R para transmitir las señales proliferativas de las células BAF-B03.²⁰

Estas observaciones se han interpretado en el sentido de que IL-2R α forma un complejo con IL-2 $\beta\gamma$ incrementando la afinidad del receptor de IL-2R $\beta\gamma$ para IL-2 lo que permite que una señal de crecimiento requiera una menor concentración de IL-2. Se cree que la IL-2 se une primero con rapidez a IL-2R α , y esto facilita la asociación con la IL-2R $\beta\gamma$. La IL-2 puede incrementar la síntesis de IL-2R α . Aunque se sabe mucho acerca de la interacción de IL-2 con su receptor, las señales intracelulares producidas no han sido identificadas en su totalidad.²⁰

La unión de la IL-2 induce la estructura terciaria correcta del receptor de alta afinidad (IL-2R). Las diferencias en la afinidad del receptor pueden ser un elemento temporal para señalización que influye en la fuerza, calidad y la duración de la transducción de la señal. Por ejemplo, se induce la expresión de la subunidad α en los linfocitos T, con la participación del TCR (receptor de célula T), lo que conduce a un aumento en la sensibilidad de la célula a IL-2 y un aumento correspondiente a la solidez de la respuesta inmune.²⁰

La IL-2 tiene un papel importante en la protección de los linfocitos T para evitar la muerte celular por inducción de mecanismos anti-apoptóticos.²⁰ En la figura II.6 se puede observar al Receptor de IL-2 compuesto de 3 subunidades IL-2R α (única para el IL-2R), IL-2R β (presente también en IL-15R15) e IL-2R γ (presente en IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R).²³

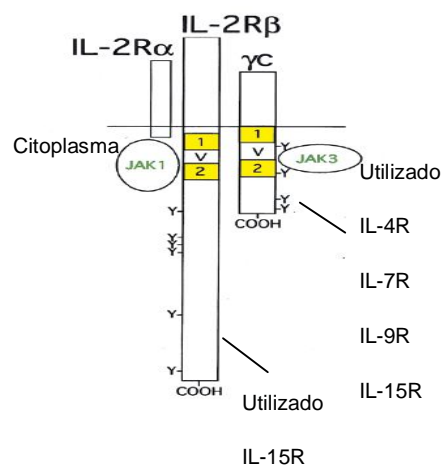


Figura II.6. Diagrama del complejo de IL-2R²³

CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE IL-2

La interacción de la IL-2 con su receptor induce la heterodimerización de sus componentes y posteriormente la transfosforilación y activación de las cinasas JAK. La activación de IL-2R se asocia a la activación de proteínas tirosina cinasa intracelulares, entre ellas las cinasas Janus (JAK1) y (JAK3) las cuales se unen de manera no covalente y cuyos sustratos primarios son los miembros de la familia STAT. Una vez activadas las JAK son capaces de fosforilar el residuo de tirosina en el receptor de alta afinidad (IL-2R β , p75

creando sitios de unión para los dominios SH2 de los transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STATs). Posteriormente las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que ellas a su vez sean fosforiladas por las cinasas JAK. Las STATs después de ser fosforiladas forman dímeros, se translocan al núcleo y estimulan la expresión de los genes inducibles por citocinas, lo cual se asocia con la inducción de proliferación.^{21,24} Otra cinasa que se ha involucrado en la transducción de señales inducida por IL-2 es Lck, la cual se une a la cadena β , y es capaz de transducir señales antiapoptóticas.²⁶

Lck

Características principales de la proteína Lck

Lck (o proteína tirosina cinasa específica de leucocitos) es una proteína de 56 KDa, miembro de la familia Src de tirosina cinasas. Lck se encuentra en mayor proporción en la membrana plasmática de células especializadas del sistema inmune llamados linfocitos T. Lck es esencial para el desarrollo normal de las células T y su activación.^{28, 29}

Lck está expresada predominantemente en células T y sobreexpresada y/o activada de manera aberrante en cánceres de tipo epitelial y no epitelial. Su activación es muy común en cáncer de colon y de mama y es menos frecuente en melanomas o en tumores de ovario, gástrico, cabeza y cuello, pancreático, de pulmón o de la sangre. No se ha reportado a la fecha la relación entre el cáncer de cérvix, sobre-expresión o activación de la cinasa Lck. El grado de incremento de actividad de las cinasas Src a menudo se relaciona con el potencial maligno del tumor y la sobrevida del paciente. Aún se desconoce como las cinasas de la familia Src contribuyen con el proceso de transformación maligna, sin embargo, parecen ser importantes en múltiples aspectos de la progresión del tumor incluyendo la proliferación, disrupción del contacto célula/célula, migración, invasividad, resistencia a apoptosis y angiogénesis.¹⁷ CD4 y CD8 son moléculas específicas de células T, son proteínas transmembranales que interactúan con el receptor de células T (TCR), y que se unen específicamente a regiones invariables del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); MHC de clase II se une a CD4, restringiendo a la célula a desarrollar un programa de genética para convertirse

en células auxiliares, mientras que las células que expresan MHC de clase I se unen a CD8, restringido a desarrollar un programa para la función citotóxica.²⁸

Estructura de Lck



Figura II.7. Estructura de la cinasa Lck. El dominio SH2 de Lck humano coloreado de azul (N-terminal) a rojo (C-terminal)²⁷

La estructura de Lck es típica de los miembros de la familia Src cinasa; sin embargo vale la pena destacar algunas características clave, en primer lugar la estructura de la proteína, que no sólo tiene la función enzimática de tirosina cinasa, sino que también funciona como proteína adaptadora y con esto facilita el anclaje de complejos macromoleculares. En la Figura II.8 se observan los dominios de la cinasa.

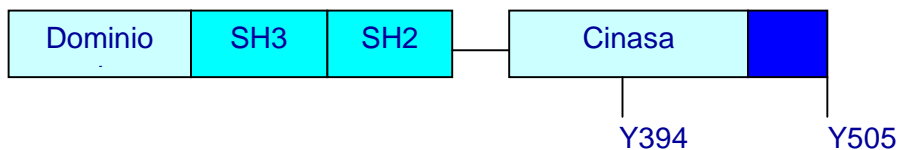


Figura II.8. Los dominios de la cinasa Lck, SH2 dominio de homología Src 2 y SH3 dominio de homología Src 3y sitios de fosforilación²⁹

La cola N-terminal de la Lck tiene características únicas para la adición de ácidos grasos saturados (ácido mirístico y ácido palmítico) lo cual ancla la proteína a la membrana plasmática de la célula y es importante para la señalización de células T. La proteína contiene además un dominio SH3, un dominio SH2 (involucrados en la regulación intramolecular e intermolecular) y un dominio único que contiene un motivo de dicisteína que une su

correspondiente dominio citoplásmico con sus coreceptores CD4 y CD8. En las Figuras II.7 y II.8 se observan las características de la estructura de la proteína y los principales sitios de anclaje con los complejos macromoleculares. Los principales sitios de fosforilación de Lck son las tirosinas 394 y 505. El primero es un sitio de autofosforilación y está vinculado a la activación de la proteína. El segundo es fosforilado por Csk que inhibe a Lck porque la proteína se pliega y se une a su propio dominio SH2. Lck sirve así como ejemplo de que la fosforilación de proteínas puede tener como consecuencia tanto la activación como la inhibición.²⁹

Actividad de Lck

La cinasa Lck muestra un aumento en su actividad después de la estimulación con IL-2 en células T y se puede mediar por la fosforilación de los residuos de tirosina junto con la subunidad de IL-2R β *in vitro*, específicamente en las posiciones 355, 358, 361, 292 y 510.²⁹

La actividad cinasa de Lck está regulada en dos niveles: uno involucra las interacciones con las secuencias ricas en prolina de los dominios –SH3 y –SH2 y fosforila los residuos de tirosina en la posición 394, en la proteína blanco, respectivamente resultando en cambios conformacionales que vuelven más accesible el dominio de la cinasa. El segundo nivel consiste en la defosforilación de la tirosina regulatoria 505 la cual es altamente conservada y se encuentra cerca del carboxilo terminal de la proteína, lo que implica que otros factores puedan asociarse con el IL-2R. Cuando la tirosina 505 (Tyr 505), se encuentra fosforilada esta interactúa con su propio dominio SH2 manteniendo cerrada la conformación y mantiene a la cinasa en estado inactivo, es decir, el sitio catalítico es inhibido, esta señal al parecer esta mediada por CD45. Cuando se sustituye por fenilalanina el residuo de la tirosina regulatoria en las proteínas, estas generalmente se mantienen activas; sin embargo se ha descrito como mutante irregular. El efecto mutado de la tirosina reguladora produce una hiperactividad en el fenotipo y como resultado la formación de un tumor *in vivo*.²⁹

El estado de la tirosina regulatoria se mantiene por un equilibrio entre la actividad de una cinasa Csk que puede fosforilarla, y por la fosfatasa

transmembranal CD45 que la desfosforila; siendo estas dos de importancia para la expresión y modulación de la actividad de Lck.²⁹

Las propiedades oncogénicas de Lck *in vivo* fueron vistas por primera vez en ratones transgénicos que sobreexpresaron Lck. En los seres humanos el gen de Lck está localizado frecuentemente en un sitio de anomalías cromosómicas asociadas con linfomas.²⁹

La actividad constitutiva de la cinasa Lck es oncogénica y transforma los fibroblastos en cultivo. Sin embargo, los mecanismos moleculares que asocian a Lck con la tumorigénesis aún no son completamente caracterizados.²⁹

Recientes estudios en los factores de transcripción en STAT han mostrado nuevos avances dentro de los mecanismos acerca de la oncogénesis. STAT es un factor de transcripción citoplasmática y estas proteínas pueden ser fosforiladas por un receptor con actividad intrínseca de tirosina cinasa o por cinasas citoplasmáticas que se unen a receptores sin actividad enzimática; estas cinasas fosforilan en un residuo de Tyr, el cual es altamente conservado. La tirosina fosforilada en STAT induce su dimerización a través de sus dominios SH2, una vez dimerizada se translocan al núcleo y se une específicamente con elementos del DNA, regulando la expresión de genes blanco. STAT5b es la primera proteína confirmada que pierde su función en pacientes con inmunodeficiencia, aunque esta no es esencial en la regulación de funciones fisiológicas, pero está implicada en la transformación maligna involucrada con oncogénesis mediada por Src. Lck tiene un papel importante en la activación de STAT5b en respuesta con la unión de receptor de células T.²⁸

Lck fosforila residuos en los motivos de activación inmunoreceptor en tirosinas (ITAM) en las colas citoplasmáticas de las cadenas TCR y subunidades CD3, iniciando la vía de señalización TCR/CD3. Además, contribuye a la señalización por moléculas de otro receptor. Asociados directamente con la cola citoplasmática de CD2, y sobre la participación de la molécula CD2, Lck se somete a hiperfosforilación y activación. También desempeña un papel en la vía de señalización del receptor de IL-2 que controla la respuesta proliferativa de células T. La unión de IL2 a su receptor resulta en aumento de la actividad de Lck. Se expresa en todas las etapas del desarrollo de los timocitos y es

necesario para la regulación de la maduración de los eventos que se rigen por las dos pre-TCR y TCR α β maduras.^{3,26}

Existen otras cinasas, JAK 1 y JAK3 que se asocian con el receptor de IL-2R. La actividad de JAK3 es central en la activación del receptor de IL-2 que conduce a la proliferación. Se ha demostrado que JAK1 y JAK3 activan a Lck mediante la fosforilación de residuos de tirosina dentro de las subunidades del receptor. Únicamente se requieren los residuos de tirosina dentro de la subunidad β para la proliferación.²⁶

Historia del desarrollo de terapias en contra del cáncer

A lo largo de la historia del cáncer, se han desarrollado terapias para su tratamiento; los cuales han sido de gran importancia, sin embargo, es a partir de los descubrimientos realizados durante y después de la segunda guerra mundial que el verdadero éxito clínico de la quimioterapia en contra del cáncer se ha producido.

Los primeros 5000 años

- Hipócrates 460-370aC establece que el cáncer se origina a partir de la bilis negra.
- 129-210 Galeno. Utilizó la palabra onkos “hinchazón” para describir los tumores.
- Siglo I- Dioscórides físico farmacólogo y botánico: recopiló una lista de hierbas medicinales y botánicas para el tratamiento de cáncer, uso un fármaco elaborada a partir de *Colchicum autumnale* (colchicina) para disolver tumores y crecimientos que no contenían pus.
- Durante el periodo medieval se utilizaron métodos tales como el uso de Cautivaciones, medicamentos herbales, pastas y transfusiones de sangre. Fueron siglos de estancamiento médico.
- Siglo XI (Baja Edad Media). Físico árabe (Avicena) el utilizó las anotaciones de Galeno y describe como el cáncer se incrementa progresivamente de tamaño y destruye tejidos continuos. Uso la terapia sistémica de arsénico. Describe al cáncer con la palabra “carcino” del griego cangrejo. Celsus traduce la palabra al latín moderno “cáncer”.

En la Figura II.9 se observan los sitios de acción de la quimioterapia tradicional, los tratamientos utilizados actúan directamente en la división celular incluyendo los tejidos normales. ^{31,32}

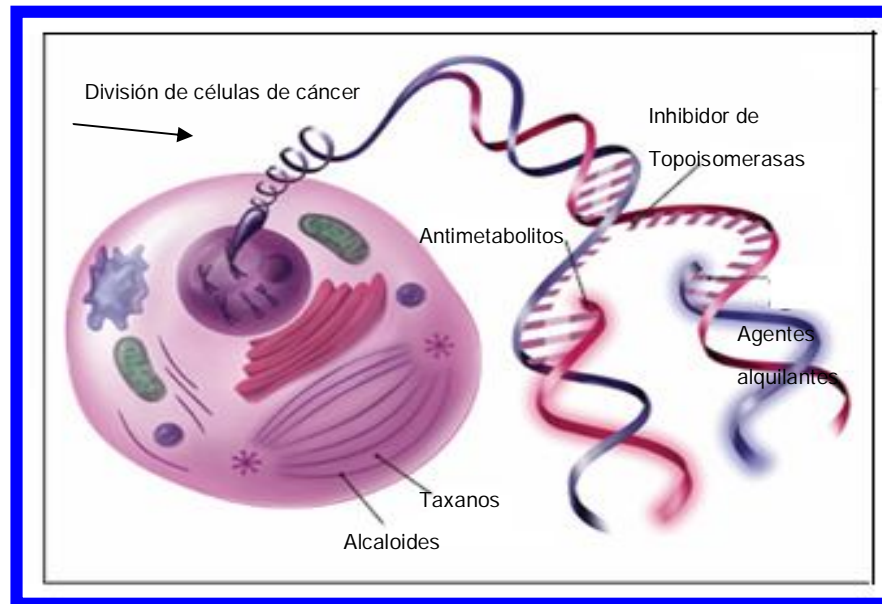


Figura II.9. Sitios de acción de los principales agentes quimioterapéuticos tradicionales.³⁴

Los últimos 200 años

La ciencia y la tecnología han avanzado enormemente a través de los siglos desde Hipócrates, Galeno, Dioscorides, Celsus y Avicena; los cuales marcaron la historia médica y en algún momento, la tecnología y las estrategias nuevas para el tratamiento del cáncer han reflejado el mundo contemporáneo científico y social.³²

Evolución de las terapias en contra del Cáncer

- **1740** –Rheims, Francia primer hospital para el cuidado de pacientes con cáncer.
- **1779**- Se cree que el cáncer es contagioso y los pacientes son llevados fuera de la ciudad para ser tratados en un nuevo hospital Saint Louis.

- **1796**-Thomas Fowler, preparó “solución de Fowler” la cual era una mezcla de trióxido de arsénico, bicarbonato y potasio que fue utilizada hasta 1930 para tratar un gran número de enfermedades.
- **1865**- Henrich Lissauer utilizó la solución de Fowler para tratar leucemia y años después linfoma. El uso de la terapia de arsénico como trióxido de arsénico, actualmente es un tratamiento efectivo para leucemia promielocítica.
- **1896**. Beatson observó el beneficio de la ooforectomía de tres pacientes con carcinoma, los mecanismos hormonales fueron asociados 50 años después cuando describió el rol de los andrógenos en el cáncer de próstata.
- **1902-1903**. Senn y Pusey reportan resultados de tratamientos con rayos “X” en leucemias y linfomas.
- **1908**. Paul Ehrlich introduce el término “quimioterapia y Balas mágicas” siendo el pionero en utilizar animales para ser pantalla de químicos y así tratar enfermedades. Es conocido como el padre de la quimioterapia.
- **1919**- El origen de quimioterapia efectiva fue utilizando mostaza sulfurada, a secuencia temporal para deprimir la médula ósea; el efecto se reveló dos semanas después de la exposición. La mortalidad fue atribuida a neumonía asociada con leucopenia. Las autopsias revelaron atrofia linfocítica y testicular.
- **1929**- Berenblum y Riley-Smith observaron en estudios de carcinogénesis que la mostaza sulfurada era “anti-carcinogénico” y también que inhibía tumores inducidos por otros carcinogénicos como dibenzantraceno.
- **1931**. Adair y Bagg aplicaron gas mostaza a diferentes dosis en piel normal y en tumores inducidos por un carcinógeno químico. Los tumores estudiados incluían melanomas carcinoma de células escamosas de piel, neurofibroma, sarcoma neurogénico y dos casos de carcinoma de pene.

- **1938.** Albert Pierre Dustin, físico Belga. Utilizó plantas del género como *Vinca* con actividades antitumorales y que actualmente se emplean para el desarrollo de fármacos como (vincristina y vinblastina)
- **1930-** China realizó estudios clínicos con trióxido de arsénico y fue aprobado por la FDA para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda en USA en el 2000.
- **1939.** Se realizan estudios de mecanismos celulares y efectos de sulfuros y mostazas nitrogenadas los cuales sugieren que los efectos son parecidos a los de los rayos "x".
- **1942.** Gilman, Goodman y Philips, encontraron que la mostaza nitrogenada (en el cual un átomo de sulfuro era sustituido por un átomo de nitrógeno en el gas mostaza) tenía actividad antitumoral en contra de linfoma murino e inducía la regresión del mismo.
- **1942-1943.** Gustaf Lindskog administra a un paciente mostaza nitrogenada durante el tratamiento de linfoma non-Hogkin y severa obstrucción de las vías aéreas el cual no respondía a la radioterapia.
- **1948.** Sydney Farber utiliza antifolatos para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA).
- George Hitchings y Gertrude Elion dos químicos farmacéuticos probaron muchos análogos de purina hasta que llegaron al descubrimiento de un análogo de purina (6-mercaptopurina), el cuál posteriormente mostró ser una droga antileucémica altamente activa.
- **1955.** Se inicia con el programa nacional de quimioterapia en el NCI (*National Cancer Institute* por sus siglas en inglés) se inicia un programa de búsqueda sistemática de fármacos
- **1958.** Roy Hertz y Min Li Chiu demuestran que el metotrexato es un agente que puede curar coriocarcinoma, es el primer tumor sólido que se cura con quimioterapia.
- **1959.** La FDA (*Food and Drug Administration*) aprueba a los agentes alquilantes como ciclofosfamida.

- **1965.** El régimen de MOMP (melfatan, metrotexato, vincristina y prednisona) y MOPP (en el cuál esta substituye procarbazona por metotrexato) es capaz de inducir remisiones a largo plazo en niños con LLA.
- **1970.** Vincent De Vita y sus colaboradores curan linfomas con el régimen de MOPP
- **1972.** Emil Frei y colaboradores demuestran que la quimioterapia dada después de remover el osteosarcoma puede mejorar la cura
- **1975.** La combinación de ciclofosfamida, metrotrexato y fluorouracil (CMF), mostró ser un tratamiento efectivo para ganglios positivos de cáncer de mama.
- **1978.** La FDA aprueba el cisplatino para el tratamiento de cáncer de ovario. Este medicamento demostraría tener una amplia actividad para un gran número de tumores sólidos.
- **1986.** La FDA aprueba el primer anticuerpo monoclonal, muromonab-CD3 (orthoclone)
- **1992.** La FDA aprueba paclitaxel (Taxol) que se convierte en el primer fármaco oncológico.
- **2000.** La FDA aprueba los tratamientos dirigidos interfiriendo en moléculas específicas para el desarrollo del cáncer.
- **2001.** Estudios por Brian Ducker conducen a la FDA a aprobar al mesilato de imatinib (Glivec) para el tratamiento de leucemia mieloide crónica, un nuevo paradigma blanco par la terapia oncológica.
- **2004.** La FDA aprueba el bevacizumab (Avastin), el primer agente antiangiogénico demostrado clínicamente para el tratamiento de cáncer de colon.
- **2004.** Los investigadores de la universidad de Harvard definen mutaciones en EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) que le confieren la capacidad de respuesta selectiva a gefitinib, lo que indica que las pruebas moleculares pueden ser capaces de identificar de forma prospectiva subgrupos de pacientes que responden a los agentes dirigidos.³¹⁻³⁴

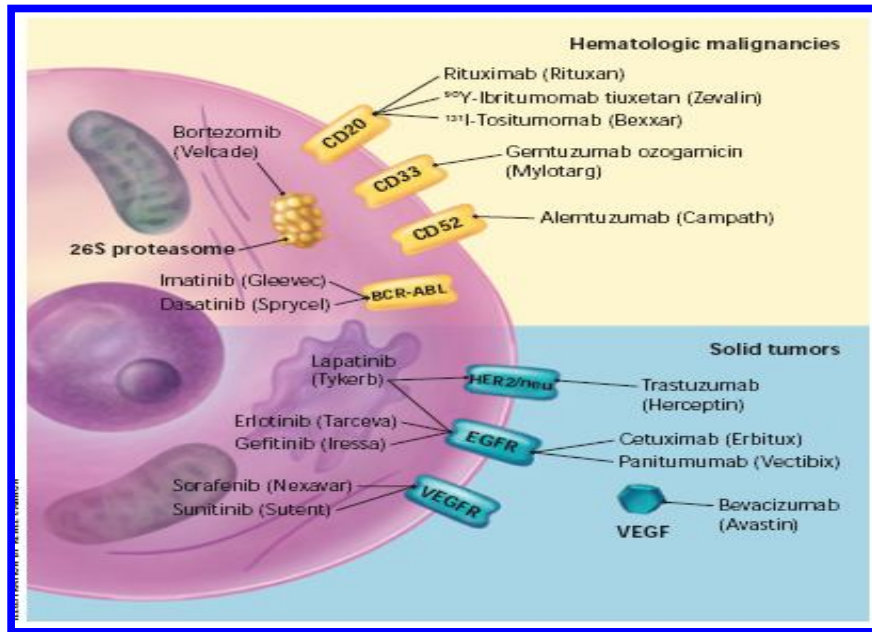


Figura II.10. Principales blancos moleculares de las terapias actuales.³⁴

A pesar de que existen diversos tratamientos contra el cáncer, aún se observa una alta mortalidad de cáncer a nivel mundial. Se estima que para el año 2030 habrá 26 millones de nuevos pacientes con cáncer y 17 millones de fallecimientos. En México, 1 de cada 3 mexicanos recibirá el diagnóstico de cáncer a lo largo de su vida y 1 de cada 5 mexicanos fallecerá asociado directa o indirectamente a algún tumor maligno.¹⁵

Hoy en día, existen entre 20 y 30 medicamentos que están exclusivamente dedicados a afectar o detener el crecimiento de las células que provocan la formación de cáncer en el cuerpo. Sin embargo, estos medicamentos causan efectos secundarios agresivos a los pacientes. Los blancos moleculares con los que actúan actualmente los medicamentos actuales se observa en la Figura II.10.³⁰⁻³³

Nuevas Alternativas terapéuticas: Capsaicinoides

Actualmente se ha producido una importante base de datos la cual establece que los factores dietéticos tienen un fuerte impacto en la prevención y etiología del cáncer humano. Se ha demostrado que una gran variedad de sustancias fenólicas encontradas en nuestra dieta tienen efectos quimiopreventivos en contra de la carcinogénesis y mutagénesis experimental. Muchos investigadores han realizado estudios para probar la *capsaicina* (Figura II.11), en animales que presentan tumores inducidos; los recientes resultados revelan importantes efectos anticancerígenos y antígenotóxicos, lo que sugiere a este

compuesto como un fitoquímico importante de la dieta con una actividad como potente quimiopreventivo.³⁵⁻³⁷

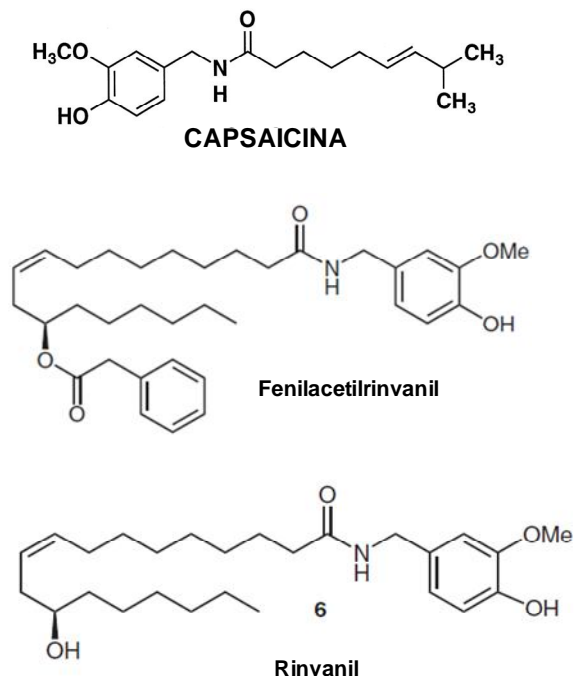


Figura II.11. Estructura química de la capsaicina y los análogos químicamente relacionados.

Capsaicina

La **capsaicina** (*trans-8-metil-N-vanillil-6-nonedamida*) es un compuesto fenólico pungente presente en algunos chiles de la familia *Capsicum* en cantidades que varían desde 0.1% a 1%; tiene acciones selectivas sobre neuronas sensoriales primarias, fibras C y fibras ligeramente mielinizadas, se ha demostrado que este alcaloide produce sus efectos por activación de canales de calcio en dichas neuronas.^{35,36} Muchas fibras sensibles a la capsaicina son nociceptores polimodales que son los más abundantes; éstos responden a estímulos como aumento de presión, temperatura y sustancias químicas.³⁹ Las neuronas nociceptoras son caracterizadas por ser células sensibles a la capsaicina, estas neuronas transmiten información por procesos generados a daño celular, los cuales pueden liberar glutamato que es un rápido neurotransmisor central, también pueden expresar neuropéptidos como péptido relacionado al gene de calcitonina (CGRP), sustancia P, neurocina A y somatostatina, los cuales están relacionados dentro de la espina dorsal durante intensa estimulación y pueden contribuir en la inflamación neurogénica. La estimulación nociva del sistema nervioso periférico a largo plazo incrementa la excitabilidad la cual puede contribuir a los mecanismos centrales de alodinia

e hiperalgesia, en estudios electrofísicos y bioquímicos se ha demostrado que la capsaicina excita a los nociceptores por el incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática a los cationes.³⁷⁻³⁹

Canal / Receptor

Muchos mecanismos estudiados de la activación de neuronas nociceptivas inducida por la capsaicina se han realizado utilizando neuronas sensoriales cultivadas y nervios aislados *in vitro*; dichos estudios han mostrado que la capsaicina induce la despolarización, y durante este proceso incrementa la permeabilidad de la membrana particularmente a los iones de calcio y sodio. La acumulación inducida por la capsaicina de los iones de calcio o el flujo de iones radiomarcados como el rubidio (en lugar de potasio), guanidinio (en lugar de sodio) ha sido explotada para cuantificar los efectos de la capsaicina. El canal de iones de la membrana activado por la capsaicina es único y no es sensible a los bloqueadores de calcio y sodio convencional tales como las dihidropiridinas (conotoxina y tetrodotoxina respectivamente); sin embargo si son bloqueados por rutenio rojo el cual parece ser relativamente selectivo para estas acciones, y utilizado a bajas concentraciones puede atenuar los efectos (activación de nociceptores y liberación de neuropéptidos sensoriales) inducidos por la capsaicina, pero no sobre los nervios sensoriales en donde actúa la bradicina.^{38,40}

La capsaicina activa un gran número de sistemas bioquímicos e incrementa la concentración celular del cGMP, diacilglicerol y el óxido nítrico además de estimular el movimiento del inositol trifosfato y la liberación del ácido araquidónico (inhibidor de agregación plaquetaria). Sin embargo todos estos eventos bioquímicos son secundarios a la entrada de calcio y no participan en el rol inicial de la activación de las neuronas sensoriales inducidas por la capsaicina.^{36, 38,40}

Desensibilización inducida por la capsaicina

La habilidad de la capsaicina para desensibilizar las neuronas nociceptivas está bien documentado, sin embargo, existen dos fenómenos reportados bajo el título general de desensibilización; el primer fenómeno es un clásico de la desensibilización farmacológica en aplicaciones prolongadas o repetidas de capsaicina la cuál conduce a la reducción progresiva del tamaño de las

respuestas posteriores a capsaicina. El segundo fenómeno es "desensibilización-funcional", la capsaicina provoca una reducción o pérdida de capacidad de respuesta de la neurona a otros estímulos. Los dos fenómenos a menudo se presentan juntos, pero pueden ser separados cuando se emplean bajas concentraciones de capsaicina. En estas condiciones, la capacidad de respuesta a la capsaicina se reduce o se pierde de forma selectiva y las respuestas a otros tipos de estímulos nocivos o inocuos no se han modificado. La desensibilización funcional se ha visto con mayor concentración de capsaicina y se cree que es la base para efectos analgésicos y anti-inflamatorios.^{37, 38,40}

Debido a su actividad analgésica y antiinflamatoria, la capsaicina tópica ha sido usada en la práctica clínica para el tratamiento de algunas condiciones neuropáticas, artritis reumatoide, osteoartritis, post mastectomía etc.^{36, 41} De acuerdo con recientes estudios realizados por Morre et al. la capsaicina se reconoce por sus propiedades toxicológicas y farmacológicas en el tratamiento del cáncer ya que se inhibe el crecimiento de las células transformadas en cultivo, incluyendo cáncer de ovario, adenocarcinoma mamario y leucemia promielocítica (HL-60), o por eliminar varios tipos de células cancerosas humanas.^{36,40,41} La inhibición de la supervivencia de las células fue acompañada por la inducción de apoptosis revelando cambios morfológicos, por la fragmentación de DNA nuclear, la cual fue corroborado por la inhibición de la actividad de la NADH oxidasa en la membrana plasmática. Los datos obtenidos sugieren que la capsaicina induce apoptosis regulada por Bcl-2, por las fosfatasa y la calcineurina.^{36, 41,42}

Análogos de la capsaicina

La utilidad potencial terapéutica de los análogos de la capsaicina que conserva su acción selectiva sobre las neuronas aferentes y su actividad analgésica pero sin causar efectos secundarios no deseados ha llevado a desarrollar nuevos fármacos basados en la estructura de la capsaicina.⁴³

Los primeros estudios realizados en la estructura-actividad sugirieron que no era posible producir un análogo con significativa actividad anti-nociceptiva, sin embargo, estudios recientes afirman que la actividad analgésica con los

análogos de la capsaicina no pungentes tiene muy buena eficacia y efectos secundarios reducidos.^{41, 42}

Estudios bioquímicos revelaron que el capsiato (un derivado no pungente de la capsaicina) inhibe la actividad catalítica de la cinasa Src, la cual es un blanco importante del receptor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) KDK/Fik1. El modelado molecular reveló que el capsiato y los capsaicinoides estructuralmente relacionados (como los que observamos en la Figura II.11 **fenilacetilrinvanil, el rinvanil,**) se anclan eficientemente a la región de unión al ATP de la cinasa Src a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Algunos resultados indican que el capsiato tiene un potencial considerable como un nuevo modelo de compuesto farmacológico para el desarrollo y diseño de antagonistas de Src e inhibidores de la angiogénesis.⁴¹

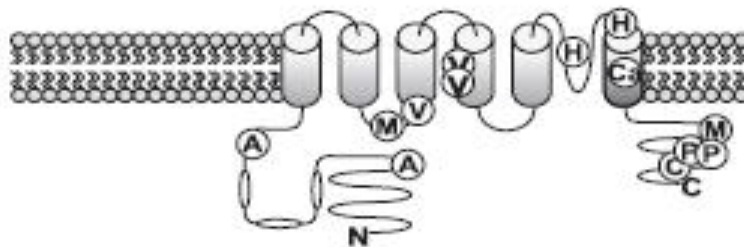


Figura II.12. Configuración propuesta del dominio membranar de TRPV1 con localización aproximada de los residuos que involucran. La estructura de TRPV1 es similar a los miembros de la familia de proteínas TRP y tiene muchas secuencias de fosforilación finales. **V:** residuos que involucran la unión a vainilloides, **H:** residuos que involucran unión a protones, **A:** 7 residuos son blancos PKA, **C:** 6 residuos son blanco para PKC y 6 Ca^{2+} /calmodulina (CaMkII) **P:** residuos que involucran en PtdIns(4,5)P₂, unión para la permeabilidad de Ca^{2+} y algunos otros son motivos para blancos de otras proteínas cinasas.⁴⁴

Muchos otros receptores han sido reportados como sensibles a capsaicinoides, entre ellos los receptores tipo canal de potencial transitorio (TRP), que tienen como característica 6 dominios transmembranales y son capaces de ser permeables para algunos cationes, incluyendo el Ca^{2+} .⁴⁵

TRPV1 (canal de potencial transitorio tipo vainilloide1) tiene 6 dominios transmembranales, con los -N y -C terminal localizados intracelularmente. La estructura propuesta de TRPV muestra que contiene seis dominios, el quinto y el sexto dominio membranar son conectados por sitios intramembranosos, los cuales están involucrados en la formación del poro. La estructura y la secuencia de aminoácidos de TRPV es similar para los otros miembros de la familia de canales catiónicos, receptores potenciales transitorios (TRP) la cual

consta de seis miembros TRPA, TRPC, TRPM, TRPP, TRPN y TRPV. El TRPV tiene varios sitios de glicosilación, dominios los cuales se enlazan a otras proteínas y dos sitios de unión a nucleótidos los cuales tienen un papel en la regulación de la actividad del receptor. Estudios recientes demuestran que TRPV está organizado en oligómeros y que la forma funcional del receptor es probablemente tetramérica. La subfamilia de tipo vainilloide (TRPV) de los receptores TRP es indispensable para el desarrollo de ciertas condiciones patológicas, tales como la hiperálgesia inflamatoria al calor ó hiperreflexia visceral.^{44,45}

TRPV1 y TRPV4 responde a la estimulación con productos naturales, como la capsaicina y la resiniferatoxina. Otra característica común del TRPV1 y TRPV4 es su capacidad de ser activados por ligandos endógenos los cuales son distintos derivados del araquidonato.^{44,45}

El TRPV1 funciona como un integrador molecular de los estímulos nociceptivos, incluyendo el calor, el potencial de hidrógeno y toxinas vegetales, y es muy abundante en las fibras tipo C del sistema sensorial periférico; otros estudios lo han implicado en la percepción del dolor generado por la inflamación, en los desórdenes inflamatorios del intestino, dolor neuropático y otros patológica. TRPV1 también puede tener un importante papel en condiciones fisiológicas, por ejemplo, ayuda a que la vejiga funcione correctamente. La presencia amplia de TRPV1 en células del cerebro, así como en queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, células cebadas y astrocitos, sugiere que está involucrado en el control de muchas funciones fisiológicas y patológicas.^{44, 46,48}

Las ventajas como blanco terapéutico del TRPV1 son evidentes, en recientes descubrimientos esta proteína muestra una sobre-regulación significativa en algunas condiciones patológicas que van desde el prurito e inflamación o el dolor diabético neuropático al cáncer de cérvix. Los agonistas no pungentes sintéticos son capaces de desensibilizar inmediatamente al TRPV1, y selectivamente eliminar la expresión de los nociceptores TRPV1, por lo que pueden usarse contra la hiperalgesia inflamatoria, hiperactividad de la vejiga, émesis, crecimiento cancerígeno y excitotoxicidad neuronal.^{45,46,47}

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial el cáncer cérvicouterino representa la segunda causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en mujeres y ocupa el segundo lugar de los cinco más frecuentes en edades productivas en México, por lo que es considerado como un problema de salud pública. El VPH es el principal factor etiológico para el desarrollo de CaCu, del cuál los serotipos 16 y 18 han presentado mayor incidencia en pacientes mexicanas. Se ha demostrado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix (CALO e INBL), establecidas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer a partir de biopsias de pacientes mexicanas, expresan las tres subunidades del receptor de IL-2. Una excelente propuesta para el tratamiento de cáncer cérvicouterino serían los fármacos derivados de los capsaicinoides, los cuales son una variedad de sustancias fenólicas, particularmente presentes en plantas incluidas en la dieta y medicinales; en estos derivados se han observado que tienen efectos positivos en el tratamiento de distintos tipos de padecimientos, siendo el cáncer uno de ellos.

Las líneas celulares responden al estímulo con IL-2, con dosis bajas aumentando su proliferación. Por otro lado, la cinasa Lck se presenta de manera normal en linfocitos, en estas células se asocia a la cadena β del receptor para IL-2, y se ha reportado que su función principal es inducir vías de sobrevivencia de manera independiente de las JAKs; además, Lck es capaz de activar a STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas. En las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL se expresa Lck, y su fosforilación aumenta en respuesta al estímulo con IL-2.

En la actualidad es de vital importancia tener los conocimientos sobre las vías de señalización que se activan en las células tumorales y que gobiernan el funcionamiento de estas células ya que en estas se encuentran las proteínas mutadas o están sobreexpresadas contribuyendo con esto al fenotipo maligno, para poder corregir mediante la terapia génica las alteraciones en proteínas clave de estas vías de señalización.

Los tratamientos actuales incluyen radiaciones y quimioterapia, estos agentes inducen apoptosis en las células de cáncer pero la selectividad es una pieza clave. Por lo tanto lo que se pretende con el conocimiento de estas reacciones

bioquímicas es un diseño de fármacos más específicos que sean menos agresivos con la célula normal pero que sean potentes para inhibir a la célula invasiva.

A este respecto, se ha demostrado que los fármacos derivados de los capsaicinoides, como el fenilacetilrinvanil y el rinvanil, pueden inhibir la actividad catalítica de la cinasa Src. Dado que la cinasa Lck es una proteína de la familia de cinasas Src, podría ser inhibida por los capsaicinoides. Por lo tanto, nos planteamos evaluar los efectos de los análogos de la capsaicina en particular el Rinvanil y el fenilacetilrinvanil es debido a que es de vital importancia analizar si estos derivados pueden inhibir el patrón de fosforilación y la activación de la cinasa de tirosina de proteínas inducida por la IL-2 y, en particular de Lck tanto en líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL como en linfocitos de sangre periférica de donadores sanos.

IV. HIPOTESIS

De acuerdo a las evidencias recientes en donde los capsatos, como el fenilacetilrivanil y el rivanil, son capaces de unirse de manera eficiente al sitio de unión de ATP de cinasas de la familia Scr, se cree que podrían ser capaces de inhibir la fosforilación de proteínas inducida por la IL-2 y mediadas por esta familia de cinasas principalmente Lck, en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto de los análogos de la capsaicina fenilacetilrinvanil (far) y rinvanil (r) sobre la fosforilación de proteínas inducido por la IL-2 en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar y mantener líneas celulares CALO e INBL
- Cultivar linfocitos de sangre periférica de donadores sanos para establecer un control negativo.
- Determinar la dosis efectiva para inhibir la proliferación.
- Determinar la dosis efectiva para inhibir la fosforilación de proteínas activadas por IL-2 de líneas celulares CALO e INBL.
- Determinar la inhibición de la cinasa Lck por FAR y R.

VI. METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consiste en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (estadío clínico IIB) e INBL (estadío clínico IVB). Como fuente de IL-2 se utilizó IL-2 recombinante (R&D systems). Estas células permanecen criopreservadas en el Laboratorio de Oncología Molecular de la FES Zaragoza UNAM.

Las células CALO e INBL se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal de bovino previamente desactivado, 100U/mL de penicilina G, anfotericina B y 0.01% de estreptomina; todos los cultivos se mantuvieron en incubadora en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C de temperatura y humedad saturada. Cada tercer día se revisaron los cultivos para el control del crecimiento celular.

- **Resiembra y conteo celular**

En las botellas de cultivo que contienen las líneas celulares CALO e INBL se desechó el medio RPMI suplementado y se agregaron 8 mL de Verseno (a temperatura ambiente) por botella, posteriormente se incubaron por 7 minutos, se despegaron las células + el verseno el cual se recuperó en tubos cónicos de plástico para centrífuga de 50 mL, se les agregaron 10 mL de medio RPMI solo, los cuales centrifugaron por 5 minutos a 2500 rpm, se retiró el sobrenadante de los tubos y se recuperó el botón celular de cada línea celular, el cual se resuspendió gentilmente con 2 mL de medio solo RPMI. Para finalizar se tomaron 0.02 mL de la solución y se colocaron en una cámara Neubauer (American Óptica, U.S.A.), para realizar el conteo.

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

En condiciones de esterilidad se obtuvieron de 30 mL - 40 mL de sangre periférica de donadores sanos por venopunción con Vacutainer con EDTA (Rickercab/NCB, USA), posteriormente la sangre que fue obtenida se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos para separar el plasma del paquete celular mediante la técnica del pipeteo, el paquete celular fue lavado con medio RPMI (un volumen igual al retirado de plasma) se resuspendió gentilmente (procurando no provocar lisis celular) y se centrifugó nuevamente por 5 minutos

a 5000 rpm, este lavado se realizó por 3 veces. Una vez terminados los lavados el paquete celular se resuspendió en medio RPMI. Se separaron alícuotas de 5 mL en tubos a los cuales previamente se les adicionó 3 mL de Ficoll Hypaque (Microlab, México) de 1.077 de densidad, los cuales fueron centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm. Finalizado el tiempo de centrifugado se apreciaron tres fases: la inferior es de eritrocitos, la fase intermedia es el medio RPMI y la última es la fase del Ficoll; los linfocitos están en la interfase entre el medio RPMI y el Ficoll a estas células se recuperaron mediante el pipeteo suave en forma circular (solo obteniendo el halo blanco), esta células se les realizó un lavado con medio RPMI, y se contaron con el mismo procedimiento que la líneas celulares con una cámara de Neubauer (American Optical, U.S.A.) Los linfocitos de donadores sanos obtenidos fueron cultivados con medio RPMI adicionado con 20% de suero fetal bovino y 100UI / mL de Interleucina 2 (IL-2) en cajas petri de 25mm (Nunc).

INHIBICIÓN CON FENIL-ACETIL-RINVANIL Y RINVANIL

- **Lisado celular total**

Se sembraron 1×10^6 células por caja y se incubaron por 48 horas a 37°C con RPMI + suero fetal de bovino al 0.5%; después de transcurrido este tiempo se reemplazó el medio por medio fresco al 0.5% y se agregaron los inhibidores (50mM) por 16h, 12h, 5h, 4h, y 2h (tiempos reportados en bibliografía). Pasado ese tiempo se les retiró el medio más los inhibidores y se les colocó 2mL de medio fresco por 10 minutos y se procedió a estimular con 10UI / mL de IL-2 por 35 minutos a 37° C, terminado el lapso de tiempo se desechó el medio y se lavó con PBS, y posteriormente se lisaron a estas células con buffer de lisis total (1mL) y se despegaron las células mecánicamente raspando la caja con un gendarme, cada lisado de células se transfirió a un tubo Eppendorff y se dejó reposar por 15 minutos, una vez transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 13000 rpm, todo el procedimiento se realizó a 4° C.

- **Cuantificación de Proteínas**

Se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el método de Lowry el cual es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas, utilizando un kit comercial (Bio-Rad Dc Protein Assay, Bio-Rad, Ca).

- **Precipitación de proteínas**

Para realizar la precipitación se le agrego el doble del volumen total de acetona por cada una de las muestras. Se pusieron a precipitar por una hora a -70°C , transcurrido el tiempo se pusieron a centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y se prosiguió a realizarle tres lavados los cuales consistieron en adicionar 150 μL de acetona fría y centrifugar por 4 minutos, este procedimiento se realizó para cada lavado y por cada una de las muestras. Posteriormente, se agregaron 60 μL de Buffer de Laemmli reductor a cada una de las muestras las cuales se guardaron a -70°C .

ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

La electroforesis SDS-PAGE (PoliAcrylamide Gel Electrophoresis), en geles de poliacrilamida separa las proteínas de acuerdo al peso molecular y/o punto isoeléctrico, mediante un potencial con carga eléctrica. La electroforesis se realizó de acuerdo al método de Laemmli, utilizando DTT como agente reductor, excepto que la concentración del gel concentrador es de 4.5% y el gel separador es 10%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS, y la concentración de acrilamida a usar fue de 10% p/v). Los geles se polimerizaron con la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. U.S.A) y tetrametiletileno-diamina (TEMED), para el gel separador, ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. El buffer de corrida (pH 8.3) tiene 0.025 M Tris, 0.192 M glicina. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85V por 2 horas en una cámara vertical (ATTO Co, Japan).

WESTERN-BLOT

El propósito de esta técnica es el reconocimiento de una proteína inmovilizada en una membrana con un anticuerpo específico (identificar si una proteína se encuentra presente en una mezcla compleja).

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse- Andersen en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 145 mA durante 1.5 horas utilizando buffer de transferencia. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas fue bloqueada con albúmina bovina al 3% (p/v) en buffer TBS durante toda la noche a 4°C.

INCUBACIÓN DE ANTICUERPOS

Todas las membranas serán incubadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina (Anti- PY), este anticuerpo detecta cualquier proteína fosforilada en tirosina) (1:1000) por 2.5 horas .Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween por 5 minutos c/u y 2 veces con TBS-Tween por 5 min. c/u y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 45 minutos; fue revelado utilizando quimioluminiscencia.

ELUCIÓN DE ANTICUERPOS

Este método se utilizó con la finalidad de poder incubar distintos anticuerpos en la membrana de nitrocelulosa y consistió en incubar la membrana con un buffer de elución de anticuerpos en un baño de agua a una temperatura de 60° - 70 ° C por 1 hora a agitación constante. Posteriormente fueron realizados 3 lavados con TBS-Tween y 2 lavados con TBS por 5 minutos c/u y la membrana se bloqueó con albúmina al 3% (p/v) en buffer TBS –Tween durante toda la noche.

VII. RESULTADOS

Debido al potencial terapéutico, la facilidad y bajo costo que representa realizar la síntesis de los análogos de capsaicina: el rinvanil (r) y el fenilacetilrinvanil (far), a partir de aceite de ricino, se decidió probar si estos análogos podrían actuar como inhibidores de la proliferación celular en las líneas de carcinoma de cérvix y en linfocitos de sangre periférica de pacientes sanos (como un control negativo a Cáncer).

En primer lugar en las Figuras VII.1 y VII.2, se determinó el patrón de fosforilación en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL sin estimular: Control negativo (-) y con 10UI/mL de IL-2 Control positivo (+).

Efecto de los análogos de capsaicina sobre la fosforilación en tirosina

Las líneas celulares fueron tratadas con r y far por cuatro horas a diferentes concentraciones y estimuladas con IL-2 por 35 minutos; se obtuvieron lisados celulares totales y se realizó una electroforesis y un western blot para su análisis.

En la Figura VII.1 se observa el comportamiento de los inhibidores en la línea celular CALO. Por un lado el rinvanil (Figura VII.1) el cual tiene un efecto máximo a una concentración de 50mM, para la concentración de 5mM se observa una inhibición parcial del patrón. En el caso del fenilacetilrinvanil (Figura VII.1) el efecto máximo se puede observar en 50mM; para el caso de las concentraciones más bajas a las que fueron expuestas las líneas celulares, presentan un patrón de fosforilación semejante a los controles positivos donde son los cultivos celulares con 10 UI/mL de IL-2 en ambas figuras.

CALO

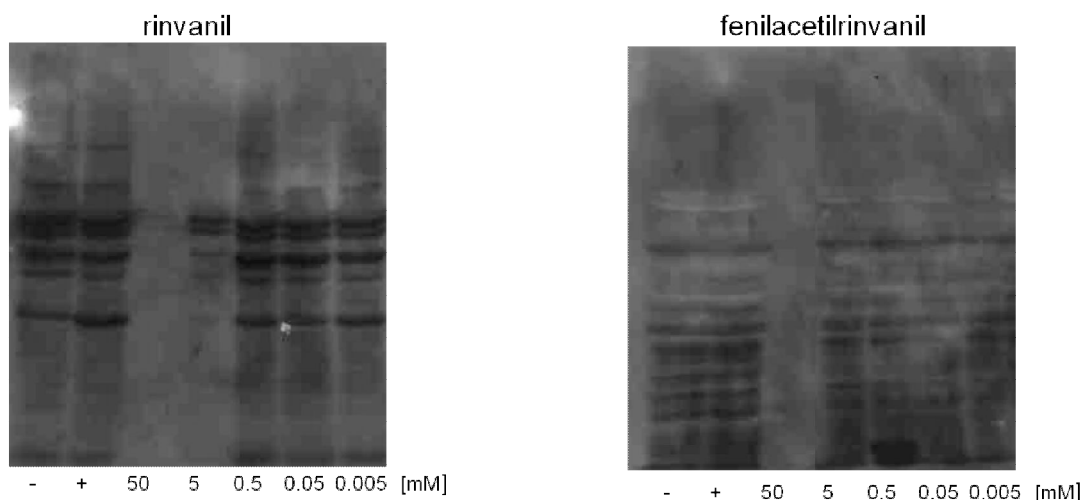


Figura VII.1. Efecto de los análogos de capsaicina sobre la fosforilación de proteínas en tirosina inducida por 10 UI/mL de IL-2 en la línea celular CALO sin estimular: Control negativo (-) y con 10 UI/mL de IL-2 Control positivo (+), las células fueron tratadas con R y FAR por cuatro horas a diferentes concentraciones, se lisaron las células y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10%, y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un inmunoblot utilizando un anticuerpo antifosfotirosina y las proteínas se visualizaron utilizando quimioluminiscencia. El Blot es representativo de tres experimentos independientes.

De igual manera se realizaron ensayos para analizar el comportamiento de los mismos inhibidores (r y far) en la línea celular INBL que son células tumorales en un estadio más avanzado (IVB), Utilizando las mismas concentraciones, y con la estimulación de IL-2 a las mismas condiciones ya utilizadas. En la Figura VII.2 Utilizando al r con la concentración 50mM podemos observar que se presenta una inhibición total del patrón a diferencia del inhibidor far que presenta una inhibición parcial, en comparación con CALO, En la línea celular INBL no se observa efecto en el patrón de fosforilación en las concentraciones más bajas de 50mM.

INBL

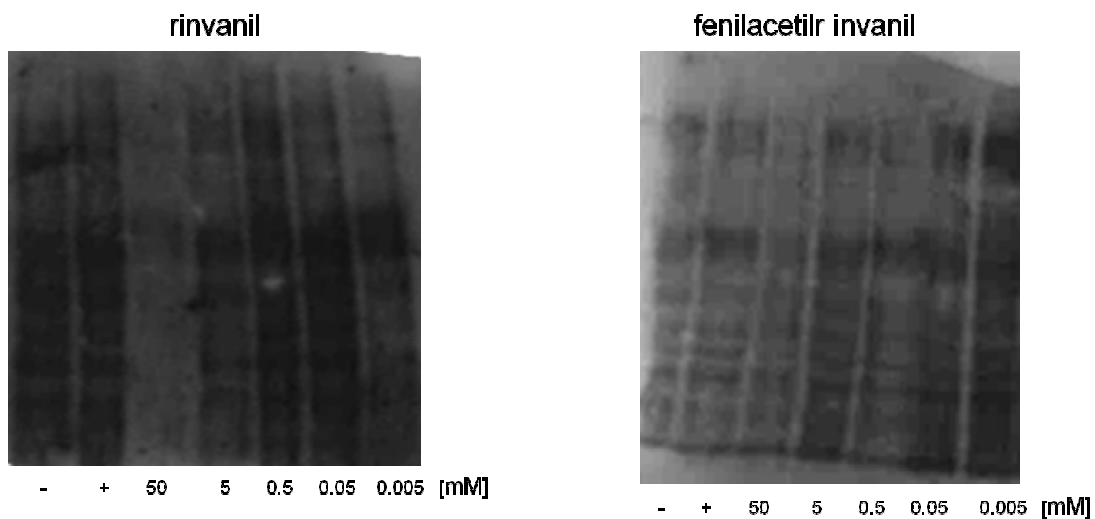


Figura VII.2. Efecto de los análogos de capsaicina sobre la fosforilación inducida por 10 UI/mL de IL-2. La línea celular de carcinoma de cérvix INBL sin estimular: Control negativo (-) y con 10UI/mL de IL-2 Control positivo (+).Las células fueron incubadas con (r) y (far) por cuatro horas a diferentes concentraciones, las cuales fueron lisadas y las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Y se realizó un inmunoblot con anticuerpo antifosfotirosina y se visualizaron las proteínas con quimioluminiscencia. El Blot es representativo de tres experimentos independientes.

Efecto de capsaicina sobre cinasas Src

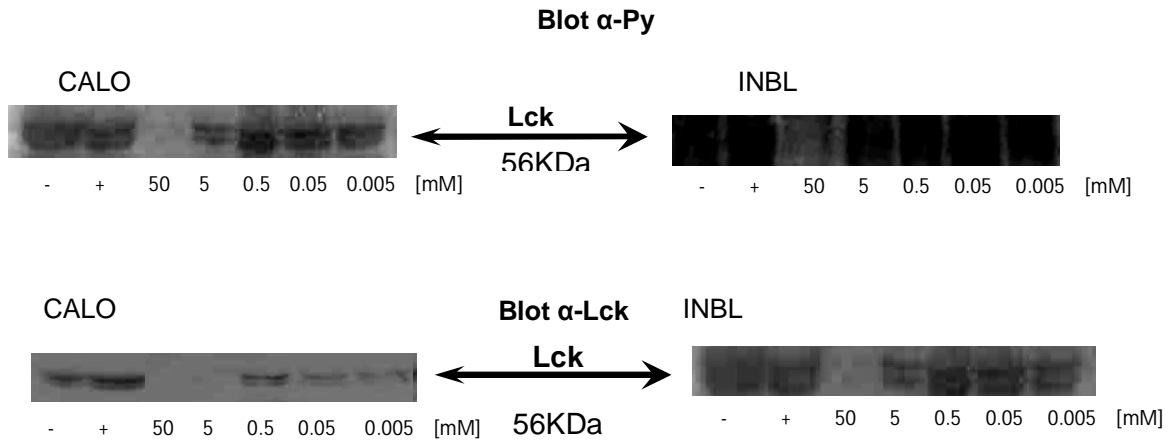
Se ha demostrado que la capsaicina tiene un efecto inhibitor sobre las cinasas Src. Nuestro grupo de trabajo demostró que existe una interacción entre la cadena β del receptor para IL-2 con la cinasa Lck (miembro de la familia Src) activando señales anti-apoptóticas. Por lo tanto, para determinar la presencia de Lck activada en respuesta de la estimulación con IL-2 se realizó una elución ácida a las membranas utilizadas en el ensayo anterior, y se utilizó un anticuerpo anti Lck y se visualizó a la proteína mediante quimioluminiscencia.

En la Figura VII.3 (A y B) se observa la presencia de Lck control positivo (+) en ambas líneas celulares que fueron estimuladas con IL-2 por 35 minutos en comparación con el control negativo (-) que son las células que no fueron estimuladas), ambas líneas fueron incubadas con los análogos de capsaicina rinvanil y fenilacetilrinvanil. Se observa que en la concentración de 50mM al parecer se regula la expresión de la proteína ya que no se observa presente en comparación con las concentraciones mayores.

En la línea celular CALO incubadas con rinvanil (A) y fenilacetilrinvanil (B), el mayor efecto de inhibición de la presencia de activación de Lck se observa en la concentración 50mM, Aunque con el rinvanil en la concentración de 5mM el efecto inhibición en la activación de la cinasa se continua observando. En el caso de la línea celular INBL, el efecto de inhibición total de la presencia de la cinasa Lck se presenta con la concentración de 50mM en el caso del rinvanil pero con fenilacetilrinvanil la inhibición es parcial; sin embargo ambos inhibidores no presentan efecto en concentraciones menores.

Efecto de capsaicina sobre la cinasas Src.

A. rinvanil



B. fenilacetilrinvanil

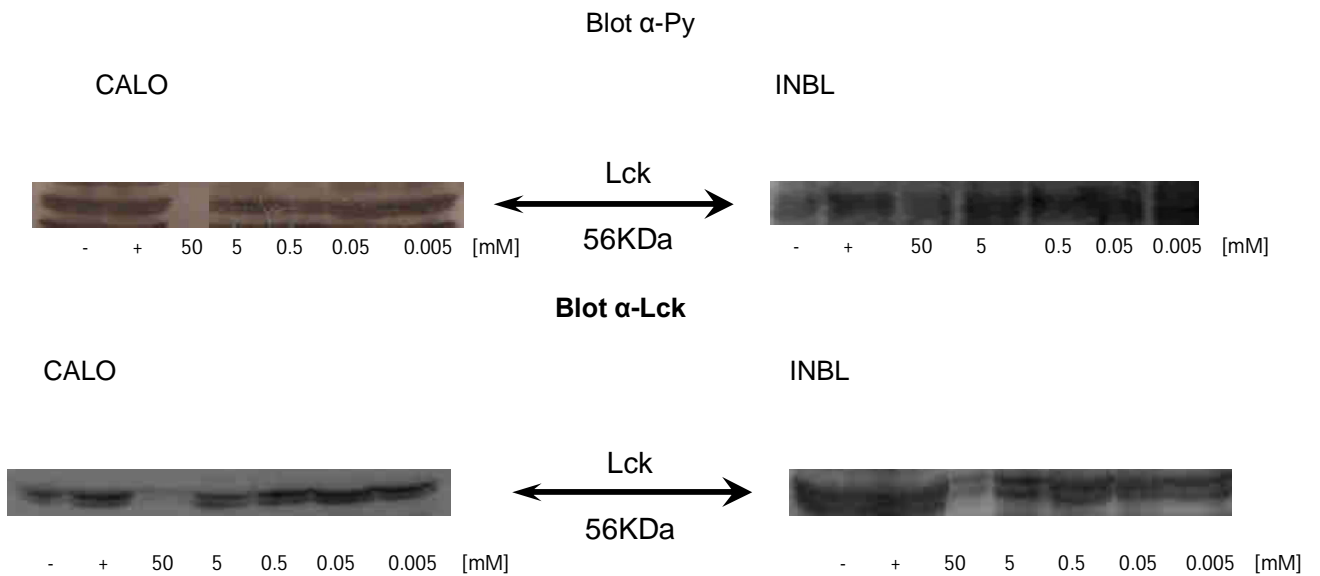


Figura VII.3. Efecto de los análogos de capsaicina sobre la actividad de Lck. Se realizó una elusión ácida de la membrana que fue revelada con α -Py para realizar un inmunoblot con anticuerpos anti-Lck, se observan las bandas con un peso aproximado de 56k Da. La líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL sin estimular: Control negativo (-) y con 10UI/mL de IL-2 Control positivo (+). Ambas líneas fueron estimuladas con Rinvanil (A) y Fenil acetil rinvanil (B) a las mismas concentraciones utilizadas anteriormente; C- (-), C+ (+), [50mM], [5mM], [0.5mM], [0.05mM], [0.005mM]. El Blot es representativo de tres experimentos independientes.

El efecto de r y far sobre linfocitos de sangre periférica de donadores sanos

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las líneas celulares CALO e INBL expresan y producen el receptor para IL-2. Además se ha demostrado que la cadena β del receptor interactúa en la proteína Lck induciendo señales anti-apópticas, Por otro lado, de manera normal, en linfocitos también son expresadas estas moléculas para el desarrollo, diferenciación y activación de células T. Por lo tanto, se realizaron ensayos para establecer a los linfocitos como un control de células normales para poder analizar si los análogos de capsaicina pueden ser utilizados como un tratamiento específico para el tratamiento del cáncer o afectan las células normales. En la Figura VII.4 se observa el patrón de fosforilación de un cultivo celular de linfocitos, sin estimular Control - (-) y estimulados con 100UI/mL de IL-2 Control + (+), el cual se realizó a partir de células de sangre periférica de donadores sanos. Los linfocitos se incubaron por cuatro horas con los análogos de capsaicina y se estimularon con 100UI/mL de IL-2. Cuando se utilizó la concentración más alta 50mM para los análogos fenilacetilrivanil y Rinvanil respectivamente se observa una inhibición de la fosforilación en comparación con las otras concentraciones utilizadas (5mM, 0.5mM, 0.05mM y 0.005mM) para ambos análogos, con los que no se observa el efecto sobre la fosforilación al compararlos con los controles en los que se observa un patrón de fosforilación más marcado.

Blot α -Py

Efecto de far y r sobre Linfocitos de sangre periférica de donadores sanos

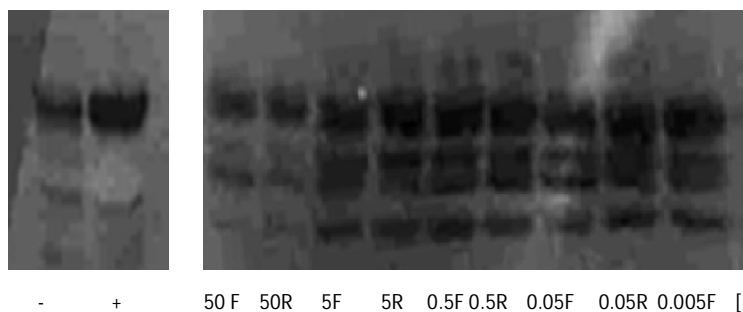


Figura VII.4. Efecto de los análogos de capsaicina sobre el patrón de fosforilación en proteínas inducido por IL-2 en linfocitos de sangre periférica de donadores sanos, los linfocitos sin estimular: Control negativo (-) y con 10UI/mL de IL-2 Control positivo (+). Los linfocitos de donadores sanos fueron incubados por 4 horas con los inhibidores FAR y R a diferentes concentraciones, se lisaron los linfocitos y las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10%, y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó un inmunoblot utilizando anticuerpo antifosfotirosina y las proteínas se visualizaron utilizando quimioluminiscencia. Control negativo (-), Control positivo (+), FAR 50mM, R 50mM, FAR 5mM, R 5mM, FAR 0.5mM, R 0.5mM, FAR 0.05mM, R 0.05mM, FAR 0.005mM. El Blot es representativo de tres experimentos independientes.

Para determinar la presencia de la cinasa Lck, se realizó una elución ácida a las membranas utilizadas en el ensayo anterior utilizando un anticuerpo anti-Lck y visualizando a la proteína mediante quimioluminiscencia.

En la figura VII.5 se observa la activación de Lck sin estímulo (-) Control negativo y estimulada por 35 minutos con 100 UI/ mL de IL-2 (+) control positivo el cual presenta un aumento en la fosforilación de Lck, en el caso de la concentración más alta 50mM con ambos inhibidores (far y r) se observa una disminución en la fosforilación de la cinasa, sin embargo en las concentraciones menores utilizadas ya no presenta cambio alguno, esto es la activación de la proteína se mantiene aún en presencia de los inhibidores.

Linfocitos

FAR y R

Blot α -Py

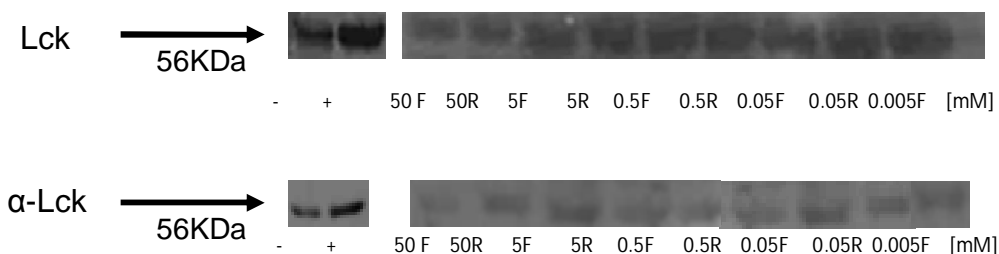


Figura VII.5 .Proteína Lck fosforilada en tirosina con estimulación con 100UI/ mL de IL-2 por 35 minutos. Se realizó un stripping al blot de α -Py con un medio ácido para probar con anticuerpos anti- Lck, se observan las bandas con un peso aproximado de 56k Da. Cultivo de Linfocitos sin estimular: Control negativo (-) y con 100UI/mL de IL-2 Control positivo (+). Los linfocitos fueron incubados por 4 horas a diferentes concentraciones de el Rinvanil y el Fenil-acetil-rinvanil, carril 3 FAR 50mM, carril 4 R 50mM, carril 5 FAR 5mM, carril 6 R 5mM, carril 7 FAR 0.5mM, carril 8 R 0.5mM, carril 9 FAR 0.05mM, carril 10 R 0.05mM y carril 11 FAR 0.005mM. El Blot es representativo de tres experimentos independientes.

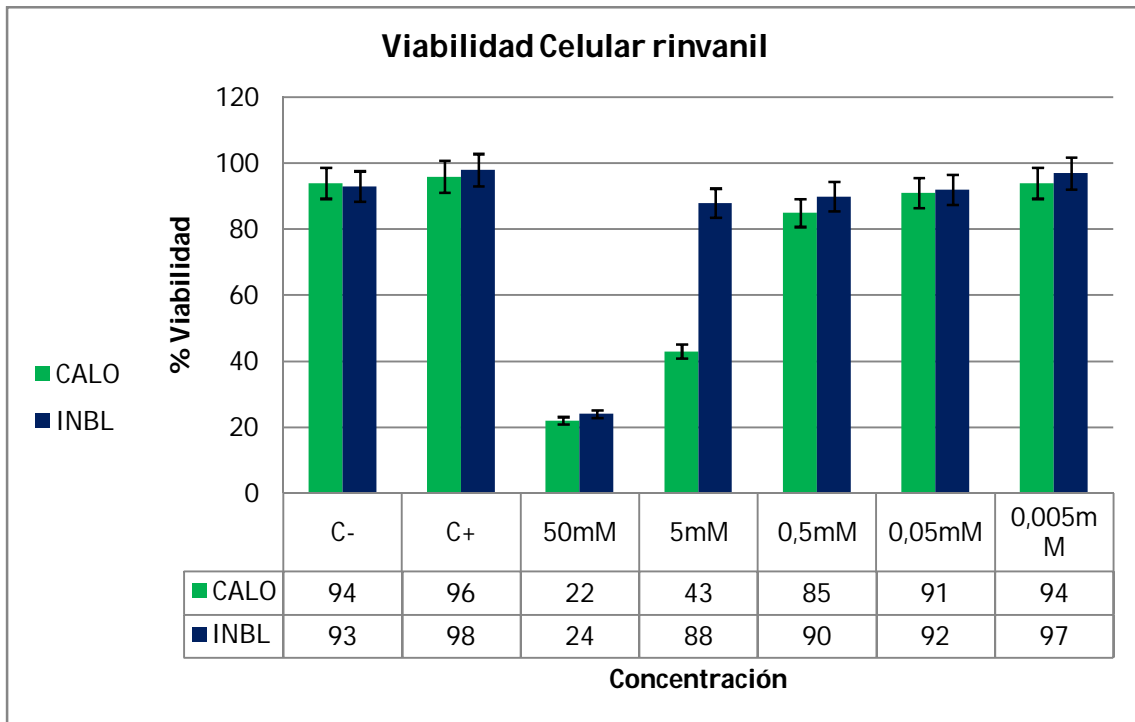
Efecto de rinvanil y fenilacetilrinvanil sobre la viabilidad celular

Se ha reportado que la capsaicina induce daño en la membrana celular. Para determinar el posible daño a las membranas celulares, Las líneas celulares fueron tratadas con r (Figura VII.6) y far (Figura VII.7) por cuatro horas a diferentes concentraciones y estimuladas con IL-2 por 35 minutos. Se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando la técnica de azul trípiano, las células que presentan daño en su membrana incorporan el colorante por lo que se observarán de color azul y las células viables se observarán incoloras. Mediante un conteo celular se determinó el porcentaje de viabilidad.

La figura VII.6 muestra la gráfica de viabilidad de las líneas celulares CALO e INBL tratadas con rinvanil. Se puede observar que con la concentración más alta (50mM) el porcentaje de viabilidad es muy baja comparándola con las células que no recibieron el tratamiento, La viabilidad más baja la presenta la línea celular CALO de 22%, en comparación con INBL, que tiene un porcentaje de 24%. A concentraciones más bajas (5mM) la viabilidad de las líneas celulares se recupera notablemente, sin embargo sigue siendo afectada

visiblemente la línea celular CALO, con una viabilidad menor al 50% (43%) y para INBL se recupera la viabilidad con (88%).

Al tratar ambas líneas celulares con concentraciones bajas, la viabilidad no se ve afectada por el tratamiento; sin embargo se observa que INBL la recupera con mayor facilidad.



FiguraVII.6. Efecto del rinvanil sobre la viabilidad celular. Gráfica de % Viabilidad celular vs Concentración en las líneas celulares de carcinoma de cervix CALO e INBL, las líneas celulares de carcinoma de cervix CALO e INBL sin estimular: Control negativo (-) y con 10UI/mL de IL-2 Control positivo (+) e incubadas por 4 horas con rinvanil estimuladas con 10UI de IL-2 por 35 minutos, utilizando la Técnica de azul tripano. Los resultados graficados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura VII.7 Se observa la gráfica de viabilidad de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL sin estimular (C-) y estimuladas con 10UI de IL-2 (C+), ambas líneas celulares incubadas por cuatro horas con el fenilacetilrivanil (far), en la gráfica se observa que en la concentración más alta utilizada (50mM), el far afecta la viabilidad de ambas líneas celulares, sin embargo, la línea celular CALO presenta la viabilidad más baja (12%), en contraste con INBL, que tiene una viabilidad de 42%, observándose que a partir de las segunda concentración, 5mM, 0.5mM, 0.005mM y 0.0005mM, la viabilidad no se ve afectado, ya que se obtuvieron porcentajes mayores al 70% en ambas líneas.

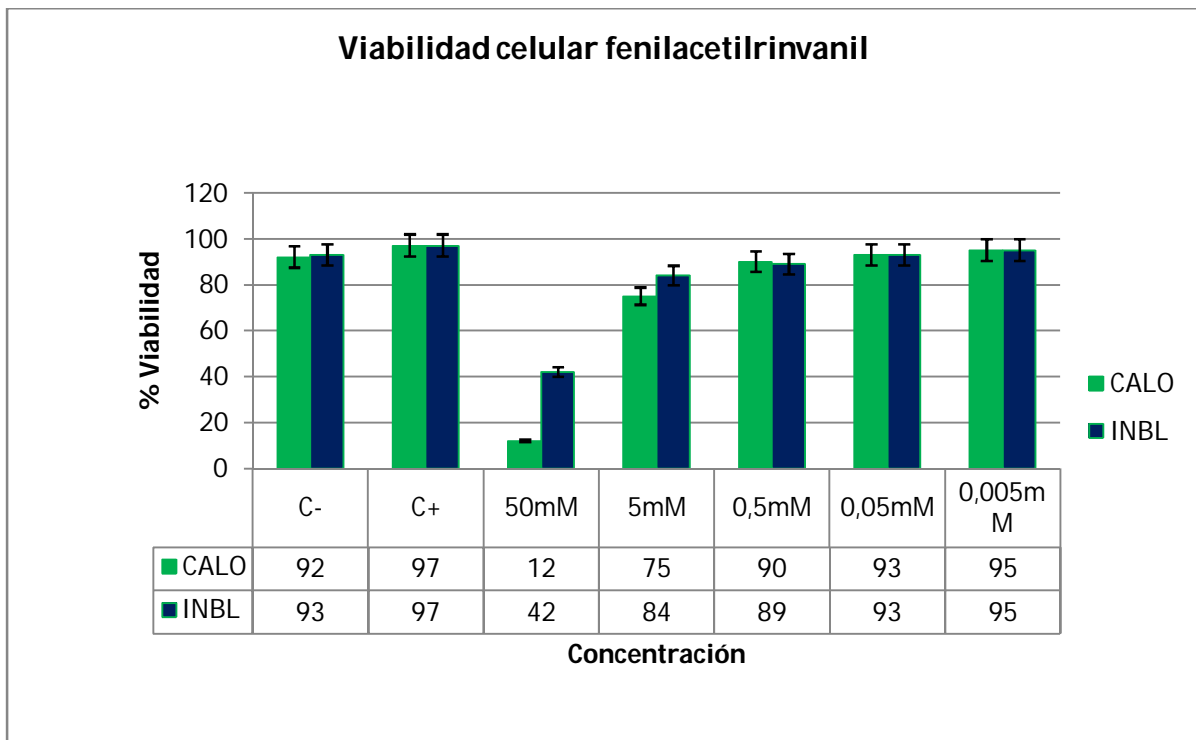


Figura VII.7. Efecto de fenilacetilrivanil sobre la viabilidad celular. Gráfica de porcentaje de viabilidad celular vs concentración en las líneas celulares de carcinoma de cervix CALO (barras de color verde) e INBL (barras de color azul), las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL sin estimular: Control negativo (-) y con 10 UI/ mL de IL-2 Control positivo (+) e incubadas por 4 horas con fenilacetilrivanil, estimuladas con 10UI de IL-2 por 35 minutos, utilizando la Técnica de azul tripano. Los resultados graficados son representativos de tres experimentos independientes.

En la Figura VII.8 observamos el efecto de los análogos sobre la viabilidad celular de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos Los linfocitos fueron incubados por cuatro horas con los inhibidores rivanil y fenilacetilrivanil a diferentes concentraciones, se realizaron controles en

células sin estimular y estimulados con 100UI/mL de IL-2 por 35 minutos. La viabilidad se cuantificó utilizando la técnica de azul trípmano y los datos obtenidos se graficaron en porcentaje de viabilidad vs concentración. Podemos observar en la gráfica que el comportamiento de los linfocitos con los inhibidores r y far, es diferente a las células tumorales, observamos que la disminución en el porcentaje de viabilidad es mínimo en comparación con los resultados obtenidos en los controles (C- ; 90 % y el C+; 96%), y que el mayor efecto de los inhibidores sobre la viabilidad se observa en las células tratadas con el rinvanil.

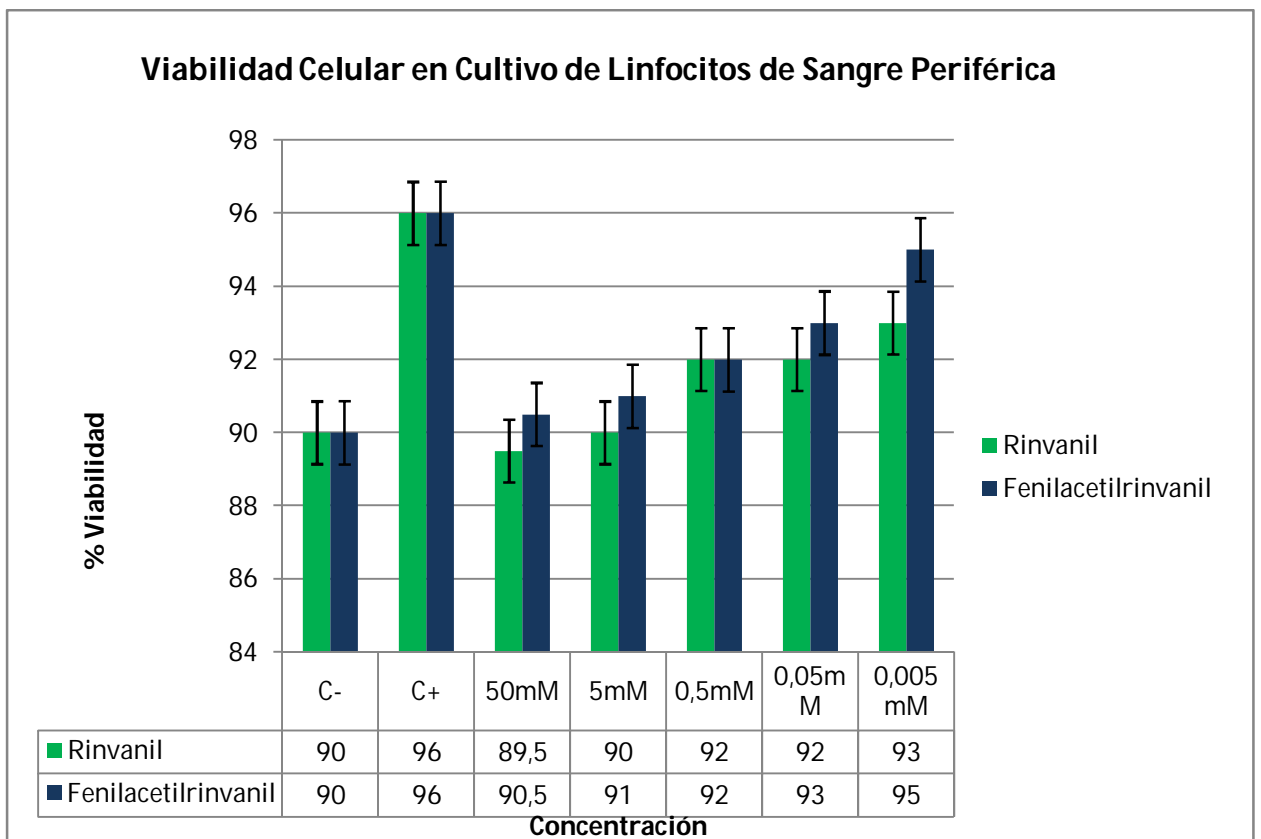


Figura VII.8. Efecto de los análogos de capsaicina sobre la viabilidad de cultivo de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. Gráfica de % Viabilidad celular vs Concentración de un cultivo de donadores sanos obtenidos por punción venosa, separados por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque los cuales sin estimular: Control negativo (-) y con 100UI/mL de IL-2 Control positivo (+), los cuales se incubaron por 4 horas con los inhibidores r (barras verdes) y far (barras azules) a diferentes concentraciones, estimuladas con 100 UI/mL de IL-2 por 35 minutos, utilizando la Técnica de azul trípmano. Los resultados graficados son representativos de tres experimentos independientes.

VIII. Análisis y Discusión de Resultados

Muchos compuestos pungentes son clasificados como vainilloides, por ejemplo la capsaicina y sus análogos³⁷. Estos productos botánicos, contienen moléculas vainilloides y han sido utilizados como agentes terapéuticos desde la antigüedad.

Para el presente trabajo fueron utilizados dos análogos de capsaicina, el rinvanil y el fenilacetilrinvanil que fueron sintetizados en la UMIEZ (Unidad Multidisciplinaria de Investigación y Estudios Zaragoza), Estos análogos de capsaicina son importantes candidatos para ser utilizados como inhibidores del crecimiento de células transformadas y en distintos desórdenes (inflamación, neuropatías diabéticas, etc.), ya que han mostrado gran especificidad, y que además carecen de pungencia. Estos análogos se sintetizan a partir de una estrategia quimioenzimática utilizando aceite de ricino (renovable y ampliamente disponible), esta es una valiosa alternativa para la síntesis de los análogos ultrapotentes de capsaicina. Este método utiliza propiedades quimioselectivas y regioselectivas que permiten obtener altos rendimientos, conforme a los métodos enzimáticos en contraste con las síntesis tradicionales, lo que hace al proceso más económico y que presente un rendimiento global mayor³⁶. Además, el uso de aceite de ricino hace que sea un proceso factible para aplicación a gran escala de la síntesis de dichos análogos de capsaicina.

42,46-48

Los capsaicinoides y los capsiatos son caracterizados por estar unidos a una molécula oxigenada aromática vía amida (capsaicinoides) ó éster (capsinoides) unidos a un grupo acil-lipofílico, las moléculas vainillil y carbonil contienen grupos polares capaces de formar enlaces de hidrógeno esenciales para la actividad.^{42,48,49} Recientemente muchos vainilloides han demostrado tener la habilidad para inducir apoptosis en varios tipos celulares, los vainilloides pueden interactuar con proteínas y membranas para iniciar efectos pleiotrópicos los cuales pueden ser potencialmente citotóxicos.⁴⁷ Muchos de los efectos asociados con la exposición de vainilloides ocurre vía la interacción entre vainilloides y receptores vainilloides, el reconocimiento específico de sitios de membrana que actúan de manera voltaje-independiente y son canales catiónicos relativamente no selectivos. Los receptores vainilloides son

expresados casi exclusivamente en neuronas primarias sensoriales asociadas a la nocicepción y a la inflamación neurogénica, Aunque estudios han demostrado que el receptor vainilloide también se encuentra presente en varios tipos de células transformadas (Jurkat, HeLa, BT-20, etc).^{42, 45, 47}

Los dos inhibidores utilizados en las líneas celulares CALO e INBL, se unen eficientemente y son inhibidores ultrapotentes de los Receptores Vainilloides de Potencial Transitorio tipo I (TRPV I). También pero se han encontrado diversos efectos sobre moléculas diferentes, tal es el caso del efecto del capsiato sobre la cinasa Src, es posible que estos inhibidores tengan efecto sobre otros miembros de la familia Src, como Lck.^{43,49}

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de Lck así como su participación en la vía activada por la IL-2. En los resultados del presente trabajo se pueden observar los posibles efectos biológicos que tienen los análogos de capsaicina R y FAR sobre las células de carcinoma de cérvix expuestas a diferentes concentraciones de dichos análogos. En los modelos moleculares los capsiatos y las estructuras relacionadas se acoplan eficientemente al sitio de unión de ATP del dominio catalítico de Src a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Los resultados obtenidos sugieren que los inhibidores R y FAR siguen el mecanismo de acción es el reportado (compiten por el sitio de unión de ATP), dando como resultado una inhibición en el patrón de fosforilación y en la activación de Lck.

En la línea celular CALO la inhibición del patrón de fosforilación se observa con ambos inhibidores (Figura VII.1). Sin embargo, para detectar el efecto del rinvanil sobre la activación de Lck (Figura VII.3) se observa que para la concentración de 50mM y 5mM hay una posible degradación de la proteína y una disminución de la activación de Lck en presencia de concentraciones menores. El efecto del far (Figura VII.1) sólo se observa una disminución de la actividad de la proteína cinasa utilizando 50mM. Por el contrario, para la línea celular INBL (Figura VII.2), se observa una inhibición del patrón de fosforilación, con el tratamiento con r a una concentración de 50mM como también de la activación de la cinasa Lck (Figura VII.3 A). Utilizando al rinvanil como inhibidor se puede observar que la concentración más alta parece inducir una posible degradación de la proteína, y que el tratamiento con far sólo induce una disminución de la actividad de la cinasa.

La línea celular INBL representa un estadio de transformación más avanzado²²,²³; además, la cinasa Lck se encuentra activa de manera constitutiva lo que nos hace suponer que es una línea celular más agresiva y de mayor resistencia a los tratamientos lo que sugiere que son necesarias concentraciones mayores o mayor tiempo de exposición, para poder causar algún efecto de inhibición, sobre la fosforilación y en consecuencia sobre la proliferación.

Estudios bioquímicos y electrofísicos han demostrado que la capsaicina excita a las células nociceptoras por el incremento de la permeabilidad a cationes de la membrana plasmática, se ha sugerido que los vainilloides se unen a canales catiónicos sobre las neuronas nociceptivas sensoriales para regular el consumo de Ca^{2+} el cual promueve neurotoxicidad resultando en apoptosis y necrosis.^{45,46} Estos efectos son manifestados por excitación seguida de la desensibilización debido a la elevada concentración intracelular libre de Ca^{2+} ; los receptores vainilloides pueden permanecer activos en los canales catiónicos una vez que los vainilloides se difunden y cruzan la membrana plasmática y se unen a dominios citoplásmicos de estos receptores. Es muy común saber que el exceso en la concentración de calcio disparado por la exposición a vainilloides puede romper la homeostasis de Ca^{2+} y promover la excitotoxicidad en neuronas nociceptivas. Elevaciones en la concentración de Ca^{2+} puede mediar en la muerte celular por apoptosis en varios sistemas celulares vía la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} como lipasas, proteasas y endonucleasas. Los vainilloides pueden causar la partición de la bicapa lipídica por medio de su lipofilicidad. Esta actividad tiene el potencial para alterar la fluidez de la membrana, el estado redox y las interacciones lipido-proteína. Se ha reportado que la capsaicina y las moléculas estructuralmente relacionadas que promueven la formación de un pseudocanal en la bicapa planar lipídica, además de alterar la estructura de la membrana plasmática y la fluidez de una manera concentración dependiente; también se encuentra reportado que promueve la peroxidación en células endoteliales las cuales están asociadas con la muerte celular.

En los ensayos de Viabilidad de Celular se puede observar el efecto de los análogos de capsaicina sobre la permeabilidad de la membrana de las líneas celulares CALO e INBL al ser incubadas con rinvanil (Figura VII.6) a una concentración alta (50mM) presentan comportamientos similares con viabilidad

baja de entre 22-24%. Sin embargo, al utilizar far (Figura VII. 7), se obtiene un efecto mayor sobre la viabilidad, por ejemplo, en la línea celular CALO se obtiene un porcentaje de viabilidad de 12% a una concentración de 50mM, lo que nos hace suponer que es un inhibidor mucho más potente que el rinvanil en esta línea celular. En el caso de INBL el porcentaje de viabilidad es de 42%, mayor que el obtenido con rinvanil a la misma concentración, por lo que parece ser menos eficiente en su efecto como inhibidor.

El uso de los análogos de la capsaicina sobre células no transformadas, como los linfocitos de donadores sanos (Figura VII.8) indujeron cambios significativos solo en la concentración mas alta 50mM en donde se obtienen viabilidades de 90% las que están muy cerca del control negativo, lo que sugiere que estos análogos sólo actúan sobre células transformadas.

Los vainilloides, además de interferir sobre los procesos enzimáticos en la membrana plasmática, funcionan en la mitocondria como antagonista de la coenzima Q, lo que puede generar la producción de especies reactivas de oxígeno y/o la ruptura de la homeostasis resultando en apoptosis. Además, muchos estudios han establecido que una gran variedad de estímulos pueden activar la fase efectora de la apoptosis vía permeabilización de membranas mitocondriales. Este fenómeno puede acoplarse con la formación de un poro proapoptótico por los miembros de la familia Bcl-2 (Bid y Bax) sobre la membrana exterior mitocondrial, y/o a través de la inducción de la permeabilidad transitoria de mitocondria (PTM), el cual es un proceso que esta asociado con la apertura de poros de proteínas los cuales incrementan la permeabilidad. Estos eventos pueden fracturar la membrana mitocondrial e inducir la liberación de proteínas solubles mitocondriales como citocromo C; la pérdida del citocromo C desde la mitocondria y/o la inducción de PTM resultarían en una catástrofe bioenergética en la respiración celular. En consecuencia los eventos asociados con la permeabilización de membranas mitocondriales pueden ser considerados el punto regulatorio en la vía de señalización de muerte.

Otro blanco importante a estudiar de la capsaicina y sus análogos es la NADH-oxidasa plasmática la cual se encuentra asociada a proteínas de la cadena de transporte de electrones (PMOR). Estos se localizan en sitios

específicos de las células de los mamíferos y se encuentran involucrados en procesos bioenergéticos y el mantenimiento de la homeostasis. Al parecer, PMOR se encuentra constitutivamente activada en células tumorales. Además, se encuentra involucrada en el control de la proliferación y el crecimiento celular por el mantenimiento de las reacciones de oxidación y reducción de nucleótidos de piridina en las células que utilizan la glucólisis para la producción de ATP (ejemplo las células que carecen de respiración mitocondrial). Se ha reportado que la inducción de la actividad de PMOR en células humanas transformadas y espontáneamente immortalizadas es la causa de la reducción del citocromo c extracelular iniciado por la generación de superóxido, así como la evidencia de un sitio de unión del O_2 en la coenzima Q terminal localizada en la parte externa de la superficie de la membrana en células carcinoma cervical humano (células HeLa).⁴² La PMOR muestra dos actividades enzimáticas, una como NADH-ferricianida reductasa en donde las funciones de la ferricianida extracelular son como aceptor artificial de electrones y la actividad de la NADH-oxidasa en donde el O_2 es el aceptor de electrones extracelular, se ha reportado que la actividad de la NADH-oxidasa aislada de las membranas plasmáticas de varios tipos celulares transformados fue inhibida por la capsaicina y por sus distintos análogos de manera dosis dependiente. Estas observaciones sugieren que algunos vainilloides pueden impedir la actividad de la NADH-oxidasa y de PMOR, teniendo función de antagonista de la coenzima Q de la membrana plasmática. La inhibición de PMOR- mediada por la ruptura de la homeostasis ó a través del incremento ó la supresión de la producción de ROS, al parecer se encuentra íntimamente asociada con la inducción de apoptosis por la capsaicina y sus análogos en ciertos tipos celulares transformados.⁴⁷

La evolución de las células eucariontas para explotar la inesperada bioenergética asociada con endosimbiosis y la advertencia de control nuclear (por ejemplo, p53 y miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2), también cuentan con un mecanismo intrínseco para el inicio de la apoptosis a través de la liberación de proteínas apoptogénicas solubles mitocondriales para iniciar la apoptosis. Una ruptura en los procesos bioenergéticos pueden producir un exceso de la generación de ROS bajo ciertas condiciones que son potencialmente perjudiciales para las funciones celulares mitocondriales y

otras. Así también se ha sugerido la vía intrínseca de la apoptosis, regulado por el PTM, suprimiendo a las células productoras de ROS para mantener la homeostasis en los tejidos. La interrupción del flujo de electrones del complejo I que puede hacer no enzimática la producción de ROS debido a los ciclos redox de los transportadores de electrones reducidos cascada arriba del sitio de inhibición. Con todo lo anterior se sugiere que los capsiatos (rinvanil y fenilacetilrinvanil), han demostrado tener la capacidad de inducir apoptosis en varios tipos celulares incluyendo las células transformadas, siguiendo los mismos mecanismos citotóxicos que la capsaicina y los estructuralmente relacionados. Ciertamente estas moléculas se unen con receptores de canales catiónicos que regulan la entrada de Ca^{2+} que promueve la apoptosis y necrosis, además de pueden interferir con procesos en la mitocondria y membrana plasmática al funcionar como antagonista de la coenzima Q, lo que promueve la producción de especies reactivas de oxígeno ROS y/o la ruptura de la homeostasis resultando en la apoptosis.⁵¹⁻⁵²

IX. CONCLUSIONES

- Los Resultados demuestran que los análogos no pungentes de la capsaicina, el rinvanil y el fenilacetilrinvanil, afectan la viabilidad celular, causan inhibición del patrón de fosforilación de proteínas e inhiben la presencia de la cinasa Lck que es desencadenada por la estimulación de la IL-2 en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.
- Además se considera de gran relevancia los resultados del control normal que se realizó en linfocitos de sangre periférica obtenidos de donadores sanos, en donde no se ven afectados de manera significativa, ni la viabilidad celular, el patrón de fosforilación de proteínas y la presencia de la cinasa Lck.
- Por lo tanto, se consideran como posibles candidatos al rinvanil y al fenilacetilrinvanil para el tratamiento de carcinoma de cérvix teniendo un mayor efecto sobre células en estadios tempranos en el desarrollo del tumor.

X.PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de los compuestos análogos de la capsaicina sobre la proliferación in vivo y evaluar la toxicidad.
- Realizar ensayos de proliferación por diversos métodos para evaluar la capacidad inhibitoria de los análogos.
- Realizar curvas dosis-respuesta y curvas temporal de los compuestos ALJ-480 y ALJ-JC
- Realizar ensayos analizando el efecto de los mismos compuestos en las líneas celulares CALO e INBL

XI.ANEXOS

MATERIAL Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

- Líneas celulares CALO (estadío IIB) e INBL (estadío IVB) establecidas en la Unidad de Investigación y Diferenciación Celular y Cáncer.
- Medio de cultivo comercial RPMI-1640 (anfotericina B, Penicilina G y estreptomycin (in Vitro).
- **Suero fetal bovino**, se recomienda que este sea inactivado (baño de agua a 56° C durante 30 minutos) mantenerlo en refrigeración.
- Albúmina bovina libre de inmunoglobulina BSA (Sigma, USA).
- Reactivo A y Reactivo B (Bio-Rad Dc Protein Assay).
- Anticuerpos antifosfotirosina y anti Lck (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- **Buffer de Laemli**: Tris 0.0625M pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de bromofenol 0.02% la concentración es 5x.
- **DTT 0.1M**
- **Solución de Verseno [50mM]**: Disolver 0.2g de EDTA y adicionar 3.04g de Tris, 8g de NaCl, 0.4g de KCl, ajustar a pH 7.7 y aforar a 1000mL, finalmente se esteriliza en autoclave a 20lb de presión por 20 minutos y se mantiene en refrigeración.
- **Buffer de lisis**: En 10mL de agua destilada se agrega 500µL de Tritón X-100 (esperar a que este completamente disuelto), Adicionar 500µL de PMSF 0.1M, 50µL de ortovanadato de sodio 0.1M, 100µL de EDTA 0.5M, 1.5mL de NaCl 5M, 3mL de NaF 0.5M, 1mL de pirofosfato de sodio 0.1M y 500µL de Tris 5M pH 7.5 se completa a un volumen de 50mL. Mantenerlo en refrigeración.
- **Buffer de Lisis total**: al buffer de lisis se le adicionan 500µL de Aprotinina [100mg/mL] y 500µL de Pepstatina [100mg/mL].
- **Buffer de fosfatos (PBS) pH 7.2**: se disuelve 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 0.4g de KH₂PO₄, 2.88g de Na₂HPO₄, ajustar el pH y aforar a 1000mL.
- **Tris buffer salino**: para preparar 1000mL se requieren 30mL de NaCl 5M y 20mL de Tris 1M pH 7.5 y completa al volumen con agua bidestilada.

- **Tris buffer salino-Tween (TBS-Tween):** para preparar 500mL se le adicionan 0.5mL de Tween.
- **Gel para electroforesis (SDS-PAGE):** para el gel separador, se requieren los siguientes reactivos: 3.33mL de acrilamida-Bis-acrilamida (30g de acrilamida y 0.8g de Bis-acrilamida), 1.25mL de Tris 1M pH 8.8, 0.1mL de SDS al 10%, 0.5mL de persulfato de amonio al 1.5%, 4.8mL de Agua bidestilada, 0.015mL de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED). Para el gel concentrador: se requiere 0.625mL de acrilamida-bisacrilamida ,1.25mL de Tris 0.375M pH 6.8, 0.05mL de SDS al 10%, 0.25mL de persulfato de amonio al 1.5%, 2.8 mL de agua bidestilada y 0.0075mL de TEMED.
- **Buffer de Corrida I:** Se requieren 5g de SDS, 72g de Glicina y 15.5g de Tris se ajusta a pH 8.3 y se afora a 1000mL.
- **Buffer de transferencia II:** para preparar 1000mL se disuelven 3.03g de Tris, 14.4g de Glicina y 0.5g de SDS en 700mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 8.3 y afora con metanol a 1000mL.
- **Método de quimioluminiscencia:** Las proteínas se observaron mediante quimioluminiscencia, utilizando el kit Super signal West Pico Chemilumiscent substrate (Pierce), y colocando las membranas en contacto con película fotográfica.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Valle A, Weiss B. origen molecular del cáncer. Vertientes. 2003; **6** (1): 3-8.
2. López R, La Regulación del Ciclo Celular y el Cáncer, Vertientes, Revista Especializada en ciencias de la Salud **6**(1): 40-44.
3. Soto I, Transducción de señales y Cáncer, Vertientes, Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 2003 **6**(1): 45-50.
4. Legorreta M, Molina M, Machuca C, Retana R, Roldán E, Rodríguez J, Manual de Prácticas para el Laboratorio de Genética Clínica Parte 1, México: UNAM 1 ed, 2007, pp41-48.
5. Croce M, Molecular Origins of Cancer: Oncogenes and Cancer, N Engl J of Med, 2008; **358**:502-11.
6. Secretaria de Salud, Norma Oficial Mexicana, NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y vigilancia epidemiológica de Cáncer Cervicouterino, México 1998. pp6.
7. INEGI/SS, Dir Gral. de información en salud. En base de defunciones 2005, México 2005.
8. Boletín de información científica ICCE/ SS Prevención de Cáncer cervicouterino, junio 2007.
9. Kasper L. Dennis, Braunwald E., Fauci S. Anthony, *Et al* Harrison Principios de Medicina Interna, México: Mc Graw Hill 16ed, 2009:2657-58,2686-98,2712-22,2727,2741,2752-52,2762-65. Hollstein M, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in Human Cancers. Sci, New series. 1991. **253**:49-53.
10. Hollstein M, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in Human Cancers. Science, New series. 1991; **253**:49-53.
11. Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New Approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. Mutation Research. 1994 **431**:199-209.
12. Trevor M. Chemical carcinogenesis, Philadelphia, USA, Springer 2010. pp. 1-20
13. Almonte M, Murillo R, Sánchez G, Salmerón J, Ferreccio C, Lazcano-Ponce E, Herrero R, Nuevos paradigmas y desafíos en la prevención y control del cáncer de cuello uterino en América Latina Salud Pública Méx 2010; **52**(6):544-559.
14. López -Saavedra y Lizano-Soberón, Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. Cancerología 1 (2006); **1**: 31-55

15. Lizano M, García Carránca A, Las variantes moleculares de Papiloma Humano Tipo 16,18 y 45 en tumores de cuello uterino en México. *Gac. Med. Mex. México* 1997; **133**:1-6.
16. Hausen H, Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis, *J Nat Cancer Institute*, 2000;**92**(9):690-98.
17. Caceres J.R, Alvarado J.A, Waga K, Rangel R, Monroy A, Rocha L, Urdiales J, Weiss B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Implication of Tyrosine Kinase Receptor and Steel Factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias, *Cancer Research*, 2001; **61**: 6281-6289.
18. Monroy A, Rangel R, Rocha L, Trejo C, Ramírez J.L, Dario R, Weiss B, Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias cérvix normal y con cáncer cérvicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleina 1, *Oncología* 1992; **7**:69-76.
19. Lodish F. H, Baltimore D, Darnell E. J, *Molecular Cell Biology*, 5th Edition, USA : Freeman and company, 2004. pp 533-535
20. Soto I, Cáceres J, Flavio J, Las citocinas en la hematopoyesis y sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares, México: Plaza y Valdés Editores, 1999. pp.143-60.
21. Meager A, *Cytokines*, New Jersey: Prentice-Hall, 1994.
22. Abbas A, Lichtman A, Pober J, *Cellular and Molecular immunology*, 5^{ta} ed, USA: W.B Saunders Company; 2004. pp240-241,251-252.
23. Waldmann T.A, The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 2006; **6**: 595-601.
24. Rebollo A, Silva A, *Estructura y Función del Receptor de IL-2*, Madrid, *Inmunología*, 1994; **13**: 39-47.
25. Epstein A, Mizokami M, et al, Identification of a Protein Fragment of Interleukin 2 Responsible for Vasopermeability, *J of the Natl Can Ins*, 2003; **10**:741-749.
26. Rocha-Zavaleta L, Huitron C, Caceres- Cortés JR, Valle A, Soto I, et. al Interleukin-2 (IL-2) receptor- By 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* 2004; **16**: 1239-47.
27. Willow W 948x1014x8 (239072 bytes) Ribbon diagram of the SH2 domain from p56-Lck tyrosine kinase (PDB accession code 1kk, chain A) Made with MOLMOL.
28. Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M, Seddon B, The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation, *Immu Rev*, 2003; **191**:101-16.
29. Mingjian S, Cooper J, and Chao Lan Y. A constitutively active Lck kinase promotes cell proliferation and resistance to apoptosis through signal

- transducer and activator of transcription 5b activation. *Mol Res*, 2006; **4**(1):39-45.
30. Valle A, Vía JAK-STAT: Una visión General, *Vertientes, Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 2005; **8**(1-2):14-25.
 31. Papac R. Origins of cancer therapy, *Yale J of biology Med* 2001; **74**:391-398.
 32. Morrison W, *Cancer chemotherapy: an annotated history*, *J Vet Intern Med* 2010; **24**:1249-1262.
 33. Bruce A, Thomas G. Chemotherapy and the war on cancer, *Nat Rev* 2005; **5**: 65-72.
 34. Gerber D, Targeted Therapies: A New Generation of cancer treatments of Cancer Treatments, Downloaded from the American Family Physician Web site at www.aafp.org/afp. Copyright © 2008 American Academy of Family Physicians, **8** (5): 311-319
 35. Surh Y, Lee S, Capsaicin in hot chili pepper : Carcinogen, Co-carcinogen or Anticarcinogen?, *Fd Chem. Toxic*, 1996: 313-316.
 36. Joon Y, Lee E, Min Lee J, Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger, *Mut Res*, 1998; **402**: 259-267.
 37. Winter J, Bevan S, Campbell A, Capsaicin and pain mechanisms, *British J of anaesthesia*, 1995; **75** : 157-168.
 38. Tominaga M, Julius D, Capsaicin Receptor in the pathway, *J. Pharmacol*, 2000; **83**:20-24.
 39. Macho A, Lucena C, Sancho R, Non-Pungent capsaicinoids from sweet pepper : Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential, *Eur J Nutr*, 2003; **42**:2-9.
 40. Caterina M, Shumacher M, Tominaga M, Rosen T, Levine J, Julius D, The Capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* , 1997; **389**: 816-824.
 41. Castillo E, Regla I, Demare P, Luviano A, and Lòpez A, Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Phenylacetylirvanil: An Ultrapotent Capsaicinoid, *SYNLETT* 2008; **18**: 2869-2873.
 42. Morré J, Chueh P, Morré D, Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci . USA*, 1995; **92**: 1831-1835.
 43. Jeong B, Choi S, Lee Y, Kim T, Min J and Kwon Y, Capsiate, a Nonpungent Capsain-Like Compound, inhibits Angiogenesis and Vascular Permeability via a Direct inhibition of Src Kinase Activity, *Cancer Res* , 2008; **68**(1):227-235.
 44. Nagy I, Sántha P, Jancso G, Urbán L, The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology, *Eur J of Pharmacol*, 2004; **500** :351-369.
 45. Vriens J, Appendino G, Nilius B, Pharmacology of Transient Receptor Potential Cation Channels, *Mol Pharmacol*, 2009; **75**: 1262-1279.
 46. Gunthorpe M, Benham C, Randall A, Davis J, The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, *TRENDS in Pharma Sci*, 2002; **23**(4): 183 -190.

47. Numsen H Jr, Mechanism of vanilloid-induced apoptosis, *Apop*, 2003; **8**: 251-262.
48. Appendino G, Minassi A, N-Acetylvanillamides: Development of an expeditious synthesis and discovery of a New Acyl Templetates for powerful activation of the vanilloid receptor, *J. Med. Chem*, 2002; **45**:3739-3745.
49. Appendino G, De Petrocellis L, Trevisani M, Minassi A, Daddario N, Shiano A, Gazzieri D, Ligresti A, Camp B, Fontana G, Pinna C, Geppetti P, and Di Marzo V, Development of the First Ultra-Potent "Capsaicinoid" Agonist at Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channels and its Therapeutic Potential, *J of Pharma and Experimental Therapeutics*, 2005; **312**(2):561-570.
50. Klener P, Andéra L, Nécas E, Zivny J, Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways, *Praha*, 2006; **52**:34-44.
51. Heyninck K, Beyaert R, A novel link between Lck, Bak expression and chemosensitivity, *Oncogene*, 2006; **25**: 1693-1695.
52. Szallasi A, Blumberg P, Vanillin (Capsaicin) Receptors and mechanisms, *Pharm Rev*, 2011; **51**:2: 153-211

