



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Expresión de caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de
cáncer cervicouterino VIB0 y C33 en presencia de IL-2.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Leonardo Trujillo Cirilo

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosalva Rangel Corona

México DF, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **TRUJILLO CIRILO LEONARDO**, con número de cuenta **405032495**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **7** del mes de **febrero** de 2012 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. BENNY WEISS STEIDER
 VOCAL M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
 SECRETARIO DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO
 SUPLENTE M. EN C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
 SUPLENTE BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

El título de la tesis que presenta es: **Expresión de caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer cervicouterino VIBO y C33 en presencia de IL-2.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D. F., a 6 de diciembre de 2011.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR

ZARAGOZA
 DIRECCIÓN

RECIBÍ
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

VO BO
 DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ
 JEFE DE CARRERA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer Lab-4 pb, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ, de la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM. Bajo la dirección de la Dra. Rosalva Rangel Corona y la Dra. Teresa Corona Ortega, con la asesoría del Dr. Benny Weiss Steider.

Este trabajo conto con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, clave de proyecto IN220108 y del programa PAPIME de la DGAPA, clave del proyecto: PE208810.

AGRADECIMIENTOS.

A MI ASESOR.

Un maestro es aquella persona que dedica parte de su tiempo y conocimiento, para forjar el éxito de sus alumnos.

Gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por confiar en mí para realizar esta tesis.

Gracias por todo su apoyo e interés en la realización de este trabajo.

Dr. Rosalva Rangel Corona.

A MIS AMIGOS DE LABORATORIO.

La amistad es uno de los dones más importantes que puede tener el ser humano, la amistad comprende más que un momento de diversión, son momentos de tristeza, confianza, compañerismo, respeto, pero sobre todo de lealtad.

Gracias por ser unas de las personas más importantes en mi vida, por haberme compartido parte de su conocimiento, por haber hecho de mi estancia en el laboratorio una experiencia agradable.

Luz; gracias por haber sido un buen maestro, el cual comparte sus conocimientos con alegría sin esperar nada a cambio, además de haber forjado una amistad verdadera.

Tanys, Chen, Luis; gracias por ser unos buenos cómplices de diversión, por estar en todo momento conmigo, por dedicarme parte de su tiempo y sobre todo porque puede decir que son mis amigos.

Edit, Edgar, Dany, Carlos (Proff), Itzel, Ruby, Migue, Karla, Ana; gracias por estar en los momentos de diversión, de compañerismo y sobre todo por permitirme formar parte de sus alegrías.

A MIS AMIGOS DE LA CARRERA.

Martha, Arturo (artur), gracias por ser de las primeras personas que me dieron momentos de alegría en la carrera, por ser de los primeros amigos verdaderos.

Alma, Cesia, Diana, Bety, gracias por haberme permitido formar parte de su vida, por haber compartido sus momentos felices (bodas), por ser personas de buen corazón.

Carmelo, Chen, Luis (niño), Edgar, gracias por ser la buena onda, por hacer de las horas de clase lo más agradable posible, por hacer de las salidas de campo momentos de nostalgia.

A MIS AMIGOS.

La amistad crea un vínculo que ni la distancia, la ausencia, y los malos entendidos pueden romper.

Yarely, Geraldine, Raquel, Isra, Piter, Eleazar, Marisela, Luis, Dany, Pato, Juan.

GRACIAS.

Gracias por haberme mostrado el rumbo hacia la biología: **Maestra. Teresita de Jesús**

Gracias por confiar en mí e impulsarme en lograr las metas que me proponga: **Dr. Armando Isibasi Araujo.**

Gracias por compartir su conocimiento: **Dra. Teresa Corona Ortega.**

Gracias a mis revisores de tesis:

Dr. Benny Weiss Steider.

Dr. Mario A. Altamirano Lozano.

M en C. Hugo López Muños.

Biol. Reynalda Roldan Pérez.

Gracias por ser un técnico de laboratorio dedicado: **Don José.**

DEDICATORIAS.

A MI MADRE.

Gracias mamá porque me has dado tanto, sin tu apoyo y confianza no habría podido cumplir mis objetivos.

Gracias por haber estado en todo momento conmigo, preocuparte cuando yo estaba preocupado, reírte cuando yo estaba alegre y llorar cuando era necesario.

Gracias por ser un buen ejemplo en mi vida, un ejemplo de esfuerzo, honestidad, humildad, honradez, y sobre todo de amor a la familia.

Gracias por haberme enseñado a ser una persona comprometida, a respetar las normas, pero estar en desacuerdo cuando no sean justas.

Las palabras no son suficientes para agradecerte por todo.

Guadalupe Cirilo Flores

A MIS HERMANOS.

Un hermano es como el mejor de los amigos, pero siempre está en casa.

Un hermano comparte sueños y metas, en las cuales siempre está presente la familia.

Gracias a todos mis hermanos por haberme apoyado en mis sueños, de interesarse en mis problemas, de ser honestos y leales con mí persona.

Gustavo (Guss), Rosa (Ro), Guadalupe (Iupita), Alfredo (Alfre), Alicia (Aly) y Adrian.

Gracias a la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM.** Por abrirme las puertas del éxito.

**Expresión de caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer
cervicouterino VIBO y C33 en presencia de IL-2.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

LEONARDO TRUJILLO CIRILO

MÉXICO, DF, 2012



ÍNDICE.



LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
MARCO TEÓRICO	13
APOPTOSIS	14
CASPASAS	15
CASPASA-3	18
CASPASA-9	19
VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS	19
VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS	21
MOLÉCULAS PRO Y ANTI APOPTÓTICAS	24
FAMILIA BCL-2	24
IAPs	24
C-FLIP Y OTROS REGULADORES	25
FASE FINAL DE LA APOPTOSIS	26
FUNCIONES NO-APOPTÓTICAS DE LAS CASPASAS	27
CITOCINAS	28
IL-2	29
CÁNCER CERVICOUTERINO	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
ANTECEDENTES DIRECTOS	34
HIPÓTESIS	35



OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
CULTIVO DE CÉLULAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO VIBO Y C33	37
ESTIMULACIÓN CON IL-2	37
EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO	38
CUANTIFICACIÓN DE RNA	38
RETOTRANSCRIPCIÓN RT	38
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	40
ELECTROFORESIS	42
RESULTADOS	43
EXPRESIÓN DE B-ACTINA	44
EXPRESIÓN DE CASPASA-3 Y CASPASA-9 EN LA LÍNEA CELULAR CALO	45
EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN C33	46
EXPRESIÓN DE CASPASA-9 EN C33	47
EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN VIBO	48
EXPRESIÓN DE CASPASA-9 EN VIBO	49
EXPRESIÓN DE CASPASA-3 Y CASPASA-9 EN LAS LÍNEAS CELULARES C33 Y VIBO	50
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58
REFERENCIAS	60
ANEXOS	68



LISTA DE ABREVIATURAS.



ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
ADN_c	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO COMPLEMENTARIO
AIF	FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS
APAF-1	PRIMER FACTOR ACTIVADOR DE PROTEASAS APOPTÓTICAS
Asp	ÁCIDO ASPÁRTICO
ATP	ADENOSINA 5-TRIFOSFATO
BH	DOMINIO DE HOMOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2
BIR	REPETICION IAP DEL BACULOVIRUS
CaCu	CÁNCER CERVICOUTERINO
CARD	DOMINIO RECLUTADOR DE CASPASAS
Cc	CITOCROMO C
CED	MUERTE CELULAR ANORMAL
cm³	CENTÍMETROS CÚBICOS
Da	DALTONES
DAXX	DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A PROTEÍNAS
DD	DOMINIO DE MUERTE
DED	DOMINIO EFECTOR DE MUERTE
DISC	COMPLEJO DE SEÑALIZACIÓN DE MUERTE
FADD	DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A FAS
FBS	SUERO FETA BOVINO
FN-kB	FACTOR NUCLEAR KB



IAP	PROTEÍNA INHIBIDORA DE APOPTOSIS
IL-2	INTERLEUCINA-2
IL-2R	RECEPTOR DE INTERLEUCINA-2
KD	KILO DALTONES
mL	MILILITRO
MPT	PERMEABILIZACIÓN TRANSICIONAL MITOCONDRIAL
NAIP	PROTEÍNA INHIBIDORA DE APOPTOSIS NEURAL
NK	CÉLULAS NATURALES ASESINAS
nm	NANÓMETROS
Pb	PARES DE BASES
PBS	TAMPÓN FOSFATO
PCR	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PROC-X	PROCASPASA-X
RD	RECEPTOR DE MUERTE
RE	RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
RNA_m	ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO
RT	RETO-TRANSCRIPCIÓN
RX	REACCIÓN
SMAC	SEGUNDO ACTIVADOR MITOCONDRIAL DE CASPASAS
TBE	AMORTIGUADOR TRIS ÁCIDO BÓRICO-EDTA



TNF	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
TNFR	TNF RECEPTOR
TRADD	DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A TNFR
UI	UNIDADES INTERNACIONALES
VPH	VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
XIAP	PROTEÍNA INHIBIDORA DE APOPTOSIS LIGADA AL CROMOSOMA X EN MAMÍFEROS
μL	MICROLITRO
μg	MICROGRAMO



LISTA DE FIGURAS

FIG 1. Estructura y organización de los dominios en las caspasas-----	12
FIG 2. Representación de las dos vías de la apoptosis-----	22
FIG 3. Expresión de β -actina-----	34
FIG 4. Expresión de caspasa-3 y -9 en la línea celular CALO-----	35
FIG 5. Expresión de caspasa-3 en la línea celular C33-----	36
FIG 6. Expresión de caspasa-9 en la línea celular C33-----	37
FIG 7. Expresión de caspasa-3 en la línea celular VIBO-----	38
FIG 8. Expresión de caspasa-9 en la línea celular VIBO-----	39
FIG 9. Expresión de caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas C33 y VIBO-----	40



RESUMEN.



El proceso de muerte celular programada ó apoptosis, se caracteriza generalmente por distintas características morfológicas y bioquímicas dependientes de energía. La apoptosis es considerada un componente vital de varios procesos biológicos, en los que se incluye la renovación celular (homeostasis) y el funcionamiento del sistema inmunológico. Alteraciones en el proceso de apoptosis, son consideradas como un factor en el desarrollo de muchas enfermedades, incluidas las neurodegenerativas y muchos tipos de cáncer. Por tanto, las investigaciones siguen centrándose en el esclarecimiento y análisis de la maquinaria del ciclo celular, así como las vías de señalización que controlan el proceso de apoptosis. Actualmente, se realizan trabajos de investigación básica para diseñar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer. Entre ellas se encuentra el uso de citocinas como la interleucina-2 (IL-2), la cual se sabe es secretada por linfocitos T para inducir una respuesta antitumoral. En particular nuestro grupo de investigación, en el Laboratorio de Oncología Celular, ha demostrado que la IL-2 tiene un efecto antitumoral en células de Cáncer Cervicouterino (CaCu) ya que las induce a una muerte por apoptosis. Se sabe que en este proceso participan diferentes moléculas, como las caspasas.

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica, inducida por una diversidad de estímulos. Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores. Las caspasas ejecutoras son activadas mediante el corte específico mediado por las caspasas iniciadoras. Estas proteasas son las encargadas de los cortes finales de sustratos que provocan la morfología típica de la apoptosis. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue determinar la regulación de los productos de amplificación para el gene de caspasa-9 (iniciadora) y la caspasa-3 (ejecutora), en cultivos celulares de las líneas CaCu C33 y VIBO negativas al VPH, cultivadas en ausencia y presencia de 100 UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos.

Por medio de la extracción de RNA mensajero y la técnica de RT-PCR, se obtuvieron productos de amplificación para las caspasas-9 y caspasa-3. Los resultados demuestran que en las líneas celulares C33 y VIBO están transcribiendo constantemente el RNA mensajero para ambas caspasas, con una mayor expresión de caspasa-9 en relación a caspasa-3. Por otra parte la presencia de 100 UI/mL de IL-2, no modifica esta expresión. Y el estadio del tumor no determina la respuesta de las líneas celulares a IL-2.

Las caspasas representan un nuevo paradigma en la transducción de señales y se encuentran implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos. En un futuro podrían servir como marcadores de procesos patológicos y como blanco de nuevas terapias.



MARCO TEÓRICO.



El cuerpo humano se encuentra inmerso en el proceso de la evolución. Las funciones normales del organismo requieren de grandes y continuas renovaciones de poblaciones celulares, por lo que existe el riesgo de que cada división celular pueda ser el inicio de algún cambio que conlleve a una transformación maligna. En este contexto el cáncer puede ser el precio de la multicelularidad y una fuerte selección de los organismos multicelulares [1].

La carcinogénesis es reconocida como la evolución somática, pero en este contexto en realidad compiten dos procesos evolutivos: el potencial de las células cancerígenas, que evolucionan con adaptaciones para superar los mecanismos supresores de tumores del organismo hospedador y las estrategias evolutivas del organismo para reducir la probabilidad de muerte por cáncer antes y durante la reproducción natural [2].

De hecho, la vida y la muerte de las células es un proceso equilibrado ya que las células cuentan con un mecanismo intrínseco de autorregulación llamado muerte celular programada o apoptosis [3].

APOPTOSIS

La apoptosis se da normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento como un mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares de los tejidos. La apoptosis también, ocurre como un mecanismo de defensa a reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por agentes patogénicos o tóxicos [4]. Aunque hay una gran variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicas como patológicas que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células morirán necesariamente en respuesta al mismo estímulo [5].

Otro tipo de muerte celular que se puede presentar es la necrosis. La necrosis es un proceso pasivo accidental que ocasiona la ruptura de la membrana celular y la degradación progresiva de las estructuras celulares en respuesta a perturbaciones ambientales violentas como la hipoxia/isquemia, temperaturas extremas y mecanismos trauma. Este tipo de muerte celular está asociada con la hinchazón de los organelos y la inflamación [6].

Por el contrario, la apoptosis ó muerte celular programada requiere de un aporte energético para la función de la maquinaria intracelular, la apoptosis está rígidamente regulada y es conservada a lo largo de la evolución [7]. La apoptosis afecta a una sola célula de forma asincrónica, por lo general en ausencia de inflamación [6]. Todo este proceso está controlado por un gran número de moléculas, entre las que se encuentran las caspasas.



CASPASAS

Las caspasas pertenecen a la familia de cisteína proteasas las cuales tienen un papel importante en la regulación de la apoptosis. Una década de investigación ha generado una gran cantidad de información, sobre las vías de transducción de señales reguladas por las caspasas y los mecanismos por los cuales median la apoptosis en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos [8].

Las caspasas son proteínas de cistein-aspartato con actividad catalítica, que cortan sustratos con residuos de ácido aspártico (Asp). El primer miembro conocido de esta familia fue la caspasa-1, también llamada interleucina-1 β convertidora (ICE), enzima necesaria para la maduración de IL-1 β [9,10].

Posteriormente en 1993 la clonación del gen CED-3 (CED muerte celular anormal), pro-apoptótico obtenido de *C-elegans*, reveló que éste codifica para una proteína altamente homóloga a ICE. Desde entonces por lo menos 14 caspasas en mamíferos y cinco en *Drosophila* han sido clonadas [11]. Hasta la fecha en el genoma humano se han encontrado 11 genes que codifican para caspasa-1 a caspasa-10 y caspasa-14. Mientras que para el genoma de ratón se han descrito 10 genes que codifican para las caspasas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, y 14. En el ser humano la caspasa-4 y -5 son ortólogos funcionales de la caspasa-11 y -12 en ratón, mientras que la caspasa-10 está ausente en el genoma del ratón. Las caspasas que quedan con el mismo número en humano y ratón son funcionales-ortólogos entre sí [12].

Las caspasas se pueden clasificar en base a su función principal en dos subfamilias que se denominan pro-apoptóticas y pro-inflamatorias. Las caspasas pro-apoptóticas; caspasa-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 tienen funciones principalmente implicadas en la traducción de señales de muerte, mientras que las caspasas pro-inflamatorias; caspasa-1, -4, -5, -11, -12 regulan la maduración de citocinas durante la inflamación. Esta clasificación, puede ser algo simplista ya que existe evidencias que indican que las caspasas tienen múltiples roles en diferentes procesos celulares [13].

Una clasificación alternativa es dividir a las caspasas de acuerdo a la longitud de sus predomios, los cuales se correlacionan con su posición en la cascada de señalización del proceso de apoptosis. Con base a esta clasificación las caspasas se dividen en caspasas iniciadoras que incluyen a caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 y las caspasas efectoras caspasa-3, -6, -7. Las caspasas iniciadoras poseen predomios largos los cuales presentan uno de los dos motivos de interacción de proteína-proteína: el dominio efector de muerte (DED) ó el dominio reclutador de caspasas (CARD); estos dominios participan interactuando con moléculas adaptadoras. Por su parte, las caspasas efectoras poseen dominios cortos, los cuales realizan diferentes pasos de ejecución río abajo, en múltiples sustratos clave para el proceso de apoptosis, estas caspasas son



procesadas y activadas por caspasas río arriba (Figura 1a). Cabe señalar que la relación río arriba no es absoluta, ya que pueden existir sólo en las primeras fases durante la apoptosis [13].

Normalmente las células presentan caspasas, en forma de precursores inactivos, llamados zimógenos. A pesar de esto las caspasas zimógeno contienen una pequeña actividad catalítica, que se mantiene controlada por una variedad de moléculas reguladoras. Al recibir una señal de apoptosis, las caspasas zimógeno sufren un procesamiento proteolítico que genera dos subunidades para conformar a la enzima activa [12,14].

Los estudios han demostrado que las pro-caspasas son sintetizadas como proenzimas tripartidas, catalíticamente-inactivas, una sola cadena polipeptídica de 32-35 kDa representada por 3 dominios en común; con un dominio interno de gran tamaño (p20) de 17-21 kDa conocido como gran subunidad catalítica (centro activo), un dominio pequeño (p10) de 10-13 kDa también llamada subunidad catalítica pequeña, presente en el carboxilo terminal (C-terminal), también posee un prodominio amino terminal (NH₂-terminal) de 3-24 kDa, llamado dominio de muerte (DD). En diferentes procaspasas (zimógeno) las subunidades p10 y p20 están separadas por una pequeña secuencia conectora. El gran prodominio N-terminal de las procaspasas contiene de 80-100 residuos los cuales son motivos estructurales de la superfamilia de receptores de muerte que participan en la transducción de señales apoptóticas [15,16]

Los DD de las caspasas presentan dos subdominios, el dominio efector de muerte (DED) y el dominio reclutador de caspasas (CARD), el cual es crítico río abajo, debido a que recluta caspasas a la membrana plasmática para su posterior activación. El DED y CARD están compuestos por 6-7 α -hélices anti-paralelas y anfipáticas, que interactúan con otras proteínas homotípicas, a través de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas [17,18]

La activación de los zimógenos por divisiones proteolíticas separa la subunidad grande y pequeña, eliminando el prodominio. El residuo catalítico de la subunidad p20 consisten en un sitio activo llamado Cys285 que conserva una secuencia pentapeptídica QACXG y His237 (caspasa-1) [12].

Cada procaspasa inactiva es activada en respuesta a señales específicas, debido a procesos proteolíticos selectivos de residuos de ácido aspártico (Asp). Este proceso genera subunidades que formaran una proteasa activa heterotetramérica que iniciara la apoptosis. La presencia de sitios clave de Asp para la maduración es consistente con la capacidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras como parte de una cascada de amplificación (basado en caspasa-1) [19].

Se ha sugerido que las caspasas se presentan en forma de tetrámeros, con dos subunidades grandes y dos pequeñas heterodiméricas (p10₂-p20₂) (heterodímeros de homodímeros). Las subunidades de cada heterodímero (p10-p20) están formadas por interacciones hidrofóbicas que se pliegan en forma de un

cilindro compacto, centralmente dominado por seis hebras- β antiparalelas. Los heterodímeros interactúan a través de las 12 hebras- β , que están rodeadas por cinco α -hélice que se distribuyen en oposición a las hojas- β (Figura 1b). En una estructura cuaternaria [20].

Esta caspasa tetramérica, presenta dos cilindros que se alinean en una configuración de cabeza y cola, posicionando los dos sitios activos en los extremos opuestos de la molécula. Esta configuración de tetrámero y la orientación de las subunidades dentro de ella sugieren un mecanismo de activación muy atractivo de las proteasas, que se relaciona con la a proximidad del C-terminal de la subunidad grande, con el N-terminal de la subunidad pequeña en oposición heterodimérica. Los componentes del mecanismo proteolítico, incluyen el sitio activo Cys285 y His237; estos residuos se encuentran en la subunidad grande P20 [21].

La caspasa presenta cuatro sitios activos o loops (L1-L4), que se encuentran en los extremos opuestos de las hojas- β . Los Loops L1 y una porción de L2 contienen un residuo catalizador de Cys, son parte de la subunidad P20, mientras que L3 y L4 provienen de la subunidad P10 (figura 1c). Durante la activación de las caspasas, el loop L2 se enciende entre P10 y P20 conformando dos segmentos o subunidades. El segmento con C-terminal estabiliza el sitio activo del monómero vecino. De los cuatro loops, L1 y L3 tienen una longitud y composición relativamente conservada en todas las caspasas, mientras L2 y L4 muestran un mayor grado de variación. Estos cuatro centros activos determinan la secuencia específica de las caspasas para los sustrato [22].

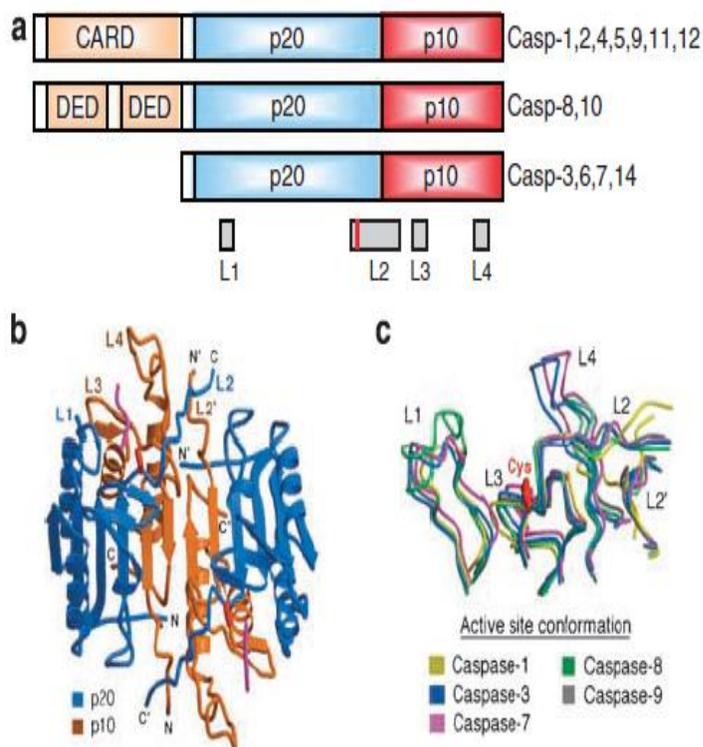


Figura 1. Estructura y organización de los dominios en las caspasas. (a) caspasas iniciadoras con dominios pequeños, mientras las caspasas efectoras presentan dominios largos como son CARD y DED. Presentan 4 loops en gris y un sitio activo Cys en color rojo. (b) representación de una caspasa activa (caspasa-3) y su organización espacial en relación a sus loops (L1-L4) y las subunidades. (c) representación de los sitios activos y sitio catalizador Cys en diferentes caspasas.

Oncogene 2008.



Los sustratos de las caspasas pueden ser diversos, incluyendo como sustrato a otras caspasas, tal es el caso de las caspasas efectoras caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7, que son reclutadas y activadas por caspasas iniciadoras como caspasa-2, caspasa-8 y caspasa-9. Las caspasas efectoras escinden principalmente componentes estructurales del citoesqueleto y el núcleo, así como numerosas proteínas que participan en las vías de señalización [23]. Estos sustratos de las caspasas se clasifican como proteínas citoplasmáticas (actina, gelsolina, α -Fodrina, β -catenina, plakoglobina, filamentos de queratina, 5-rabaptin, proteínas de fusión endosomal), proteínas nucleares (laminina A, B, NUMA, proteínas de unión al RNA y ribonucleoproteínas cromosomales), proteínas de metabolismo y reparación del ADN (PARP, DNA-PKcs, DNAtopoisomerasas, RNA-polimerasas), proteínas quinasa (PKC y sus isoformas; MAPK, ERK, AKT), proteínas de transducción de señal (proteínas pro-interleucinas, fosfolipasas) y proteínas del ciclo celular (p21, p27, pRB, proteínas ubiquitinadas) [24].

CASPASA-3 (CCPP32/YAMA/APOPAIN).

La caspasa-3 es una de las principales ejecutoras de la apoptosis, la cual es responsable, ya sea parcial o totalmente en la ruptura proteolítica de muchas proteínas importantes, como la enzima polinuclear (ADPribosa), de la polimerasa PARP, proteína clave durante la apoptosis. Usando secuencias de ADN para la codificación de los sitios activos de las caspasa-1 y CED-3, fue identificada y clonada una secuencia en humano, la cual codificaba una cisteína proteasa de 32 kDa, llamada CPP32 [25]. Independientemente de otros dos grupos de caspasa-3 identificados, uno denominado YAMA (dios hindú de la muerte) y el otro APOPAIN [26].

La caspasa-3 es un miembro de la subfamilia CED-3 de caspasas, está ampliamente distribuida, con una alta expresión en los linajes celulares linfoides, lo que sugiere que puede ser un mediador importante de la apoptosis en el sistema inmunológico [25]. Usando electrospray MS y análisis de secuencias de N-terminal, se demostró que la enzima estaba compuesta de dos subunidades de 17 kDa y 12 kDa, derivadas de la ruptura de la proteína precursora en sitios clave de Asp-28-Ser-29 y Asp-175-Ser-176 [27].

Durante la fase de ejecución de la apoptosis la caspasa-3 es responsable de todo o en parte de la proteólisis de un gran número de sustratos, cada uno de los cuales contienen en común un motivo de Asp-Xaa-Xaa-Asp [28]. En comparación con la caspasa-1, la caspasa-3 no tiene un péptido enlazador y su prodominio es mucho más corto, la estructura en tercera dimensión de la caspasa-3 muestra un complejo tetrapéptido inhibidor de aldehído. A pesar de que la caspasa-3 se asemeja a la caspasa-1 en estructura, el subsitio S-4 es muy diferente en tamaño y composición química, lo que resulta en diferentes especificaciones de sustratos [29].



CASPASA-9 (ICE-LAP6/Mch6).

En la búsqueda de una base de datos de genes relacionados con la caspasa-7, un clon ADNc fue identificado y codificaba a una proteína de 416 aminoácidos, con una masa molecular de 45 kDa aproximadamente. La caspasa-9 es un miembro de la subfamilia CED-3, teniendo una alta similitud con la caspasa-3. La principal diferencia de la caspasa-9 y otros miembros de la familia, es un sitio activo pentapeptídico QACGCC, en el cual la Gly se encuentra en lugar del habitual Arg. La procaspasa-9 posee un prodominio N-terminal largo, el cual tiene una alta similitud a los prodominios de CED-3 y con la caspasa-2. Análisis de Northern-blot revelaron la presencia de múltiples RNAm para esta molécula, lo cual indica formas alternativas del mismo. Los altos niveles de expresión para caspasa-9 se presentan en el corazón, los testículos y ovarios. La procaspasa-9 contiene dos sitios potenciales de procesamiento entre la subunidad grande y pequeña, uno similar con PARD, lo que sugiere que la caspasa-9 puede ser activada por la caspasa-3, mientras el otro motivo puede ser activado por la granzima-B. La capacidad de la caspasa-3 para activar a la caspasa-9 sugiere que este último es río abajo de la caspasa-3 y como tal puede ser responsable de algunos de los cambios más típicos en las células sometidas a la apoptosis [30].

VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) ejerce sus efectos biológicos principalmente, y aunque no exclusivamente en el sistema inmunológico, en la modulación de la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa [31]. Algunos de los ligandos de la superfamilia TNF por ejemplo, promueven respuestas inflamatorias a infecciones microbianas, otros como LT- β , CD40L, LIZ, RANKL y BLYS/BAFF, regulan aspectos celulares específicos y la inmunidad humoral, incluyendo la formación de órganos linfoides, activación de células dendríticas, estimulación o la supervivencia de células T y B. Sin embargo, otros ligandos, como FASL (también llamado APO1L o CD95L) y APO2L/TRAIL, regulan la activación de la apoptosis inducida por los linfocitos periféricos y media la apoptosis al inducir la activación de las células naturales asesinas (NK) y linfocitos citotóxicos contra la infección por virus o células transformadas oncogénicamente. Varios miembros de la superfamilia TNF también tienen un papel importante en la regulación de tejidos y órganos como el hueso o la piel fuera del sistema inmunológico. Cada miembro de la superfamilia de TNF se une a por lo menos a un receptor de la superfamilia TNF-receptores (TNFR), algunos de los ligandos se unen a varios receptores como son APO2L/TRAIL que se asocian a cinco receptores diferentes [32].

La mayoría de los miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) funcionan como transductores de señales transmembranales que responden a su ligando vinculante. Sin embargo, algunos de los receptores no transcriben señal. Por el contrario, parecen actuar como señuelos, que compiten por la interacción con el ligando. Los miembros de la superfamilia TNFR que transmiten señal se



pueden dividir, en base a su región citoplasmática, en dos subgrupos principalmente. Una clase de receptores presenta en su cola citoplasmática un dominio de muerte (DD), llamándose receptores de muerte (RD) [33]. Mientras la otra clase no lo presentan. Los DD median la interacción de los receptores con las proteínas adaptadoras que presentan dominios de muerte. La molécula adaptadora contiene los módulos secuenciales adicionales, que median la unión con enzimas efectoras intracelulares [34].

Los miembros de la superfamilia TNFR son diversos en su estructura primaria, pero todos presentan en sus subdominios extracelulares sitios ricos en cisteína. Esta característica estructural única e individual de los miembros de la familia, les permite reconocer a sus ligandos con especificidad y en la mayoría de los casos, una exclusividad [35].

Los DD presentan también sitios ricos en cisteína, alrededor de 80 aminoácidos, las moléculas adaptadoras (ligando-vinculante) como FADD (dominio de muerte asociada a FAS), TRADD (dominio de muerte asociado a TNFR) o DAXX (dominio de muerte asociado a proteínas) presentan dominios de muerte que pueden interactuar con los DRs. Estos receptores pueden activar caspasas en cuestión de segundos por medio del ligando-vinculante, causando una muerte por apoptosis en la célula en blanco en horas [36]. Hasta la fecha, los ligandos y sus receptores de muerte más caracterizados son; FASL/FASR, TNF- α /TNFR1, APO3L/DR3, APO2L/DR4 Y APO2L/DR5 [37].

La secuencia de acontecimientos que definen la vía extrínseca de la apoptosis se caracteriza mejor con los modelos de FASL/FASR y TNF- α /TNFR1. En estos modelos, hay un agrupamiento y unión homóloga de receptores y ligandos de forma trimérica. Tras la unión del ligando, proteínas adaptadoras citoplasmáticas con dominios de muerte son reclutadas para unirse al receptor. La unión de FASL con FASR favorece la unión de la proteína adaptadora FADD, mientras la unión de TNF ligando con TNF receptor favorece la unión de la proteína adaptadora TRADD, que recluta también a FADD y a RIP [38].

La unión de FASL/FASR provoca oligomerizaciones (trimerizaciones), entre los DD del receptor y de la molécula adaptadora FADD, también con las 2 isoformas de la procaspasa-8 (procaspasa-8a y procaspasa-8b), la procaspasa-10 y la proteína inhibidora FLIP (FLIP L/S) conformando un complejo conocido como DISC (complejo inductor de señalización de muerte) [39].

Las interacciones entre las moléculas que conforman el DISC se basan en contactos homotípicos. El DD del receptor interactúa con el DD de la molécula adaptadora FADD, mientras el dominio efector de muerte (DED) de FADD interactúa con el DED de la procaspasa-8,10 y FLIP L/S. La activación de la procaspasa 8 se cree que sigue el modelo de inducción por proximidad, en la cual un alto reclutamiento local de la procaspasas-8 en



el DISC la lleva a su activación autoproteolítica. Esta es liberada al citosol para propagar la señal de apoptosis. La procaspasa-10 también puede ser activada por el complejo DISC (Figura 2a) [40].

En el caso de la unión de TNF- α con TNFR ocasiona una trimerización similar con los DD de la proteína adaptadora TRADD, reclutando a la procaspasa-8 para su posterior activación que a su vez activa a caspasas efectoras [11]. Sin embargo el TNF- α unido a TNFR, solo en raras ocasiones induce la apoptosis, la unión del adaptador de TNF asociado al cofactor-2 (TRAF-2) y a la molécula adaptadora TRADD junto con dos proteínas anti-apoptóticas (c-IAP1 Y c-IAP2) inhiben la apoptosis celular. La unión e interacción del adaptador con la proteína RIP, la tercera proteína capaz de interactuar con TRADD conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear κ B) que dará como resultado la transcripción de genes anti-apoptóticos que promueven la supervivencia celular [41].

Para FASL/FASR, se han establecido dos tipos de señalización que se pueden presentar; en el tipo 1 las células se caracterizan por altos niveles de formación de DISC por tanto una mayor cantidad de activos de caspasa-8, que conducen directamente a la activación de caspasas efectoras río abajo, mientras las células tipo 2 presentan bajos niveles de formación de DISC por lo cual hay menos caspasa-8 activa [42].

En el caso de las células tipo 2, la caspasa-8 trunca (fosforila) a Bid, miembro de la familia Bcl-2, para generar a t-Bit, el cual mediará la liberación de citocromo C (Cc) de las mitocondrias. Esto conducirá a la formación del apoptosoma, seguido por la activación de la procaspasa-9, que a su vez activará a caspasas efectoras río abajo. La señalización de apoptosis FAS tipo 2 puede ser bloqueada por miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bcl-2 y Bcl-XL [14], los cuales alteran la mitocondria inhibiéndola, pero esto no ocurre en las células tipo 1 (figura 2a) [43].

VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS.

La vía de señalización intrínseca de la apoptosis, implica una gran diversidad de estímulos no mediados por receptores, que producen señales internas, que actúan directamente sobre blancos intracelulares y éstos inician eventos en la mitocondria. Los estímulos que inician la vía intrínseca pueden generar señales intracelulares que pueden actuar en sentido afirmativo o negativo. Señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento como hormonas y citocinas, que pueden generar un fracaso en la supresión de los programas de muerte, iniciando así la apoptosis. En otras palabras, no es la retirada de factores, sino la pérdida en la supresión de apoptosis, y posteriormente la activación de la misma apoptosis. Otros estímulos que actúan de forma positiva son; la radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres. Todos estos estímulos provocan cambios internos en la membrana mitocondrial, que se traducen en la apertura de un poro y la permeabilización transicional de la mitocondria (MPT). La pérdida del



potencial transmembranal de la mitocondria, ocasiona la liberación de dos grupos de factores pro-apoptóticos al citosol, secuestrados normalmente en el espacio intermembranal [44].

El primer grupo liberado consta del citocromo C (Cc), Smac (segundo activador mitocondrial de caspasas)/DIABLO y proteasas de serina HtrA2/Omi [45]. Estas proteínas activan caspasas dependientes de la vía mitocondrial. En presencia de modestos niveles de dATP o ATP el Cc se une al primer factor activador de proteasas apoptóticas (apaf-1), la cual es una proteína citosólica, que contiene en su N-terminal un dominio reclutador de caspasas (CARD), conformando un gran complejo heptamérico, denominado "apoptosoma" [46].

El apoptosoma posteriormente recluta a la procaspasa-9 iniciadora (ProC9) a través de su propio dominio CARD, lo cual resulta en su activación [47]. Sobre la base de dos importantes escuelas del pensamiento sobre el apoptosoma, el apoptosoma activa a la ProC9 ya sea por facilitar su dimerización dentro del complejo [48]. O induce un cambio conformacional de la enzima monomérica (figura 2b) [49].

Aunque ninguno de los modelos es necesariamente, excluyente mutuamente. En cualquier caso, la actividad de la ProC9 es marcadamente mejorada en su asociación con el apoptosoma, posteriormente sufre un procesamiento automático entre la subunidad pequeña y grande en el sitio Asp 315, conformando un procesamiento de p35/p12 de la enzima. Es importante destacar, que independientemente de su estado conformacional, la caspasa-9 está obligada a unirse al complejo, esto significa que muestra su actividad proteolítica unida, la ProC9 al apoptosoma en forma de rueda o C9-p35/p12 activa, reclutando y activando procaspasas efectoras (ProC3) [50].

El reclutamiento de la procaspasa-9 lleva a su activación, conformando a la caspasa-9 activa. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi se reportan para promover a la apoptosis mediante la inhibición de la actividad de los IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis) [51].

El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas liberadas durante la apoptosis mitocondrial son; AIF (factor inductor de apoptosis), endonucleasas G y CAD, pero éste es un evento tardío que se produce cuando la célula ya está comprometida a morir. Los AIF se translocan al núcleo ocasionando una fragmentación del ADN de 50-300 kb y una condensación de la cromatina nuclear periférica [52]. Esta temprana condensación nuclear se conoce como etapa I de condensación [53].

La endonucleasa G también se transloca al núcleo donde rompe la cromatina nuclear formando fragmentos oligonucleosomales de ADN [54]. Tanto los AIF como la endonucleasa G funcionan independientemente de las caspasas. CAD es posteriormente liberado de la mitocondria y se transloca al núcleo, donde realiza una condensación y fragmentación más avanzada de la cromatina, después de la escisión oligonucleosomal de

fragmentos de ADN por parte de la caspasa-3 [55]. Esta condensación más avanzada y pronunciada de la cromatina se conoce como etapa 2 de condensación [53].

El control y la regulación de estos eventos apoptóticos mitocondriales se produce a través de miembros de la familia de proteínas Bcl-2 [56].

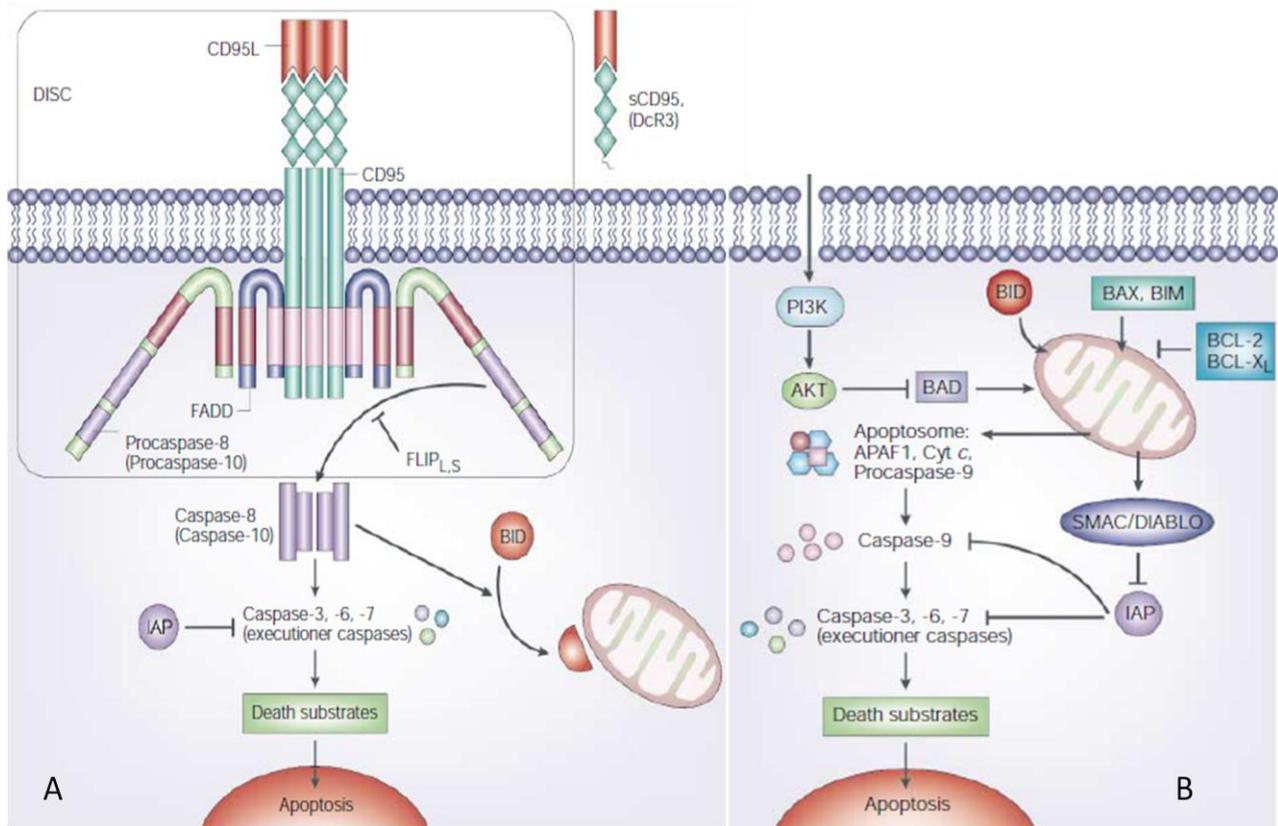


Figura 2. Representación de las dos vías de la apoptosis. (a) La vía extrínseca representada por los receptores de muerte los cuales reclutan a moléculas adaptadoras para conformar el DISC, el cual posteriormente activa a la caspasa-8/-10 iniciadora. (b) Por otra parte la vía intrínseca se desencadena por la permeabilización de la membrana mitocondrial inducida por Bax, Bad, lo cual ocasiona la liberación de factores apoptóticos (smac, citocromo c etc.) uno de los principales el citocromo C el cual conforma el complejo apoptosoma junto con Apaf-1, los cuales activaran a la caspasa-9 iniciadora. Tanto la caspasa-8 y -9 activan a caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6, -7) que tienen como blanco componentes celulares.

Nature Reviews, Cancer 2002.



MOLÉCULAS PRO- Y ANTI-APOPTÓTICAS.

FAMILIA BCL-2.

La familia de proteínas Bcl-2 constituye un punto de control crítico intracelular de la apoptosis. El miembro fundador de esta familia es Bcl-2, fue caracterizado por primera vez como un punto molecular de obstáculo inter cromosomal, en el linfoma folicular de células B [57].

La familia Bcl-2 está compuesta de tres subfamilias que contienen entre uno y cuatro dominios de homología BH (BH1, BH2, BH3, BH4) de BCL-2. La subfamilia anti-apoptótica (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL2A1, BCL-B) contiene proteínas que comprenden los cuatro dominios BH. La mayoría de esta subfamilia también contienen dominios transmembranales (TM), por lo que generalmente están asociadas a membranas. La subfamilia pro-apoptótica (BAX, BAK, BOK) carecen de dominios BH4, promueven la apoptosis mediante la formación de poros en las membranas mitocondriales. La otra subfamilia pro-apoptótica es un grupo estructuralmente diverso que sólo presentan un dominio BH (BH3-only) en homología (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA Y HRK). La subfamilia que tiene un único dominio BH3, promueven la apoptosis cuando están sobre-expresadas, comparten homología en su secuencia, pero se regulan de forma distinta. PUMA, NOXA y BID en menor medida son reguladas transcripcionalmente por p53, debido a incrementos de daño en el ADN. BID también se puede activar por proteólisis de caspasa-8 [58].

Datos recientes muestran que tanto el número y funciones de las moléculas de la familia BCL-2 son controladas vía transcripcional y postranscripcional. Dependientes de influencias exógenas y endógenas, por ejemplo un alza de RNAm para BCL-2 en las células, se ha observado que depende de factores de supervivencia como IL-2 o IL-3 [59]. Los diferentes miembros de la familia pueden formar homo- y heterodímeros, mientras la proporción relativa de proteínas anti- y pro-apoptóticas determina la susceptibilidad de apoptosis [60].

Proteínas de la familia BCL-2 modulan la permeabilización de las membranas internas y externas, con lo cual regulan la liberación del citocromo C de la mitocondria [61].

IAP (PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS).

Los IAP son una familia de proteínas celulares, identificadas originalmente en células infectadas por el Baculovirus [62]. Se incluyen 8 miembros de la familia IAP en mamíferos [63]. Con patrones de expresión diferencial muy conservados en distintos tejidos. En humanos se han identificado seis miembros de la familia IAP como son: NAIP (proteína de inhibición de apoptosis neural), c-IAP1/HAIP-2, c-IAP2/HAIP-1, XIAP/Hip (proteína inhibidora de apoptosis ligada al cromosoma X en mamíferos) SURVIVIN Y BRUCE [63].



Los IAPs se caracterizan por presentar un dominio de 70-80 aminoácidos, denominados repeticiones de IAP del Baculovirus (BIR) [64]. Todos los miembros de la familia presentan de 1-3 repeticiones del dominio IAP (BIR, BIR1, BIR2, BIR3) y conservan un dominio en el C-terminal, denominado RING. Los dominios BIR son estructuras parecidas a dedillos con zinc, los cuales pueden quelar iones de zinc. Estos dedos con zinc se pueden unir a la superficie de las caspasas para que la secuencia de aminoácidos o el enlace entre los dominios BIR puedan bloquear las ranuras catalizadoras de las caspasas. El tercer dominio BIR (BIR3) puede interactuar con la caspasa-9 [65].

La región que une a BIR1 y BIR2 se dirige selectivamente a las caspasas-3 y caspasa-7. Por lo tanto queda inhibida la actividad de la caspasa-9 iniciadora y caspasas-3 y caspasa-7 efectoras. Los IAP no se pueden unir o inhibir a la caspasa-8, pero si pueden unirse e inhibir su sustrato, como lo es la caspasa-3, lo cual arresta la cascada de proteólisis y proporciona protección frente a la inducción de apoptosis por FAS [66].

Todas las proteínas que presentan dominios BIR no son inhibidoras de caspasas o de la apoptosis. SURVIVINA contienen un único dominio BIR, el cual puede actuar como un regulador de la mitosis en lugar de apoptosis, mientras que su dominio RING tiene como actividad catalizar la ubiquitina ligasa E3. En la vía apoptótica mitocondrial, la inactivación de las caspasas está regulada por; XIAP, c-IAP y c-IAP2, los cuales se unen directamente a la caspasa principal, la procaspasa-9. Esta vinculación impide su procesamiento y activación inducida por el Cc [67].

La sobreexpresión de proteínas de la familia IAP inhibe la apoptosis inducida por Bax y otras proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 [63].

C-FLIP Y OTROS REGULADORES.

Los IAP son los inhibidores naturales de las caspasas. Pero normalmente hay otros reguladores como son; FLIP, p35, Calpains, iones calcio etc. Las proteínas C-FLIP son inhibidores de la apoptosis inducida por los receptores de muerte [68]. Son homólogos inactivos de las caspasas, cuyo sitio catalizador está dañado y son moduladores negativos dominantes en la cascada de señalización de caspasas [69].

Hay dos grupos principales de FLIPs. Los codificados por el virus herpes gamma V-FLIP (proteínas inhibidoras FLICE-virales) y sus homólogos en mamíferos, llamado FLIP celular (C-FLIP) [70]. Tanto v- y c-FLIP poseen dos DED en su N-terminal que facilita su reclutamiento en el DISC. Hay tres isoformas descritas de C-FLIP a nivel proteína; C-FLIPL, C-FLIPS, C-FLIPR [71].

En condiciones de sobreexpresión todas las isoformas, inhiben la activación de la procaspasa-8, bloqueando su transformación en el complejo DISC [72].



Al mismo tiempo hay más evidencias que indican que la presencia de C-FLIP en el DISC, a bajas concentraciones, facilita la rotura de la procaspasa-8 presente en el DISC, debido a la formación del heterodímero de C-FLIP con la procaspasa-8 [73].

La proteína baculoviral p35 es un inhibidor de caspasas molde. Forma un complejo inhibidor que se caracteriza por un enlace tioéster entre la caspasa y p35 [74].

Las Calpainas son una clase de cisteína proteasas dependientes de calcio (Ca^{2+}) de la familia papainase. La calpaina y la caspasa-3 comparten muchos sustratos en común incluyendo; fodrinas, proteínas quinasa dependientes de Ca^{2+} y la ADP ribosil-transferasa / PARD [75]. En el proceso de muerte celular inducida por estrés en el retículo endoplasmático RE, el papel de las calpainas es particularmente importante debido a la perturbación homeostática de Ca^{2+} . En células de cerebro de ratas que sufren hipoxia-isquemia unilateral, las m-calpainas facilitan los primeros troceados de la procaspasa-3 en fragmentos de 29 kDa para su posterior división y activación [76].

FASE FINAL DE LA APOPTOSIS.

Tanto la vía extrínseca e intrínseca terminan ambas en un punto de ejecución en común, considerada como la fase final de la apoptosis. Se trata de la activación de caspasas de ejecución (efectoras) las cuales comienzan esta fase final de la apoptosis. Las caspasas efectoras activan a endonucleasas citoplasmáticas, que degradan materiales nucleares, y proteasas que degradaran proteínas nucleares y del citoesqueleto. Las caspasas-3, caspasa-6 y caspasa-7 funcionan como caspasas efectoras o verdugo, las cuales cortan varios sustratos, incluyendo citoqueratinas, proteínas de la membrana citoplasmática como α -fodrina, proteínas nucleares centrales como, Numa, PARP y otros que en última instancia dan el cambio morfológico característico de las células en apoptosis [77].

La caspas-3 es considerada como la más importante caspasa verdugo, la cual es activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10). La caspasa-3 activa principalmente a la endonucleasa CAD. En células proliferantes CAD es un complejo unido con un inhibidor ICAD. En células apoptóticas, con actividad de la caspasa-3, ésta rompe el enlace de ICAD para liberar a CAD [78]. Por lo tanto CAD degrada el ADN nuclear cromosómico y posteriormente condensa la cromatina. La caspasa-3 también induce la reorganización del citoesqueleto y la desintegración de la célula, para conformar los cuerpos apoptóticos. Tanto la Gelsolina y la proteína de unión Actina, se han identificado como uno de los sustratos de la caspasa-3 [79].



La captación fagocítica es el último componente de la apoptosis. La asimetría de los fosfolípidos y la externalización de la fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas y sus fragmentos, es el sello distintivo de esta fase. Aunque el mecanismo de externalización de la fosfatidilserina o translocación a la cara externa de la célula durante la apoptosis no está del todo claro, se ha asociado con la pérdida de actividad de los aminofosfolípidos translocados y a la inespecífica diversidad de clases de fosfolípidos en el FLIP-FLOP [80].

La aparición de la fosfatidilserina en la cara exterior de las células apoptóticas, facilita el reconocimiento fagocítico no inflamatorio, lo que permite su reconocimiento temprano y posterior eliminación. Este proceso de eliminación es rápido y eficiente sin la liberación de componentes celulares, resulta esencial, para que no haya una respuesta inflamatoria [81].

FUNCIONES NO-APOPTÓTICAS DE LAS CASPASAS.

Es ampliamente reconocido que las funciones fisiológicas de las caspasas, son conservadas en la mayoría de las especies. Investigaciones recientes sobre la actividad y los sustratos de las caspasas en ausencia de muerte celular, han ayudado en la caracterización de las funciones de las caspasas. Con base a estas investigaciones se han descrito dos funciones principales de las caspasas: 1) la apoptótica y 2) la no-apoptótica (82).

Las funciones no-apoptóticas de las caspasas involucran una variedad de procesos celulares uno de estos es la proliferación celular, donde gran cantidad de estudios han demostrado el papel esencial de la caspasa-8 en la proliferación de linfocitos. Pacientes con mutaciones en los zimógenos de caspasa-8, muestran deficiencias en la activación de linfocitos T, B y células NK. (83).

Por otra parte, en la proliferación de células linfoides, la caspasa-3 media la fosforilación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) inhibidor de p21 que contribuye a la inducción de la progresión del ciclo celular. La unión del inhibidor de CDK p21 al PCNA un cofactor de la ADN polimerasa, promueve la proliferación celular (84).

Otra de las funciones no-apoptóticas de las caspasa es la diferenciación celular, que se ha demostrado a través de la enucleación para conformar megacariocitos, eritrocitos, plaquetas y queratinocitos, proceso en el cual participan las caspasa efectoras -6 y -7. Las caspasa-2, -3 y -9 se activan de forma transitoria durante este proceso en la división de proteínas nucleares (85,86).



CITOCINAS.

Actualmente diferentes grupos de investigación se han centrado en el uso de citocinas como factores de inducción de apoptosis debido a la actividad inmunológica redundante de éstas.

Se denomina genéricamente citocinas al conjunto de proteínas de bajo peso molecular, a menudo glucosiladas y generalmente monoméricas, que sintetizan las células del sistema inmune (y otras). Los productores mayoritarios de estas proteínas son los macrófagos y los linfocitos T, ya que actúan como los principales reguladores de la respuesta inmune innata y específica respectivamente en respuesta a los patógenos o sus productos, o a otras señales relacionadas [87].

Con pesos moleculares desde 5 hasta 70000 daltones (Da). Actúan como moléculas de señalización a muy bajas concentraciones (a niveles de picomoles (10^{-12}) o femtomoles (10^{-15}), como mediadores esenciales de reacciones infecciosas o inflamatorias [88].

La secreción de las citocinas es un acontecimiento breve y autolimitado, en general las citocinas no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis se inicia con una nueva transcripción. Pueden influir en la síntesis y las activaciones de otras citocinas.

La acción de estas citocinas a menudo son pleiotrópicas (capacidad de actuar sobre diferentes tipos celulares) y redundantes (propiedad de varias citoquinas de tener los mismos efectos funcionales). Inician su acción uniéndose a receptores de membrana específicos presentes en las células diana. Las acciones de las citocinas pueden ser locales o sistémicas. La mayoría de las citocinas actúan cerca del lugar donde son producidas, en una célula próxima (acción paracrina) o bien en la misma célula que la secreta (acción autocrina), cuando se producen en grandes cantidades, las citocinas pueden entrar en la circulación y actuar a distancia del sitio de producción (acción endocrina) [89].

Según la citocina y las propiedades de la célula diana puede observarse supresión o exacerbación en la expresión de uno o más genes [90].

Se pueden incluir como citocinas las interleucinas (que se suelen enumerar como IL-1 a IL-18), los interferones (IFN- α , INF- β , IFN- γ), los factores estimuladores de colonias (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), el factor de necrosis tumoral (TNF- α , TNF- β), los factores de crecimiento (NGF, EGF) y las quimiocinas (RANTES, MCP-1, MIP-1 α) [91].



INTERLEUCINA 2 (IL-2).

La IL-2 es producida por los linfocitos TCD4+ y en menores cantidades, por las células TCD8+. La activación de las células T por antígenos y coestimuladores estimula la transcripción del gen de la IL-2, la síntesis y secreción de esta proteína. La producción de la IL-2 es transitoria, con una secreción máxima de 8 a 12 horas después de la activación [89].

La IL-2 secretada es una glucoproteína de entre 14 y 17 KD que está plegada, formando una proteína globular que consta de cuatro hélices α . Representa el prototipo de las citocinas de cuatro hélices α que interaccionan con los receptores de citocinas tipo I [92].

Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune, teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T, B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas). Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, linfoxina, IL-4, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II [93]. Teniendo en cuenta las funciones antes citadas se ha establecido a la IL-2 como un candidato inmunosupresor para el tratamiento del Cáncer Cervicouterino.

CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCu).

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es una mutación celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa; evolucionan a cáncer in situ, en grado variable, cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal [94]. El cuello uterino o cérvix es la abertura del útero o matriz que a la vez se conecta con la vagina.

En el CaCu se reconocen dos tipos histológicos: el cáncer epidermoide, que se presenta en el epitelio escamoso (95%) y el adenocarcinoma en el epitelio glandular (5%). En un menor porcentaje se presenta el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas [95].



Los principales factores de riesgo para desarrollar CaCu son: uso de anticonceptivos hormonales, hábito de fumar, conducta sexual, acceso limitado a los servicios de salud, infecciones virales (VIH, Herpes, VPH, infecciones genitales en general). Casi todos (99,8%) los casos de CaCu se deben a tipos específicos de virus del papiloma humano (VPH), principalmente los tipos VPH-16 y VPH-18 de los 100 tipos que se conocen, pero no todos se convierten en cáncer, ocasionando verrugas o condiloma [96].



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.



El cáncer es responsable de uno de cada ocho muertes por enfermedades alrededor del mundo [97]. Por su parte el cáncer cervicouterino (CaCu) es un problema de salud pública. Según la organización mundial de la salud, el CaCu es la segunda mayor causa de mortalidad femenina por cáncer en todo el mundo, con unas 300000 muertes al año. El 80% de los casos corresponde a los países en vías de desarrollo [98]. Prueba de ello es que en la región latinoamericana tiene una incidencia de mortalidad por CaCu de 3-10 veces mayor que en los países industrializados [99]. Cerca de 500000 nuevos casos se presentan cada año, tan solo en el año 2002 se presentaron 493243 casos y de éstos, 273505 fueron decesos [100].

En México, en el año 2002, se presentaron 12512 nuevos casos de CaCu, de los cuales 5777, o sea el 46% de los casos fueron decesos [100]. Durante los últimos 25 años en México, los registros oficiales han calculado más de 100000 muertes por CaCu y a partir del 2006 se convirtió en la segunda causa de muerte debido a la malignidad de los tumores, después del cáncer de mama [101].

En diferentes reportes de tipo epidemiológico, se han determinado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo del CaCu, como son el número de parejas sexuales, inicio temprano de una vida sexual activa, multiparidad, etc [102]. Sin embargo el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCu es la infección por un virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), principalmente los tipos 16 y 18 [103].

Las disparidades relacionadas con el CaCu siguen existiendo en México, incluyendo una insuficiente cobertura del tratamiento, problemas con el control de calidad y por consiguiente un mayor riesgo de mortalidad, principalmente en mujeres de zonas marginadas. La falta de oportunidades y requisitos para una educación continua, la acreditación de personas involucradas con la salud y la selección de programas, son un problema. Vacunas contra el VPH y las pruebas de ADN contra VPH son las últimas tecnologías innovadoras que ofrecen una solución potencial al impacto negativo del CaCu en México. Sin embargo si no se reducen las desigualdades, ampliando la cobertura, ajustando costos y teniendo un control de calidad, el impacto es y será limitado [104].

Por esta razón diferentes grupos de investigación trabajan en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, para este tipo de cáncer, como es el uso de citocinas. Al respecto nuestro grupo de trabajo de la FACULTAD de ESTUDIOS SUPERIORES de ZARAGOZA, en el laboratorio de oncología celular UMIE-Z, UNAM, estudia el efecto de la interleucina-2 (IL-2) en el proceso de proliferación celular de células de CaCu. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que a 10 UI/mL de IL-2 ayuda a la proliferación celular, mientras que a 100-UI/mL de IL-2 induce la muerte de estas células de CaCu, por apoptosis. De manera normal la apoptosis es mediada por un grupo de enzimas degradativas denominadas caspasas como es el caso de la caspasa-3 y caspasa-9, por lo que la evaluación de la expresión de estas caspasas por la inducción de IL-2 podría dar información valiosa sobre el tipo de apoptosis que se está induciendo.



ANTECEDENTES DIRECTOS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.



ANTECEDENTES DIRECTOS.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células de cáncer cervicouterino (CaCu) CALO e INBL, expresan en la superficie celular el receptor para interleucina-2 (IL-2R), el cual es funcional (**Rangel et al., 1998 Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells**) [105].

También se ha observado que la interleucina-2, tiene un efecto en la proliferación de células CaCu (CALO e INBL), ya que a bajas concentraciones de IL-2 (10UI/mL) induce la proliferación, mientras altas concentraciones de IL-2 (100UI/mL) induce la inhibición de la proliferación (**Rangel, Alvarado., 1997 Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico**) [106].

Recientemente se ha determinado que la muerte de células de CaCu debido a la estimulación con 100 UI/mL de IL-2, es por apoptosis (**Rangel., Del RÍO., 2010 Estudio de la participación de genes mitocondriales citocromo c y cox 4 en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL**) [107].

Por otro lado, **Fernández Martínez 2011** [108], demuestra que IL-2 regula positivamente la transcripción de las caspasas-3 y caspasa-9 en las líneas de CaCu CALO e INBL.

Basándose en estas premisas, en este trabajo se reporta la expresión diferencial del RNAm para caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas celulares de CaCu C33 (IIA) y VIBO (IIB), negativas a VPH, cultivadas a diferentes tiempos en presencia de 100UI/mL de IL-2.



HIPÓTESIS.

Si altas concentraciones 100 UI/ml de IL-2 inducen la muerte de células de CaCu por apoptosis, la cual es mediada por un grupo de caspasas, al utilizar la técnica RT-PCR con oligonucleótidos específicos para caspasa-3 y caspasa-9, podremos observar la expresión de estas caspasas en células de CaCu de la línea; C33 y VIBO, cultivadas a diferentes tiempos en presencia de IL-2.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar si hay expresión para caspasa-3 y caspasa-9 a partir del RNA mensajero (RNAm) obtenido de células de CaCu, de la línea celular C33 y VIBO, cultivadas en presencia de IL-2 (100UI/ml) a diferentes tiempos: 5minutos, 10minutos, 15minutos, 20minutos, 30minutos, 1hora, 2horas, 1día y 2días.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Cultivo de las líneas celulares C33 y VIBO.
- Diseño de primers para caspasa-3 y caspasa-9.
- Extraer y purificar el RNAm de las líneas C33 y VIBO estimuladas con IL-2, a diferentes tiempos.
- Retro-transcribir (RT) las muestras de RNAm obtenidas para posteriormente amplificar (ADNc) a través de la técnica de PCR, por medio del diseño de oligonucleótidos específicos para caspasa-3 y caspasa-9.
- Evaluar la expresión de la caspasas-3 y caspasa-9 por medio de una electroforesis.



MATERIAL Y MÉTODO.



LÍNEAS CELULARES DE CaCu

El Material biológico consistió en las líneas celulares de CaCu C33 y VIBO mantenidas en el banco de criopreservación de la UMIE-Z, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN	ESTADIO	TIPO-VPH
C33	CARCINOMA DE CÉRVIX	IIA	NEGATIVA -/-
VIBO	CARCINOMA EPIDERMOIDE	IIB	NEGATIVA -/-

Cell Line Indexes, ATCC CULTURES 2011. Monroy 1991.

CULTIVO Y PROLIFERACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Las líneas celulares C33 y VIBO se cultivaron en botellas de 25cm³, con 5mL de medio de cultivo (RPMI (MICROLAB) con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO)), bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 37°C de temperatura, estas se incubaron por 2 días aproximadamente, tiempo suficiente para que éstas proliferaran y de ésta manera obtener la cantidad necesaria para ser cultivadas en presencia de IL-2 a 5minutos, 10min, 15min, 20min, 30min, 1hora, 2hrs, 1día y 2días.

INDUCCIÓN DE IL-2.

Para excluir células muertas, se realizaron ensayos de viabilidad con azul tripano antes de proceder a los cultivos celulares.

Se conto un millón de células viables de cada línea celular (C33 y VIBO) para ello se utilizó una cámara de Neubauer, las células se sembraron en una botella de cultivo de 25cm³ y 75cm³ para los tiempos más largos. Se agregaran 100 UI/mL de IL-2 en 5 mL de medio de cultivo. Las células se mantuvieron en cultivo a 5minutos, 10min, 15min, 20min, 30min, 1hora, 2hrs, 1día y 2días.

Como control de los experimentos se utilizaron cultivos en ausencia de IL-2 de las mismas líneas.



EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO (RNAm).

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las células se retiran de las botellas, esto se realizó decantando el medio de cultivo a un tubo eppendorf y agregando 5-7 ml de VERSENO o TRIPSINA (en el caso de VIBO), se incubaron por 5 minutos. Tanto el medio de cultivo decantado como el verseno o tripsina agregados se le centrifuga durante 5 minutos a 2500 rpm, se procede a retirar el sobrenadante y se realizan lavados con PBS al botón celular, se le agrega 1ml de Trizol^(INVITROGEN), se resuspende homogéneamente transfiriendo a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se deja reposar 15 minutos a temperatura ambiente, cumplido el tiempo se le adicionara 200 μ L de cloroformo^(SIGMA), para una posterior agitación durante 3 minutos en un vortex, posteriormente se deja reposar 3 minutos en hielo, y se le centrifuga durante 15 minutos a 12000 rpm a 4^o C. La parte acuosa se recupera (zona superior transparente) y se pasa a otro tubo nuevo donde se le agrega 500 μ L de isopropanol^(SIGMA) se resuspende y se deja reposar 10 minutos en hielo, pasado el tiempo se vuelve a centrifugar durante 15 minutos a 12000 rpm a 4^o C. Se guarda la muestra 24 horas a -70^o C. Pasado el tiempo nuevamente se centrifuga a las mismas condiciones anteriores (15 minutos a 12000rpm 4^o C), se decanta el isopropanol, el botón que se forma se le adiciono 1 mL de etanol^(J.T BAKER) al 70 %, se resuspende y centrifuga durante 5 minutos a 7500 rpm a 4^o C, se decanta el etanol y se deja evaporar a temperatura ambiente.

Evaporado el etanol se rehidrata la muestra con 20 μ L de agua libre de RNAsas^(FERMENTAS) resuspendiendo perfectamente para obtener un stock de cada tiempo determinado al igual que los controles.

CUANTIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO.

Se tomaron 4 μ L del stock de RNAm y se resuspendió en 196 μ L de agua inyectable^(PISA), teniendo un volumen total de 200 μ L. Se colocan en una celda, posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro^(EPPENDORF) para determinar las concentraciones de RNA (μ g/mL), para lo cual se tomaron las absorbancias de 260, 280 y la relación 260/280.

RETROTRANSCRIPCIÓN (RT).

Para llevar a cabo la retro-transcripción es necesario tener la concentración de 1 μ g/ μ L para cada muestra de RNAm de todos los tiempos, para lo cual se utilizo la siguiente fórmula:



(Absorbancia 260) (Volumen de la disolución) (40)

$$\frac{\text{Absorbancia 260}}{1000} = 1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$$

Teniendo los cálculos para todas las muestras, se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), las cuales se multiplicaron por el número total de reacciones que se obtuvieron (20 muestras):

CONDICIONES PARA 1RX EN RT.

Reactivos	1 RX	9 RX controles	9 RX estímulos
Amortiguador 5x ^(INVITROGEN)	5 μl	45 μl	45 μl
DNTP's 10 Mm ^(INVITROGEN)	1.5 μl	13.5 μl	13.5 μl
Enzima MMLV-RT ^(PROMEGA)	1 μl	9 μl	9 μl
Oligo dt ^(PROMEGA)	2 μl	18 μl	18 μl
Muestra	2 μl	2 μl	2 μl
Agua libre RNAsas ^(FERMENTAS)	2 μl	2 μl	2 μl
Volumen Total	20 μl	200μl	200μl

Cada muestra se preparó en tubos eppendorf en presencia de hielo, se procedió a preparar un mix el cual es la suma total de reactivos para un número determinado de muestras. En el cual se coloca el amortiguador 5x, 0.1 MDTT, DNTPs 5Mm, oligo dt, y el agua, posteriormente se resuspende y se divide a otros tubos dependiendo el número de muestras sumadas. Por último se agrega la muestra a cada tubo y la enzima, se resuspende ligeramente.

Las reacciones se colocaron en un termociclador ^(EPPENDORF ESTANDAR) que se programó para que se mantuviera a 37^o C durante 1 hora. Pasado el tiempo las muestras pueden ser guardadas a -70^oC.



AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Con los ADNc obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren.

CONDICIONES PARA RX EN PCR.

Reactivos	1 RX	19 RX
Amortiguador 5x Green (PROMEGA)	6 µl	114µl
DNTP´s 10 Mm (INVITROGEN)	0.8µl	15.2µl
Primer 1 (Sentido) (PROMEGA)	1 µl	19µl
Primer 2 (Antisentido) (PROMEGA)	1 µl	19µl
Go Taq Polimerasa (PROMEGA)	0.15 µl	2.85µl
Muestra cDNA	4 µl	76µl
Agua libre RNAsas (FERMENTAS)	7.05 µl	133.95µl
Volumen Total	20 µl	380µl

SECUENCIA DE LOS PRIMERS:

PRIMER	SENTIDO/ANTI SENTIDO	SECUENCIA	PARES DE BASES
CASPASA-3	SENTIDO	TTTTTCAGAGGGGATCGTTG	151
CASPASA-3	ANTI SENTIDO	CGGCCTCCACTGGTATTTTA	151
CASPASA-9	SENTIDO	CAGAGGCTCAAGGAGGAGTG	174
CASPASA-9	ANTI SENTIDO	CTTCATGAGGCTGTGCTTGA	174
B-ACTINA	SENTIDO	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	234
B-ACTINA	ANTI SENTIDO	GGTCTCAAACATGATCTGGG	234



Cada muestra se preparo en tubos eppendorf y en presencia de hielo. Se procedió a preparar un mix en el cual se agrego; 5x Green, DNTP's 10 Mm, Primer 1 y 2 por último el agua. Se procede a homogeneizar y se divide a tubos dependiendo el número de muestras sumadas. Posteriormente se agrega la muestra y la enzima (Go Taq Polimerasa), se realiza un homogenizado.

Estas reacciones se colocaron en un termociclador ^(EPPENDORF ESTANDAR) que se programó para que efectuara los siguientes pasos:

PASO	TEMPERATURA	ETAPA	TIEMPO
1	94 °C	DESNATURALIZACIÓN	6 MINUTOS
2	55°C	HIBRIDACIÓN	2 MINUTOS
3	72°C	EXTENSIÓN	2 MINUTOS
4	94°C	DESNATURALIZACIÓN	45 SEGUNDOS
5	30 VECES EL	PASO 2 AL 4	
6	55°C	HIBRIDACIÓN	2 MINUTOS
7	72°C	ELONGACIÓN	7 MINUTOS
8	20°C	ESTABILIZACIÓN	30 MINUTOS

Pasado el tiempo las muestras fueron retiradas y guardadas a -70 °C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se fundamenta en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias de oligonucleótidos que hibridan en la cadena complementaria de la molécula molde que se va amplificar cebadores o primer y que son utilizados por una ADN polimerasa termo resistente para copiar la secuencia de la misma. La reacción es un proceso que consta de 3 etapas: desnaturalización, hibridación y extensión [109].



ELECTROFORESIS.

Por último se llevo a cabo una electroforesis en gel de agarosa para observar la expresión (caspasas) de cada uno de los amplificadores de la técnica de PCR para cada tiempo.

Para preparar un gel grande de agarosa, se pesaron 1.5 g de agarosa la cual se diluyo con 100 mL de TBE IX en un matraz de 100 mL. Para tener un mejor homogeneizado la dilución se coloca en un horno a 50 °C durante 7 minutos aproximadamente. Después de montar la cámara de electroforesis se procede a vertir la dilución de agarosa, mas 10µl de bromuro de etidio en la cámara, inmediatamente colocar un peine con el número de pozos deseados.

Terminado el tiempo de polimerización de la agarosa (50 minutos aproximadamente) se procede a retirar el peine y montar la cámara para la corrida electroforética, en la cual se coloca 1L de buffer de corrida (TBE .5X). Posteriormente se colocaron 4µl de muestra en los pozos al igual que 4µl de escalera. El tiempo de corrida es aproximadamente de 1 hora a 80-90 volts.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraron hacia el polo positivo, es decir el ánodo. De tal manera la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de ADN y ARN.

Para la visualización de los ácidos nucleídos se utiliza un colorante fluorescente, el bromuro de etidio ^(MERCURY). Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta (300nm) de un transluminador. De este modo permite la visualización del ADN y la identificación de las caspasas por sus pares de bases en relación al recorrido de cada banda con la escalera [109].



RESULTADOS.

EXPRESIÓN DE B-ACTINA.

Se sabe que la B-actina es una proteína constitutiva de la célula, que continuamente se está transcribiendo, ya que ésta desempeña una variedad de funciones biológicas en los componentes que la integran, tal es el caso del citoesqueleto, el cual es una red dinámica de actina. Sus principales funciones biológicas están relacionadas con la movilidad celular y los cambios en la forma de la célula durante el ciclo celular. Dada su gran importancia en el metabolismo celular esta proteína se expresa de forma constitutiva y se usa como un indicador de síntesis proteica. Por esta razón, la presencia de B-actina es utilizada como un parámetro interno de la técnica RT-PCR y la ausencia de esta proteína se interpreta como un error de la técnica. En base a esto, el hecho de que se hayan obtenido productos de amplificación para B-actina, en las muestras cultivadas en presencia de IL-2 así como en los controles, nos indica que las condiciones de la PCR utilizadas en este trabajo son las adecuadas para la amplificación de cualquier primers de interés, en este caso para B-actina.

Los resultados obtenidos para la amplificación de B-actina en las líneas celulares C33 y VIBO cultivadas a 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días en ausencia o presencia de 100 UI/mL de IL-2, muestran, un producto de amplificación de 234 pb (figura 3).

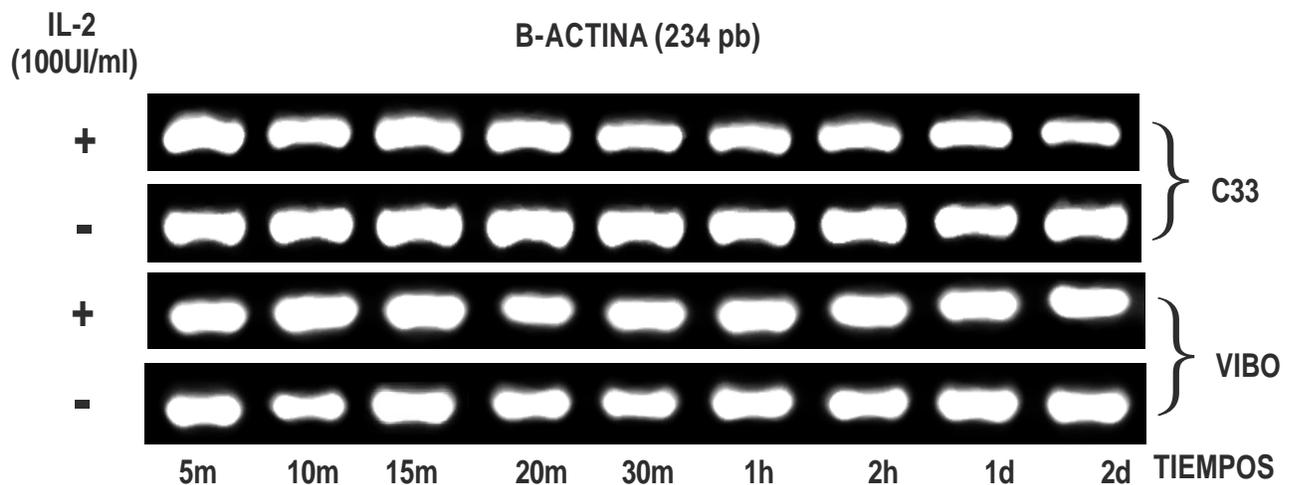


Figura 3. Expresión de B-actina en las líneas celulares C33 y VIBO. Se cultivaron las líneas celulares en ausencia y presencia de IL-2 por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días. Los resultados indican la presencia de productos de amplificación de 234 pb para B-actina, en ambas líneas celulares en ausencia o presencia de IL-2 a todos los tiempos de cultivo.

Dado que, se obtuvieron productos de amplificación para β -actina en las condiciones antes descritas, confirmamos que el protocolo diseñado para la técnica de PCR garantiza la amplificación de otros primers como los diseñados para caspasa-3 y caspasa-9.

EXPRESION DE CASPASA-3 Y CASPASA-9 EN LA LÍNEA CELULAR CALO.

Dado que y se ha reportado que IL-2 regula la transcripción de caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas de CaCu, positivas a VPH, CALO e INBL. En este trabajo, se utilizó la línea celular CALO como control positivo de la regulación transcripcional de caspasas por IL-2.

Las células de la línea CALO, se cultivaron a 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días en ausencia ó presencia de 100 UI/mL de IL-2. Los resultados para las muestras cultivadas en ausencia de IL-2 muestran un producto de amplificación para caspasa-3 de 151 pb y para caspasa-9 de 174 pb, sin observarse variación en su expresión con respecto al tiempo de cultivo. Mientras que en las células cultivadas en presencia de IL-2, se observa una mayor expresión del producto de amplificación para ambas caspasas en todos los tiempos de cultivo (figura 4). Estos resultados coinciden con los reportados por Martínez Fernández en 2011.

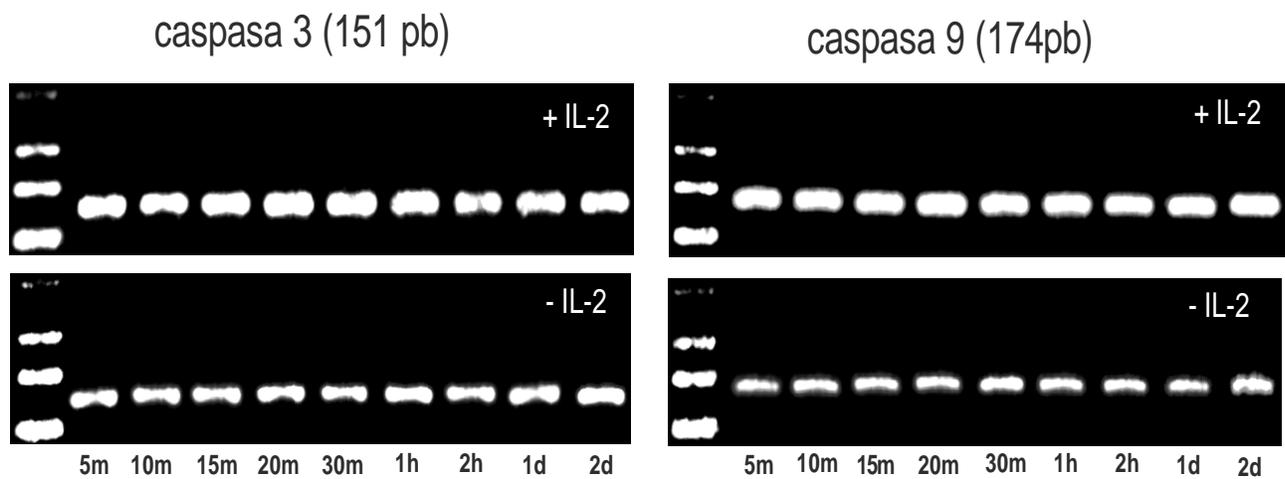


Figura 4. Expresión de caspasa-3 y caspasa-9 en la línea celular CALO. Se realizaron cultivos a diferentes tiempos por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días en ausencia y presencia de IL-2. Los resultados muestran un producto de amplificación de 151 pb para caspasa-3 y 174 pb para caspasa-9 en los controles, este producto de amplificación es mayor en células cultivadas con IL-2.

EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN LA LÍNEA CELULAR C33.

Se sabe que la caspasa-3 desempeña una función efectora en la cascada de señalización del proceso de apoptosis y participa en los cortes finales de sustratos que dan la morfología característica de la apoptosis. Con la finalidad de evaluar el efecto de IL-2 sobre la regulación de la transcripción de esta caspasa, en células de la línea C33, VPH negativa, se realizaron cultivos de esta línea celular a 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días en ausencia ó presencia de 100 UI/mL de IL-2.

Los resultados obtenidos muestran un producto de amplificación para caspasa-3 de 151 pb, de forma constante para todos los tiempos de cultivo, ya sean células cultivadas en ausencia o presencia de IL-2. No se observa una mayor expresión del amplificado de caspasa-3 en las muestras estimuladas con IL-2 con respecto a su control para cada tiempo de cultivo (figura 5).

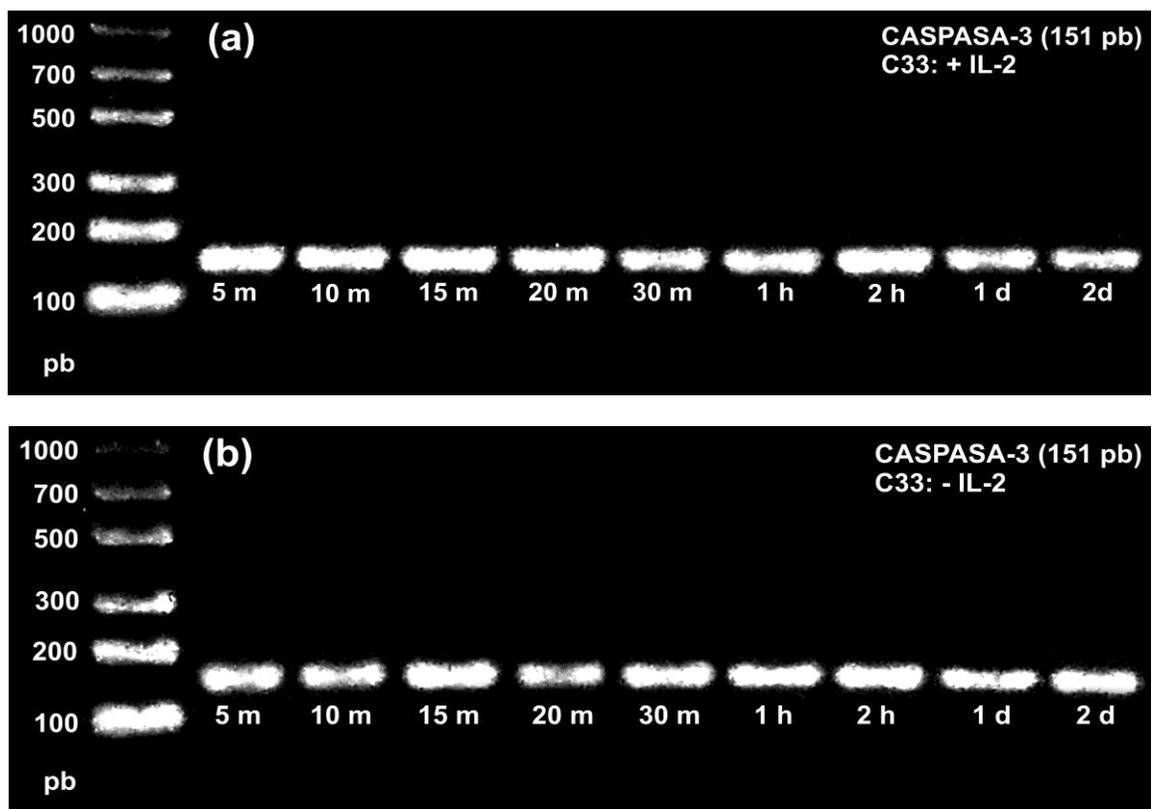


Figura 5. Expresión de caspasa-3 en la línea celular C33. Se cultivo la línea celular C33 en ausencia (b) y presencia (a) de IL-2 por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días. Los resultados muestran un producto de amplificación de 151 pb para caspasa-3, en ambas muestras. Sin observarse una variación en la expresión del producto de amplificación para la caspasa, con respecto a la presencia de IL-2 y los tiempos de cultivo.

EXPRESIÓN DE CASPASA-9 EN LA LÍNEA CELULAR C33.

La caspasa-9 pertenece a la subfamilia de caspasas iniciadoras, en el proceso de señalización del proceso de apoptosis a nivel intrínseco. La cual, conforma un complejo denominado apoptosoma que recluta y activa a caspasas efectoras como la caspasa-3.

Los resultados obtenidos muestran un producto de amplificación para caspasa-9 de 174 pb, tanto para muestras cultivadas en ausencia como en presencia de 100 UI/mL de IL-2. No se observa variación en la expresión del amplificado para caspasa-9, cuando las células están en presencia de IL-2, se observa un amplificado relativamente constante para todos los tiempos de cultivo, con respecto al control (figura 6).

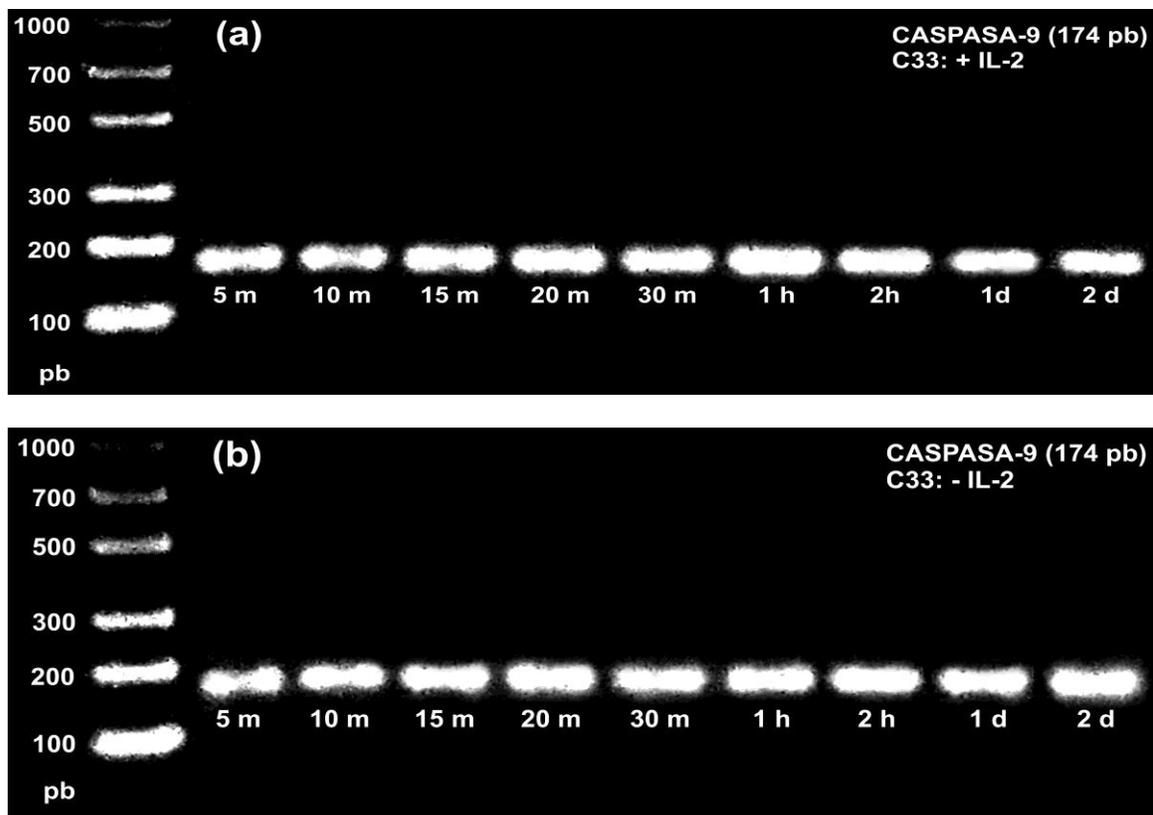


Figura 6. Expresión de caspasa-9 en la línea celular C33. Se cultivo la línea celular C33 en ausencia (b) y presencia (a) de IL-2 por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días. Los resultados muestran un producto de amplificación de 174 pb para caspasa-9 en ambas muestras. Con una expresión del amplificado constante y sin variación, con respecto a la presencia de IL-2 y los tiempos de cultivo.

EXPRESIÓN DE CASPASA-3 EN LA LÍNEA CELULAR VIBO.

Los resultados obtenidos para la línea celular VIBO, muestran un amplificado para caspasa-3 de 151 pb en células cultivadas en ausencia ó presencia de 100 UI/mL de IL-2. En particular en las células cultivadas en ausencia de IL-2, observamos una disminución del producto de amplificación a 20 minutos, 1 hora y 2 días con respecto a los demás tiempos. Mientras que en las células cultivadas en presencia de IL-2, se observa un aumento en el producto de amplificación para caspasa 3 a los 2 días, sin variaciones entre los demás tiempos de cultivo (figura 7).

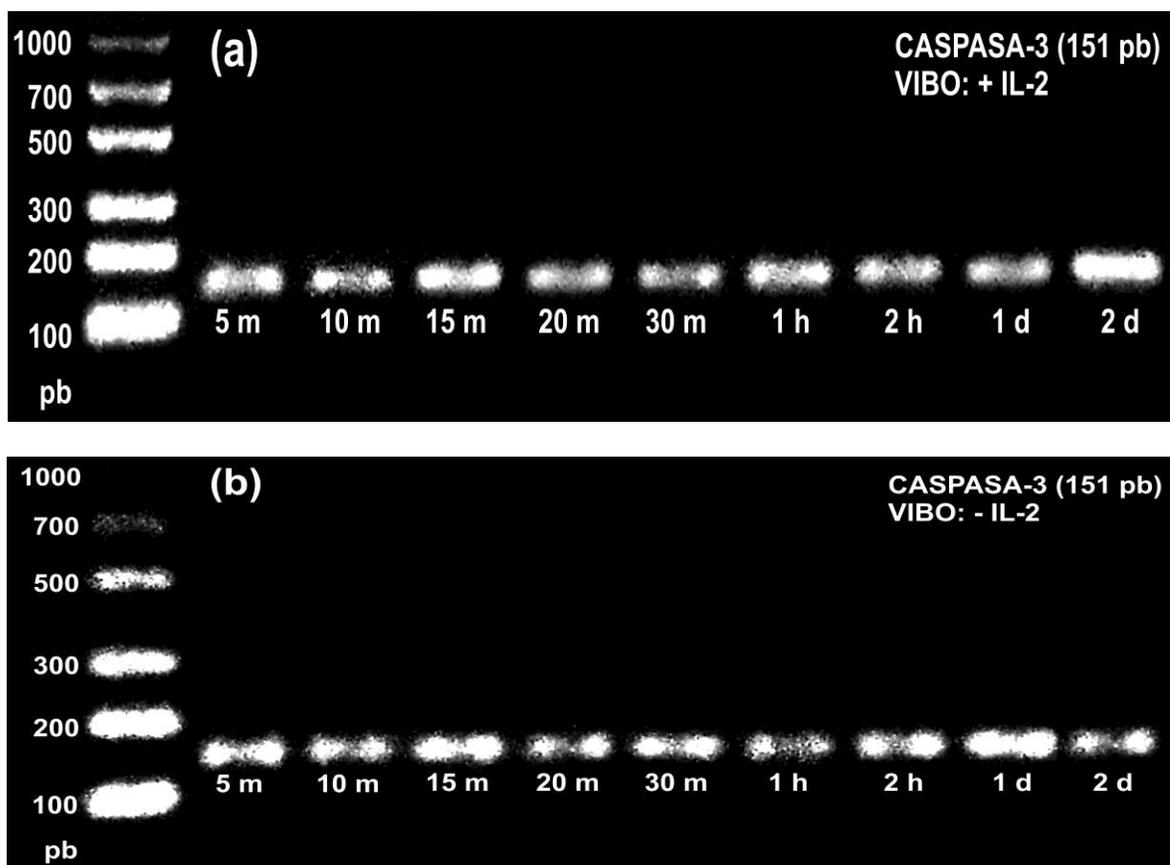


Figura 7. Expresión de caspasa-3 en la línea celular VIBO. Se cultivo la línea celular VIBO en ausencia (b) y presencia (a) de IL-2 por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días. Los resultados muestran un producto de amplificación de 151 pb para caspasa-3, en ambas muestras. Con un aumento de expresión a los 2 días, en células cultivadas con IL-2 y una disminución a los 20 minutos, 1 hora y 2 días en células cultivadas en ausencia de IL-2.

EXPRESIÓN DE CASPASA-9 EN LA LÍNEA CELULAR VIBO.

Los resultados obtenidos nos muestran un producto de amplificación para caspasa-9 de 174 pb, de forma semejante para todos los tiempos de cultivo en ausencia ó presencia de 100 UI/mL de IL-2. Se observa una expresión semejante para las dos muestras, sin aumento en el producto de amplificación por la presencia de IL-2. Tampoco se observa variación de la expresión con respecto al tiempo (figura 8).

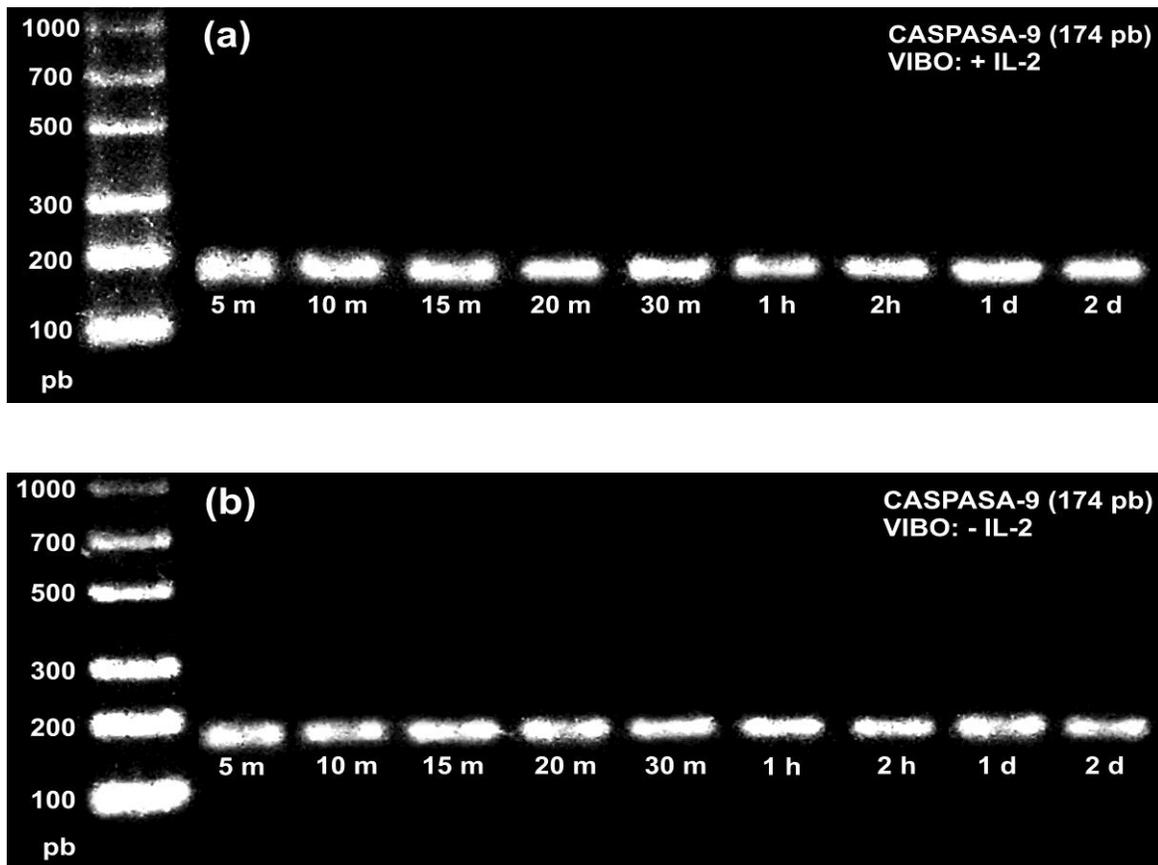


Figura 8. Expresión de caspasa-9 en la línea celular VIBO. Se cultivo la línea celular VIBO en ausencia (b) y presencia (a) de IL-2 por 5, 10, 15, 20, 30 minutos, 1, 2 horas y 1, 2 días. Los resultados muestran un producto de amplificación de 174 pb de caspasa-9 para ambas muestras. Con una expresión del amplificado igual y constante, sin importar la presencia de IL-2 y el tiempo de cultivo.

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CASPASA-3 Y CASPASA-9 EN LAS LÍNEAS C33 y VIBO.

Las líneas celulares C33 y VIBO son derivadas de células del carcinoma de cérvix, estadio IIA y IIB respectivamente, considerados estadios tempranos del desarrollo neoplásico. Ambas líneas celulares se desarrollaron por mutaciones de genes involucrados en el ciclo celular y tienen como característica principal ser negativas al genoma (ADN) del VPH que es considerado el principal factor etiológico de esta neoplasia.

Para esta comparación se consideraron los datos obtenidos de las muestras de cultivos en ausencia y presencia de 100 UI/mL de IL-2 para C33 y VIBO. Se observa, ambas líneas celulares, la expresión de caspasa -3 y caspasa-9 en todos los tiempos de cultivo. Sin embargo, la mayor expresión del amplificado para las caspasas se presenta en la línea C33. Cabe mencionar que al comparar los resultados obtenidos con VIBO y C33, esta última presenta un patrón constante de expresión de ambas caspasas con respecto al tiempo de cultivo, sin cambios por la presencia de IL-2. Para el caso de la línea VIBO se puede observar que existe variación en la expresión de caspasa -3 con respecto al tiempo, sobre todo en las muestras cultivadas en presencia de IL-2. Mientras que para caspasa -9 no se observa variación en la expresión del producto de amplificación con respecto al tiempo ó la presencia de IL-2 (figura 9).

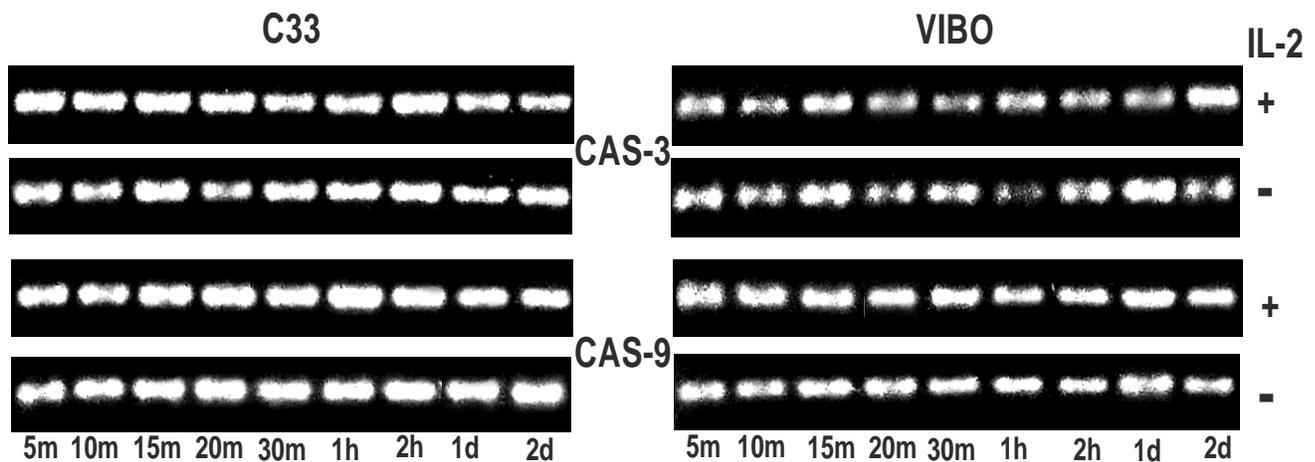


Figura 9. Expresión de caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas de CaCu C33 y VIBO. Se realizó una comparación de la expresión de caspasa-3 y -9 en las dos líneas celulares, observando una mayor expresión de amplificado para caspasa-3 y -9 en C33, en relación a VIBO. Sin ninguna evidente regulación positiva del mensajero por parte de la IL-2.



DISCUSIÓN.



Se sabe que IL-2 juega un papel importante en la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T, en particular los linfocitos T citotóxicos (CD8+), los cuales participan en la respuesta antitumoral, por lo cual esta citocina ha cobrado gran interés como alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cáncer.

En proyectos previos, nuestro laboratorio, Oncología Celular, evaluó el papel de IL-2 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCu) CALO e INBL, demostrando que estas células responden de manera diferencial a distintas concentraciones de IL-2 exógena, a 10 UI/mL induce su proliferación, mientras que a 100 UI/mL la inhibe. Estos datos indican que el efecto de esta citocina, sobre la proliferación de las células de CaCu, está en función de su concentración y el tiempo que permanece en el cultivo [106].

Por otro lado, se ha demostrado que al cultivar células de las líneas CALO e INBL (positivas a VPH) en presencia de 100UI/mL de IL-2, las células no solo inhiben su proliferación, sino que mueren por apoptosis [107]. La apoptosis se ha determinado por la presencia de anexina V y fragmentación de ADN, que se sabe son procesos regulado por la señalización mediada tanto por caspasas iniciadoras, como por caspasas efectoras ó ejecutoras.

Con el propósito de estudiar si la regula IL-2, también regula la expresión de mensajero para caspasa-3 y caspasa -9 en células de CaCu negativas a VPH, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de 100UI/mL de IL-2 exógena en un modelo experimental *in vitro*. Para ello se evaluó la expresión del RNA mensajero (RNAm) para caspasa-3 y caspasa-9 en células de las líneas C33 y VIBO cultivadas a diferentes tiempos en ausencia y presencia de esta citocina.

Para conocer si las condiciones de la técnica RT-PCR, utilizada en este estudio, eran las óptimas se procedió a realizar una PCR, para la proteína B-actina. Se utiliza B-actina como control interno de la PCR, ya que esta es una proteína constitutiva en las células, debido a que está involucrada en diversos procesos celulares y la presencia de su producto de amplificación es una prueba positiva para esta técnica. Los resultados muestran para ambas líneas celulares, tanto para muestras estimuladas con IL-2 como para las muestras cultivadas en ausencia de IL-2, una banda de 234 pb, tamaño esperado para el producto de amplificación de b-actina, con lo cual se corrobora que las condiciones de la PCR son las adecuadas para amplificar cualquier primer.

Es ampliamente reconocido que las funciones fisiológicas de las caspasas, son conservadas en la mayoría de las especies. Investigaciones recientes, sobre la actividad y los sustratos de las caspasas en ausencia de muerte celular, han ayudado a definir y caracterizar las funciones de las caspasas. Con base a estas investigaciones se han descrito dos funciones principales de las caspasas: 1) la apoptótica y 2) la no-apoptótica [82].



El papel de las caspasas apoptóticas en la muerte celular está bien definido. En este proceso las caspasas -2, -8, -9 y -10 son definidas como caspasas iniciadoras, mientras que las caspasas -3, -6 y -7, como caspasas efectoras [13].

Las funciones no-apoptóticas de las caspasas involucran una variedad de procesos celulares, uno de estos es la proliferación celular, donde algunos estudios han demostrado, un papel esencial de la caspasa-8 en la proliferación de células del sistema inmunológico, como son los linfocitos. Estos estudios han demostrado que pacientes con mutaciones en los zimógenos de caspasa-8 muestran deficiencias en la activación de linfocitos T, B y células NK [83].

Por otro lado, se sabe que caspasa-3 media la fosforilación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) inhibidor de p21 contribuyendo a la progresión del ciclo celular. La unión del inhibidor de CDK p21 al PCNA, un cofactor de la ADN polimerasa, promueve la proliferación celular [84].

Otra de las funciones no-apoptóticas de las caspasa es la diferenciación celular, que se ha demostrado a través de la enucleación para conformar megacariocitos, eritrocitos, plaquetas y queratinocitos, proceso en el cual participan las caspasa efectoras -6 y -7. Las caspasa-2, -3 y -9 se activan de forma transitoria durante este proceso, en la división de proteínas nucleares [85,86].

En base a lo arriba mencionado y en las evidencias presentadas en este trabajo, que no muestran diferencia entre los productos de amplificación para caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas celulares C33 y VIBO cultivadas en ausencia ó presencia de IL-2. Demostramos que en estas células de CaCu, las caspasas están siendo transcritas constantemente, como proenzimas ó zimógenos, catalíticamente inactivas, las cuales pueden ser activadas por procesos de proteólisis mediado por un estímulo apoptótico. Por lo que, la transcripción, observada, de las caspasas tendría el propósito de conformar un almacenamiento de proenzima necesaria e indispensable, para un posible proceso de inducción de apoptosis en las células tumorales, siempre y cuando las células reciban una señal de muerte.

Sin embargo, ya que recientemente, se ha publicado que las caspasa-3 y caspasa-9, a pesar de ser clasificadas como caspasas pro-apoptóticas, también pueden realizar otras funciones como la proliferación, diferenciación y maduración celular, pensamos que no podemos descartar que la presencia de los amplificados para caspasa-3 y caspasa-9, sin cambio en presencia de IL-2, en las líneas celulares C33 y VIBO puedan estar relacionados con alguno de estos procesos celulares no apoptóticos [82].

Lo antes mencionado indica que si una célula tumoral no recibe una señal de muerte, las caspasas que sintetiza pueden estar participando en los procesos de proliferación, que podría ser otro mecanismo por el cual las células tumorales sustentan su progresión.



El proceso de apoptosis se da por dos vías, la primera denominada vía extrínseca o de receptores, donde la activación de caspasa-8 es considerada clave en la iniciación del proceso de muerte celular, mediada por receptores de muerte. Por ejemplo, tras la activación de receptores de TNF, la caspasa-8 es reclutada por el complejo inductor de señalización de muerte (DISC) a través de la unión de la proteína adaptadora FADD. Esto da lugar a la activación de la caspasa-8 y con ello la muerte celular [39, 40].

La segunda vía de la apoptosis es denominada vía intrínseca o mitocondrial donde la caspasa-9 es esencial para su activación. La activación de caspasa-9 es mediada por proteínas de la familia Bcl-2. En esta vía de muerte celular, la mitocondria libera al citosol citocromo c que se une a APAF para formar el apoptosoma que activa a caspasa-9 y esta a caspasa-3 [46].

Ambas vías de la apoptosis activan a las caspasa-3, -6 y -7 efectoras, río abajo, las cuales se unirán a diferentes sustratos celulares para generar los cambios moleculares característicos de la apoptosis, que son el resultado de una serie de eventos jerárquicos [77].

Esta jerarquía del proceso apoptótico lo podemos correlacionar con nuestros resultados que muestran una mayor expresión de los productos de amplificación para caspasa-9 y menor expresión de caspasa-3, en ambas líneas celulares para los mismos intervalos de tiempo. Aunque caspasa-9 es definida como iniciadora, capaz de desencadenar el proceso de apoptosis a nivel mitocondrial, ésta no es la única función celular que posee, ya que se ha reportado que esta caspasa participa en la diferenciación de células linfoides [85, 86]. Por lo cual, en las líneas celulares de CaCu, la síntesis de RNAm para caspasa-9 puede inducir su muerte por apoptosis ó bien promover su proliferación. Mientras que la menor expresión de caspasa-3 se puede atribuir a su participación posterior, siempre y cuando, la célula reciba una señal de muerte. Sin embargo, no debemos olvidar que caspasa-3 también puede participar en procesos celulares diferentes al de la ejecución de la apoptosis, tal como ocurre con células linfoides donde esta caspasa promueve su proliferación [84].

Ahora bien, la expresión constante del mensajero para caspasa-3 y caspasa-9 en los diferentes tiempos de cultivo de las células de CaCu en presencia de IL-2. Indica que la citocina exógena no tiene un papel significativo en la regulación de la transcripción de RNAm para caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas C33 y VIBO. Con lo cual evitan entrar a un proceso de muerte celular por apoptosis inducida por IL-2. Los datos obtenidos para las líneas C33 y VIBO se oponen a lo reportado por del Río, Ortiz 2010, quien demuestra que otras líneas de CaCu CALO e INBL, son inducidas a muerte por apoptosis cuando son cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 exógena.

Esta respuesta diferencial a IL-2, sobre la expresión de mensajeros para caspasas, en las líneas de CaCu utilizadas nos hace pensar que la sola presencia de IL-2 en el medio de cultivo, no es condición suficiente



para inducir la transcripción del mensajero para caspasas e inducir la muerte por apoptosis de las células. Por lo cual debemos de considerar la influencia de otras características de las masas tumorales para determinar su respuesta a IL-2. Una de estas características a tomar en cuenta es el estadio de los tumores a partir de los cuales se obtuvieron las líneas celulares.

La información con que contamos demuestra que ambas líneas celulares pertenecen a estadios tempranos del desarrollo neoplásico, la línea C33 pertenece a un estadio IIA mientras que VIBO corresponde a un estadio IIB, estadios de desarrollo muy cercano por lo que esperábamos que IL-2 regulará de una manera muy parecida la expresión del mensajero de caspasas-3 y caspasa -9 entre ambas líneas. O bien que regulara positivamente la expresión del mensajero de estas caspasas tal y como se ha reportado para la línea CALO estadio IIB, en la cual la adición de IL-2 exógena además de regular el aumento del RNAm para caspasa-3 y caspasa-9 induce la muerte por apoptosis en estas células. Sin embargo, los resultados obtenidos para C33 y VIBO no muestran cambios en la expresión del mensajero para las caspasas, a diferencia de la línea CALO. Cabe destacar que los resultados obtenidos para VIBO y CALO, ambas estadio IIB, son opuestos, por lo cual el estadio de la masa tumoral, que dio origen a la línea celular, no es el factor que determina la respuesta que las células de CaCu tienen ante IL-2 y debemos pensar en otra característica de las líneas celulares que podría estar modulando la regulación de la expresión de mensajero para caspasas en C33 y VIBO.

Al respecto, proponemos que la infección por virus del papiloma humano (VPH) en las células del cáncer cervicouterino, puede ser el factor que influya en la respuesta de las células a IL-2. Se sabe que la transformación neoplásica de las células del cérvix se debe a una infección por el VPH, de hecho el 99% de las biopsias de este tipo de tumor presentan proteínas virales.

Dado que las líneas celulares C33 y VIBO son negativas al VPH y la línea CALO es positiva a VPH, suponemos que las proteínas virales pueden estar involucradas en la regulación de la expresión de mensajero para las caspasas en la línea celular CALO lo cual no ocurre en C33 y VIBO por la ausencia de estas proteínas virales. Por lo que proponemos que la presencia de las proteínas virales en las células del CaCu las hace más susceptibles a morir por apoptosis, en presencia de IL-2, tal como el reporte de del Río-Ortiz (107).

Por otro lado, contamos con datos de Martínez-Fernández 2011, quien trabajó con las líneas celulares CALO e INBL (positivas al VPH) y demuestra que la adición de 100 UI mL de IL-2 regula positivamente la expresión de caspasa-3 y caspasa -9 en estas líneas. Por lo que sugerimos que la regulación, por parte IL-2, en la expresión del mensajero para caspasas en las células de CaCu, está regulada por la presencia del VPH.



Otra característica de las células de CaCu, a considerar y que puede intervenir en la regulación de mensajeros para caspasas, es la expresión de receptores para IL-2. Alvarado Moreno, 1997 y Rangel Corona 2010, reportan la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en las líneas de CaCu CALO e INBL, misma líneas, que de acuerdo con Martínez-Fernández, responden a IL-2 regulando la expresión de mensajero para caspasas -3 y caspasa-9. Los datos de Herrera-Miranda (datos no publicados), reportan que la línea celular C33, no transcribe RNA mensajero para las cadenas α , β , y γ , del RIL-2, evento que no se modifica al cultivar a estas células en presencia de IL-2. Los resultados de Herrera-Miranda sugieren que la presencia del RIL-2 en células de CaCu determina la regulación de la expresión del mensajero para caspasas-3 y caspasa -9 en estas células.

La presencia del VPH y la expresión del IL-2R en células de CaCu pueden jugar un papel importante en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular.

Finalmente, podemos proponer que la nula regulación de la expresión del mensajero para las caspasas-3 y caspasa-9, en las líneas celulares C33 y VIB0, cultivadas en presencia de IL-2, dependen de la falta de expresión del receptor para IL-2 y de la no presencia de proteínas viral del VPH. Y que, el estadio de tumor no modifica la respuesta de las líneas celulares a IL-2. Por lo cual, el uso de IL-2 como tratamiento para células de cáncer cervicouterino se puede considerar una alternativa prometedora en células positivas a RIL-2 y VPH.



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.



CONCLUSIONES:

- La transcripción de RNAm para caspasa-3 y caspasa-9, en células de cáncer cervicouterino C33 y VIBO están siendo codificadas constantemente.
- La expresión del RNAm para caspasa-9 es mayor que el de caspasa-3, en las líneas celulares C33 y VIBO.
- 100 UI/mL de IL-2 no modifica la expresión basal del RNAm para caspasa-3 y caspasa-9 en células de cáncer cervicouterino C33 y VIBO, negativas al VPH.
- La expresión de caspasa-3 y caspasa-9 por 100 UI/mL de IL-2, podría estar mediada por la presencia de RIL-2 y de proteínas virales del VPH.



PERSPECTIVAS:

Para ampliar el estudio del comportamiento de las caspasas, en las líneas celulares C33 y V180 en presencia de IL-2, sería conveniente realizar los siguientes experimentos:

- Identificar la presencia de caspasa-3 y caspasa-9 en las líneas celulares C33 y V180 en presencia de 100 UI/mL de IL-2.
- Determinar la actividad de la caspasa-3 y caspasa-9 en presencia de IL-2.
- Transfectar la líneas celulares C33 y V180 con el genoma del VPH y evaluar la expresión del RNAm para caspasa-3 y caspasa-9 en presencia de IL-2.



REFERENCIAS.



1. **Robert A., Gatenby, Robert J., Gillies., Joel S. Brown.,** The evolutionary dynamics of cancer Prevention. *Nature.Rev.Cancer.* 2010; 10: 226-227
2. **Michod, R. E. & Roze, D.,** Cooperation and conflict in the evolution of multicellularity. *Heredity.* 2001; 86: 1-7.
3. **Frederik H. Igney., Peter H. Krammer.,** Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature. Rev. Cancer.* 2002; 2: 277-288.
4. **Norbury C.J., Hickson ID.,** Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 367-401.
5. **Hirsch T., Marchetti P., Susin SA, Dallaporta B.,** Theapoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene.* 1997; 15: 1573-1581.
6. **Wyllie AH., Kerr JF., Currie AR.,** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev.Cytol.* 1980; 68: 251-306.
7. **Yuan J.,** Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J. Cell Biochem.* 1996; 60: 4-611.
8. **Alexei Degterev., Michael Boyce., Junying Yuan.,** A decade of caspases.nature. *Oncogene.* 2003; 22: 8543-8567.
9. **Thornberry NA., Bull HG., Calaycay JR., Chapman KT., Howard AD., et al.,** A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 1992; 356: 768-774.
10. **Cerretti DP., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., Van Ness K., et al.,** Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1992; 256: 97-100.
11. **Yuan, J., S. Shaham, H. M. Ledoux., H. R. Horvitz.,** The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-b-converting enzyme. *Cell.* 1993; 75: 641-652.
12. **Fuentes-Prior P., Salvesen GS.,** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *J. Biochem.* 2004; 384: 201-232.
13. **Lakhani SA., Masud A., Kuida K., Porter Jr GA., Booth C.J., et al.,** Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science.* 2006; 311: 847-851.
14. **Degterev A., Boyce M, Yuan J.,** A decade of caspases. *Oncogene.* 2003; 22: 8543-8567.
15. **Martinon, F., Hofmann, K., Tschopp, J.,** The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr. Biol.* 2001; 11: 118-120.
16. **Weber, C.H., Vincenz, C.,** The death domain superfamily: a tale of two interfaces.Trends Biochem. *Science.* 2001; 26, 475-481.



17. **Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R.P., Ng, S.C., et al.**, NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*. 1998; 392: 941–945.
18. **Hofmann, K.**, The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol. Life Science*. 1999; 55: 1113–1128.
19. **Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., et al.**, Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 1994; 78: 343–352.
20. **Grütter, M.G.**, Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 200; 10: 649–655.
21. **Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., et al.**, Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994; 370: 270–275.
22. **Riedl SJ, Shi Y.**, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5: 897–907.
23. **Fischer, U., Jänicke, R.U., Schulze-Osthoff, K.**, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 76–100.
24. **Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H.**, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999; 68: 383–424.
25. **Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri.**, CPP32, a Novel Human Apoptotic Protein with Homology to *Caenorhabditis elegans* Cell Death Protein Ced-3 and Mammalian Interleukin-1 β -converting Enzyme. *E. S. J. Biol. Chem.* 1994; 269: 30761–30764.
26. **Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., et al.**, Yama/CPP32/13, a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitible Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell*. 1995; 81: 801–809.
27. **Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., et al.**, Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995; 376: 37–43.
28. **Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., Earnshaw, W. C.**, Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *Nature*. 1994; 371: 346–347.
29. **Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., et al.**, The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Struct. Biol.* 1996; 3: 619–625.
30. **Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Poirier, G. G., Froelich, C. J., Dixit, V. M.**, ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 16720–16724.



31. **Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J.**, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104: 487-501.
32. **Browning, J. L.**, Lymphotoxin, a novel member of the TNF family that forms a heterotrimeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*. 1993; 72: 847-856.
33. **Ashkenazi, A. & Dixit, V. M.**, Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1308.
34. **Chinnaiyan, A. M. O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V. M.**, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995; 81: 505-512.
35. **J.H. Naismith, S.R.**, Sprang, Modularity in the TNF-receptor family, Trends Biochem. *Science*. 1998; 23: 74-79.
36. **A. Singh, J. Ni, B.B. Aggarwal.**, Death domain receptors and their role in cell demise. *J. Interferon Cytokine Res*. 1998; 18: 439-450.
37. **Rubio-Moscardo F., Blesa D., Mestre C., Siebert R., Balasas T., et al.**, Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*. 2005; 106: 3214-3222.
38. **Wajant H.**, The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002; 296: 1635-1636.
39. **M.E. Peter, P.H. Krammer.**, The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 26-35.
40. **M. Sprick, E., Rieser, H., Stahl, A., Grosse-Wilde, M., Weigand, H. Walczak.**, Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signaling complexes in FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*. 2002; 21: 4520-4530.
41. **Whiteside ST, Israel A.**, I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*. 1997; 8: 75-82.
42. **C. Scaffidi, S., Fulda, A., Srinivasan, C., Friesen, F., Li, K.J., et al.**, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998; 17: 1675-1687.
43. **S. Fulda, K.M. Debatin.**, Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1705: 27-41.
44. **Saelens X., Festjens N., Vande Walle L., van Gurp M., van Loo G.**, Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004; 23: 2861-2874.
45. **Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig PE., Didelot C.**, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006; 13:1423-33.
46. **Chandra D., Bratton SB., Person MD., Tian Y., Martin AG, Ayres M., et al.**, Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome C and inhibiting apoptosome. *Cell*. 2006; 125: 1333-134.
47. **Stennicke HR., Deveraux QL., Humke EW., Reed JC., Dixit VM., Salvesen GS.**, Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem*. 1999; 274: 8359-8362.



48. **Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen GS.,** The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell.* 2006; 22: 269–275.
49. **Chao Y., Shiozaki EN., Srinivasula SM., Rigotti DJ., Fairman R.,** Engineering a dimeric caspase-9: a re-evaluation of the induced proximity model for caspase activation. *PLoS Biol.* 2005; 3:1079–1087.
50. **Bratton SB., Walker G., Srinivasula S., Sun X-M., Butterworth M., et al.,** Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* 2001;20: 998–2001.
51. **Schimmer AD.,** Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer. Res.* 2004; 64: 7183–90.
52. **Joza N., Susin SA., Daugas E., Stanford WL, Cho SK., et al.,** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001; 410:549–554.
53. **Susin SA., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., et al.,** Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000; 192: 571–580.
54. **Li LY, Luo X, Wang X.,** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001; 412: 95–49.
55. **Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A.,** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998; 391:43–50.
56. **Cory S, Adams JM.,** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature. Rev. Cancer.* 2002; 2:647–656.
57. **Cleary ML, Sklar J.,** Nucleotide sequence of a t(14:18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 82:7439–7443.
58. **Rebecca C., Taylor, Sean P., Cullen., Seamus J. Martin.,** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *nature. reviews. mol. Cell Biol.* 2009; 9: 231-241.
59. **Otani, H., Erdos, M., Leonard, W.J.,** Tyrosine kinase(s) regulate apoptosis and bcl-2 expression in a growth factor dependent cell line. *J Biol Chem.* 1993; 268: 22733–22736.
60. **Chen L, Willis SN., Wei A., Smith BJ., Fletcher JL., Hinds MG., et al.,** Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell.* 2005; 17:393–403.
61. **Mignotte B., Vayssiere JL.,** Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 1998; 252: 1–15.
62. **Salvesen, G.S., Duckett, C.S.,** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 401–410.
63. **Deveraux, Q.L., Reed, J.C.,** IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13: 239–252.



64. **Shi, Y.**, Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 2002; 9:459–470.
65. **Johnson, C.R., Jarvis, W.D.** Caspase-9 regulation: an update. *Apoptosis.* 2004; 9: 423–427.
66. **Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C.**, X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997; 388:300–304.
67. **Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., et al.**, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and Cytochrome C by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 1998; 17: 2215–2223.
68. **Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N.**, C-FLIPR: a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 14507–14513.
69. **Thornberry, N.A., Lazebnik, Y.**, Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281: 1312–1316.
70. **Thome, M., Tschopp, J.**, Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1: 50–58.
71. **Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P.H., Lavrik, I.N.**, C-FLIPR: a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 14507–14513.
72. **Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H., Kirchhoff, S.**, Cellular flc-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the cd95 death-inducing complex. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 20633–20640.
73. **Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E., Yang, X.**, Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J.* 2003; 22: 4132–4142.
74. **Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G., Wu, H.**, Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature.* 2001; 410: 494–497.
75. **Wang, K.K.**, Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000; 23: 20–26.
76. **Blomgren, K., Zhu, C.L., Wang, X.Y., Karlsson, J.O., Leverin, A.L., et al.**, Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 10191–10198.
77. **Slee EA, Adrain C, Martin SJ.**, Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 7320–6.
78. **Sakahira H, Enari M, Nagata S.**, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998; 391: 96–99.
79. **Kothakota S., Azuma T., Reinhard C., Klippel A., Tang J.**, Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294–298.
80. **Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA.**, Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26159–26165.



81. **Fadok VA., de Cathelineau A., Daleke DL., Henson PM., Bratton DL.**, Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001; 276: 1071-1077.
82. **Indrajit Chowdhury., Binu Tharakan., Ganapathy K. Bhat.,** Caspases – An update., *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 2008; 151: 10-27.
83. **Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., et al.**, Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002; 419: 395-399.
84. **Frost, V., Al-Mehairi, S., Sinclair, A.J.**, Exploitation of a non-apoptotic caspase to regulate the abundance of the cdk1 p27 (KIP1) in transformed lymphoid cells. *Oncogene.* 2001, 20: 2737-2748.
85. **Dahm, R.**, Lens fibre cell differentiation a link with apoptosis?. *Ophthalmic Res.* 1999; 31: 163-183.
86. **Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., et al.**, Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 247-254.
87. **J.R.Regueiro Gonzales., C.Lopez Larrera., S.Gonzales Rodriguez.,** Inmunología, Biología Y Patología del sistema Inmune. 3ª. *Ed panamericana, México* 2002:218.
88. **Rangel C.**, Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares. *Ed Plaza y Valdés.* México 1999.
89. **Abbas. K. Andrew.,** Inmunología Celular Y Molecular. 4ª. *Ed. McGraw-Hill.* USA. 2002:552.
90. **Fainboim. Leonard.,** Introducción a la Inmunología Humana. 5ª. *Ed panamericana.* México 2005.p256.
91. **Roitt. Ivan.,** Inmunología. 5ª. *Ed harcourt.* México 2000.p423.
92. **Aguzzi A, Heikenwalder M. Prions.,** cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity.* 2005.
93. **Touchette N, Fogle S.,** Apoptosis it chimes with mitosis. *J. NIF. Res,* USA 1991.
94. **Ministerio de Salud.,** Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino, *Chile.* 2004.
95. Boletín informativo editado por el Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud. *NLS.SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO.* junio-2007.
96. **López -Saavedra y Lizano-Soberón.,** Cáncer Cervino Uterino Y El Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. México. *Cancerología.* 2006; 1: 31-55.
97. **García, M.,** Global Cancer Facts and Figures 2007. (ACS, 2007).
98. **Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J:** Cancer incidence in five continents, vol VII. International *Agency for Research on Cancer,* Scientific Publications number 143. Lyon; IARC, 1997.



99. **Parkin DM, Almonte M, Bruni L.** Burden and trends of typespecific human papillomavirus infections and related diseases in the Latin American and Caribbean region. *Vaccine*. 2008; 26.
100. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** GLOBOCAN 2002; cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, iarc cancer base. Version 2.0, IARCPress, , 2004. no. 5.
101. **Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B.** Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Publica Mex*. 2009;51(suppl 2):S208eS219.
102. **Brisson J, Morin C., Fortier M.** Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia: differences between low- and highgrade lesions. *Am J Epidemiol*. 1994; 140: 700-710.
103. **Lorincz A., Temple G., Kurman R., Jenson A., Lancaster W.** Oncogenic association of specific human papilloma virus types with cervical neoplasia. *J Int Cancer Inst*. 1987; 79: 671-677.
104. **Eduardo Lazcano-Poncea and Betania Allen-Leighb.** Innovation in Cervical Cancer Prevention and Control in Mexico a Center for Population Health Research, National Institute of Public Health, Mexico, D.F., Mexico Reproductive Health Division, *Center for Population Health Research, National Institute of Public Health, Mexico, D.F., Mexico*. Received for publication June 29, 2009; accepted July 8, 2009 (ARCMED-D-09-00314).
105. **R. Rangel-Corona., L. Rodríguez-Cruz, G. Flores-Flores, C. Gómez-Ruiz, I. Soto-Cruz, J.F. Mendoza-Rincon., B Weiss-Steider.** Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Manduzzie Editors*. 1998; 3: 1239-1243.
106. **Alvarado, M. J. A.** Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cervicouterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM, México, D.F. 1997.
107. **Del Río, Ortiz. I.** Estudio de la participación de genes mitocondriales, Citocromo C y Cox 4 en las células de carcinoma de cérvix CALO e INBL. FES-Zaragoza. UNAM, D.F. 2010.
108. **Martínez, Fernández, A.** Determinación de la expresión de ARNm para caspasa 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino: HELA, INBL y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes tiempos. FES-ZARAGOZA. UNAM, D.F. 2011.
109. **Steven A. Williams., Barton E. Slatko, John R. McCarrey.** Laboratory Investigations in Molecular Biology. *Jones and Bartlett Publishers*. Boston. 2007.



ANEXOS.

ANEXO I

MEDIO Y SOLUCIONES DE CULTIVO

Medio de Cultivo

- RPMI-1640/10% SFB

Soluciones para cultivo

- Solución fisiológica de verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)

ANEXO II

REACTIVOS PARA RT/PCR

Reactivos para Extracción ARN Total

- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H₂O inyectable
- H₂O libre de RNAsas

Reactivos para Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Invitrogen)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Invitrogen)
- DNTP´S 5mM (Fermentas)
- Oligo dT (Promega)

Reactivos para (PCR)

- Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)
- DNTP´S 10 mM (Fermentas)
- Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers: β -actina (1:10), Caspasa 9 (1:5), Caspasa 3 (1:5) (Invitrogen)

Reactivos y soluciones para electroforesis

- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 10X, 1X, 0.5 X
- Gel de agarosa al 1.5%
- Marcador de peso molecular
- Buffer de carga Blue/Orange 6X (promega)
- Bromuro de etidio

ANEXO III

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de



bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

Solución fisiológica de Verseno

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias.

-Tris base 3.04
gramos

-Cloruro de sodio 800
gramos

-Cloruro de potasio 0.40
gramos

-Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.20
gramos

Nota: El pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

-Cloruro de sodio 8.0
gramos

-Fosfato de sodio monobásico 2.88
gramos

-Fosfato de potasio 0.4
gramos

-Cloruro de potasio 0.20
gramos

El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

DNTPS 10 mM (MIX)

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

-100 µl de A

-100 µl de G

-100 µl de T

-100 µl de C

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de RNasas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

TBE 10X

- 108 gramos de Tris base

- 55 gramos de Ácido bórico

- 40 mL de EDTA 0.5 M

Nota: lleve a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Guardar a temperatura ambiente.

TBE IX

Tomar 50 mL de TBE 10X y diluirlo en 450 mL de agua destilada.

TBE 0.5X

Tomar 250 mL de TBE IX y diluirlo en 250 mL de agua destilada.

EDTA 0.5 M

-186.1 gramos de EDTA

-1000 mL de agua destilada

Nota: disolver el EDTA en los 1000mL de agua destilada y llevar a PH 8.

Gel de agarosa 1.5%

-1.5 gramos de agarosa en 100 mL de TBE IX

Marcador de Peso Molecular

El marcadores de pesos moleculares ó escalera utilizado en la electroforesis fue de 100 a 1000 pb (Fermentas).

MassRuler™ Express LR Reverse DNA Ladder, ready-to-use

