



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**IL-2 REGULA LA EXPRESIÓN DEL RNAM DE LOS COMPLEJOS DE LA
CADENA RESPIRATORIA, PROMOVRIENDO LA APOPTOSIS EN LAS LÍNEAS
CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E INBL.**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA MOLECULAR)**

PRESENTA

BIOL. ITZEL DEL RIO ORTIZ

**TUTOR PRINCIPAL: DR. BENNY WEISS STEIDER
FES-ZARAGOZA.**

**COMITÉ TUTOR: M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
FES-ZARAGOZA.**

**DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICAS.**

MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**IL-2 REGULA LA EXPRESIÓN DEL RNAM DE LOS COMPLEJOS DE LA
CADENA RESPIRATORIA, PROMOVRIENDO LA APOPTOSIS EN LAS LÍNEAS
CELULARES DE CARCINOMA DE CÉRVIX CALO E INBL.**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA MOLECULAR)**

PRESENTA

BIOL. ITZEL DEL RIO ORTIZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. BENNY WEISS STEIDER

FES-ZARAGOZA.

COMITÉ TUTOR: M. EN C. ROSALVA RANGEL CORONA

FES-ZARAGOZA.

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICAS.

MEXICO D.F.

NOVIEMBRE 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de octubre de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **DEL RÍO ORTIZ ITZEL** con número de cuenta **97384045**, con la tesis titulada **"IL-2 regula la expresión del RNAm de los complejos de la cadena respiratoria promoviendo la apoptosis en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL."**, realizada bajo la dirección del **DR. BENNY WEISS STEIDER**:

Presidente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: M EN C. ROSALVA RANGEL CORONA
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

Sin otro particular, me despido.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. a 29 de octubre de 2013.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica.

Al programa de becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con número de becario: 225396 y de CVU: 250747.

Al programa PAPIIT de la DGAPA por su apoyo en el proyecto IN220108 y PE208910.

Al Comité Totoral integrado por la Dra. Leticia Rocha y M. en C. Rosalva Rangel, por sus consejos y contribuciones a mi trabajo.



AGRADECIMIENTOS

*A mi tutor principal el **Dr. Benny Weiss Steider** por su ardua labor en la dirección del presente trabajo, así como su apoyo y confianza.*

*A mi co-tutora: **M. en C. Rosalva Rangel Corona**, por su paciencia y entrega en la realización del presente trabajo y sobre todo por brindarme su confianza durante toda mi estancia en el laboratorio.*

*A la **Dr. Leticia Rocha**, por sus consejos y aportaciones, las cuales fueron fundamentales para finalizar mi tesis.*

*A los sinodales: **Dra. Lourdes Mora**, **Dr. Alberto Monroy**, **M. en C. Rosalva Rangel**, **Dra. Leticia Rocha** y el **Dr. Juan José Montesinos**, por todos sus consejos y observaciones para enriquecer mi trabajo.*

*A la **Dra. Tere Corona** por su apoyo en el laboratorio y al **Dr. Arturo Valle** por compartir sus conocimientos y brindarme su amistad incondicional.*

*A mis amigas **Reynalda Roldan** y **Evelin Escamilla** por ser mis cómplices y mi apoyo en cada paso que doy.*

*A todos los chicos del laboratorio 4: **Leo**, **Miriam Noemí**, **Cupita**, **Danny**, **Luis Omar**, **Nalle**, **Rubí Santiago** y en especial a mis pequeños **Miguel Barrios** y **Rubí Massé** por brindarme su amistad, confianza y cariño.*

*Y finalmente a nuestro técnico y amigo **Don José Chavarría** por ser una pieza clave en el laboratorio.*



Dedicatorias

*A mi mamá **Josefina Ortiz** que siempre ha estado conmigo brindándome su apoyo, sus consejos y sobre todo alentándome con su infinito amor y sabiduría para terminar este proyecto.*

*A mi papá **Juan Chavero** por todos los momentos en los que requerí su apoyo y sin pensarlo siempre estuvo ahí.*

*A mi hermanita **Erika Del Río** y mi pequeña **Brendita** por todo el amor que me ofrecen día a día.*

*A mi esposo **José Luis Vera** por ser incondicional en este proceso, a pesar de tantos tropiezos y mal carácter, siempre estuviste presente brindándome tu amor y comprensión.*

*A mi hijo **José Emilio** que es mi motor para seguir adelante y por el cual, daría mi vida **TE AMO** gordito.*

*Por último agradezco a todas aquellas personas que recientemente aparecieron en mi vida para compartir este momento y por supuesto a **DIOS y SJTD** por ponerme en este camino y ayudarme a concluirlo.*

Gracias a todos por creer en mí.



INDICE

I.	Abreviaturas.....	1
II.	Resumen.....	4
III.	Abstract.....	5
1. Introducción		
1.1	Interleucina 2 (IL-2).....	6
1.2	Cáncer cérvico uterino.....	7
1.3	Clasificación de CaCU.....	8
1.4	Cáncer y muerte celular.....	10
1.5	Apoptosis.....	11
1.6	Fases de la Apoptosis.....	12
1.7	Caspasas: Procesadoras de la Muerte Celular.....	13
1.8	Activación de las caspasas.....	16



1.9 Funciones Principales de las Caspasas.....	17
1.10 Vías Apoptóticas.....	18
1.11 Cadena Respiratoria.....	21
1.12 Complejos Mitocondriales.....	24
2. Antecedentes.....	31
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos	
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos Particulares.....	33
5. Materiales y Métodos	
5.1 Cultivo y Proliferación de las Líneas Celulares.....	34
5.2 Extracción de RNAm.....	34
5.3 Retrotranscripción (RT).....	36



5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	37
5.5 Electroforesis de DNA Genómico (Escalera de la Muerte).....	38
5.6 Determinación de la Muerte Celular por Anexina V.....	39
5.7 Microscopía Confocal.....	40
6. Resultados.....	42
7. Discusión de Resultados.....	57
8. Conclusiones.....	64
9. Perspectivas.....	65
10. Referencias.....	66
11. Anexos.....	78



ABREVIATURAS

Apaf-1: Factor activador de apoptosis-1.

Apoptosoma: Complejo oligomérico formado por Apaf 1-Citocromo c y procaspasa 9.

Bad: Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, asociado a Bcl-XL /Bcl-2

Bak y Bax: Miembros pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bcl-2: (*B-Cell lymphoma 2*) Miembro de la familia Bcl-2, identificada como producto del proto-oncogen bcl-2.

Bcl-XL. Miembro anti-apoptótico de la familia Bcl-2. Se une y bloquea la activación de Apaf-1.

BH3: Dominio pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2.

BH4: Dominio anti-apoptótico de la familia Bcl-2.

Bid: Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés BH-3 Interacting domain death.

BrEt: Bromuro de etidio.

CaCU: Cáncer cérvico uterino.

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas.

CASPASAS: Cisteína proteasas específicas de ácido aspártico. Enzimas proteolíticas que contienen cisteína en su molécula y verifican la proteólisis en lugares previos a un ácido aspártico.

cDNA: DNA complementario

COX I: Complejo 1: NADH deshidrogenasa

COX II: Complejo 2: Succinato deshidrogenasa; Succinato-ubiquinona reductasa

COX III: Complejo 3: Citocromo reductasa

COX IV: Complejo 4: Citocromo c oxidasa

dATP: Participa en el reclutamiento y activación de la procaspasa 9

DD: Dominio de muerte.

DED: Dominio efector de muerte.



DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: Desoxinucleótido trifosfato.

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas.

FAS: CD95/APO-1. Miembro de la super-familia de receptores de muerte TNF.

FASL: Ligando del receptor de muerte Fas.

FBS: Suero fetal bovino.

FLIP/FLICE: Proteína inhibidora de FLICE/proteína ICE similar a FAS caspasa -8.

IAP: inhibidor de proteínas apoptóticas, identificado como proteína vírica. Posee uno o más dominios BIR críticos para su actividad. Su actividad es inhibida por smac/diablo.

ICAD/CAD: Heterodímero inhibidor/desoxirribonucleasa, que para actuar como desoxirribonucleasa activa necesita ser hidrolizado por caspasas para liberar CAD.

IL-2: Interleucina 2.

IL-2R: Receptor de IL-2.

IP: Yoduro de propidio.

MCP: Muerte celular programada.

NF- κ B: Factor nuclear del locus Kappa de las inmunoglobulinas en células B.

Noxa: Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

Omi/HtrA2: Del inglés *high temperatura required protein*.

OXPPOS: Fosforilación oxidativa.

PARP: poli (ADP-ribosa) polimerasa. Enzima reparador del DNA inactivado por caspasas.

PB: Pares de bases.

PBS: Tampón salino fosfato.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PMP: Proteína polimorfita de membrana.

PS: Fosfatidilserina.

PUMA: proteína BH3.

RNA: Ácido ribonucleico.



RNAm: RNA mensajero.

RT: Retrotranscripción.

RX: Reacción

Smac/DIABLO: Inhibidor de IAP, es el segundo activador mitocondrial de la caspasa/proteína que se une directamente y bloquea la acción inhibidora del IAP.

TBE: Tris borato EDTA.

TNF: Factor de necrosis tumoral que se une al TNFR-1.

TNF-R: Receptor del factor de necrosis tumoral.

TNFR-1: Receptor de muerte del TNF.

TRADD: Proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R1.

TRAF: Factor asociado al receptor TNF.

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF.

UI: Unidades internacionales.

XIAP: proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Es un modulador potente de la apoptosis.

µg: Microgramos.

µl: Microlitos.



RESUMEN

En México el cáncer cérvico uterino (CaCU) es una de las principales causas de muerte en la población femenina, con una tasa de 13.9 por cada 100,000 mujeres en edad reproductiva. Nuestro grupo de trabajo ha identificado las tres cadenas del receptor para IL-2 en líneas celulares de CaCU y en cortes histológicos de biopsias provenientes de diferentes estadios de este cáncer. Encontramos que las células tumorales responden de manera diferencial dependiendo de la concentración de la citocina, de tal manera que 100 UI/mL de IL-2 puede inhibir la proliferación de estas células, las cuales muestran similitud morfológica con células apoptóticas.

En los últimos años se ha trabajado arduamente para esclarecer los mecanismos moleculares que intervienen en la inhibición de la proliferación de las células de CaCU y se ha encontrado que IL-2 induce el incremento del RNAm de algunos genes que participan en el proceso apoptótico. Tomando en consideración que en la apoptosis interviene tanto la liberación del Citocromo c de la mitocondria al citoplasma, así como cambios en el funcionamiento de la cadena respiratoria, en el presente trabajo se evaluó la participación de IL-2 en la regulación de la expresión del RNAm de los genes de la cadena respiratoria COX I, COX II, COX III y COX IV, así como del Citocromo c y su efecto apoptótico en líneas celulares de CaCU; CALO e INBL. Nuestros resultados muestran que no hay cambios significativos en la expresión de los mensajeros para COX I, COX II y COX III en CALO e INBL en presencia de 100 UI/mL de IL-2, mientras que COX IV es inhibido completamente en ambas líneas celulares. Cabe destacar que al estar completamente inhibido el COX IV, el Citocromo c no es oxidado y por tanto permanece y es probablemente secretado al citosol en su forma reducida. Con respecto al Citocromo c, obtuvimos un aumento significativo en la expresión de su RNAm y confirmamos este aumento mediante microscopía confocal. Consideramos que el aumento en la expresión de Citocromo c se debe a que las células estén inducidas a apoptosis, ya que la liberación de Citocromo c es clave para iniciar la muerte celular programada. La confirmación de la presencia de apoptosis en CALO e INBL inducida por IL-2 fue confirmada por la detección de fosfatidilserina y por la presencia de fragmentación del DNA genómico.



ABSTRACT

In Mexico cervical cancer (CaCU) is a major cause of death in the female population with a rate of 13.9 per 100,000 women of reproductive age. Our working group has identified the three receptor chains of IL-2 in CaCU cell lines and in tissue sections from biopsies from different stages of this disease. We found that they respond differentially depending on the concentration of this cytokine in such a way that 100 IU / mL of IL-2 can inhibit the proliferation of these cells with an apoptotic cell morphology.

Recently the molecular mechanisms involved in the inhibition of the proliferation of CaCU cells are beginning to be understood including the expression of mRNA genes induced by IL-2 that are related to apoptosis. The liberation of Cytochrome c from the mitochondria into the cytosol has been found to have an important role in apoptosis, as well as certain changes in the expression of the molecules involved in the respiratory chain. In consequence in this work the role of IL-2 in the regulation of the expression of the mRNA genes for Cytochrome c, and for COX I, COX II, COX III and COX IV, and its induction of apoptosis in the CaCU cell lines, CALO and INBL was evaluated. Our results show that there are no significant changes in the expression of mRNA for COX I, COX II and COX III, but that of COX IV was completely inhibited. On the other hand the mRNA for Cytochrome c was significantly augmented. It is interesting to mention that the fact that COXIV, the molecule responsible for the oxidation of Cytochrome c, is inhibited, points to the possible liberation of this molecule in its reduced form into the cytosol. The increased expression of Cytochrome c induced by 100 U/mL of IL-2 was confirmed by confocal microscopy. We consider that the augmentation of Cytochrome c obtained is related to apoptosis because it is known that the release of this molecule into the cytosol induces programmed cell death. Apoptosis was confirmed by the presence of phosphatidylserine and the fragmentation of DNA typical of programmed cell death.



INTRODUCCIÓN

INTERLEUCINA 2 (IL-2)

La IL-2 es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del National Cancer Institute en Bethesda Maryland, en los Estados Unidos. Se conoció inicialmente como "Factor de crecimiento de células T" y en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en Suiza (1979) se le renombra como IL-2. Su gen fue clonado en 1984, lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante. A partir de entonces se han desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2 (VanderSpek et al., 1996).

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa, con 133 aa y con punto isoeléctrico entre 6.6 y 8.2. Es una molécula hidrofóbica la cual es estable en pH bajo; compuesta principalmente por una unión de cuatro hélices alfa. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4q26-28, contiene tres residuos de cisteína en las posiciones 58, 105 y 125, en donde los dos primeros forman un puente disulfuro que es esencial para la actividad de la molécula. Es producida principalmente por los linfocitos T de subtipo Th1. Algunos clones de células T, líneas e hibridomas también la producen (Mire et al., 1998, Coventry., 1996).

La IL-2 estimula la proliferación de todas las poblaciones de células T y promueve su progresión desde la fase G1 del ciclo celular, lo que permite un incremento en el número celular; asimismo, estimula la actividad citolítica de subtipos de linfocitos T (Smith, 1993).

Se ha demostrado en timocitos que la IL-2 tiene un efecto proliferador, por lo que juega un papel importante en el desarrollo del timo (Mire et al., 1998). La IL-2 promueve la secreción de inmunoglobulinas y genera un aumento en los efectos inmunológicos mediados por linfocitos B (Ciacci et al., 1993 y Vella et al., 1998). Cambia la proliferación de linfocitos granulares y también facilita la destrucción de tumores por activación de macrófagos, NK y células asesinas activadas por linfocinas e incrementa la producción de anticuerpos de las células B (Boni et al., 2001). Así mismo aumenta la actividad antitumoral de los macrófagos, dependiente del anticuerpo y oligodendrocitos (Mire et al., 1998).



En la Inmunoterapia la IL-2 es una proteína muy importante para la respuesta inmunológica mediada por células, al promover la activación y proliferación de los linfocitos T. Su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que este receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón y en células de carcinomas humanos (McMillan et al., 1995). Nuestro grupo de trabajo demostró la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma de RIL-2 en células de CaCU y que éste es activado por la IL-2 exógena y por C-Kit (Rocha, 2004). También, se detectó su presencia en las líneas celulares de CaCU: CALO e INBL, el cual además de tener una expresión diferencial de acuerdo al estadio del tumor, muestra un patrón de fosforilación de proteínas cinasas diferente al del RIL-2 en linfocitos T de donadores sanos (Rangel et al., 1998). Asimismo, se determinó que la proliferación de estas líneas celulares se ve inhibida ante la presencia de altas concentraciones de esta citocina, por lo cual la IL-2 podría ser utilizada como una alternativa terapéutica para las pacientes con CaCU (Rangel et al., 1998., Alvarado, 1997). Diversos trabajos con IL-2 nos indican que esta citocina puede aumentar los niveles de FAS/FASL, y por lo tanto su activación en el proceso apoptótico (Gulcin y Xian, 2004, Yosef et al., 1998), y que altos niveles de IL-2 pueden provocar que la proteína endógena Bax se transloque del núcleo al citoplasma, en donde puede llegar con mayor facilidad a la membrana mitocondrial y de esta manera llevar a cabo su función pro apoptótica. (Rami, 2003).

CÁNCER CÉRVICO UTERINO

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es un conjunto de mutaciones celulares del 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 micro-invasor y posteriormente a invasor cuando e traspasa la membrana basal (MSCN, 2004 y Schiffman et al., 2007).

En México el CaCU, es el segundo cáncer más frecuente entre los tumores malignos en la población femenina, causando más de 4000 muertes al año. Se ha mostrado una fuerte asociación entre los virus del papiloma humano (VPH) y



neoplasias cervicales (Sasagawa, 1996). Y se ha reportado que alrededor del 99% de CaCU puede atribuirse a ciertos tipos de VPH, de los cuales el VPH 16 representa el mayor porcentaje (50%), seguido por el VPH 18 (12%), el VPH 45 (8%) y el VPH 31 (5%). (Alonso et al., 2000, Nazzal et al., 2006).

El genoma de este virus codifica dos tipos de proteínas, las que se encargan del mantenimiento y la replicación del virus (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y otras que forman parte de la cápside del virus (L1 y L2); las oncoproteínas E6 y E7 se expresan en los tejidos tumorales en todas las etapas del cáncer, interactúan con p53 y el gen del retinoblastoma para mantener la proliferación, transformación e inmortalización de las células tumorales infectadas por el virus (Viscidi, et al., 1996 y Lehtinen et al., 2003). Sin embargo, E6 y E7 tienen propiedades de trans-regulación de genes celulares independiente de su asociación con p53 y pRb que también contribuyen al avance del proceso neoplásico.

CLASIFICACIONES DEL CaCU

Las alteraciones del epitelio metaplásico anormal han sido motivo de numerosas clasificaciones. Una primera nomenclatura se realizó en 1930 es la que se incluyen a las displasias leve, moderada o severa, refiriéndose a lesiones precancerosas que culminan con el carcinoma *in situ* (Zaino et al., 1992). En 1968 se acuñó el concepto de Neoplasia Cervical Intraepitelial (NIC) con diferentes grados: NIC I, NIC II y NIC III o carcinoma *in situ* (Parking y Robert., 1993). Una tercera clasificación es la desarrollada en 1988 y se conoce como el Sistema Bethesda: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado en donde se combinan las alteraciones celulares por el virus del papiloma humano (coilocitosis) y NIC I, llamándolo "LGSIL" (*Low grade squamous intraepithelial lesion*) y la combinación de NIC II y NIC III, lo enuncia como "HGSIL" (*High grade squamous intraepithelial lesion*). En México, la clasificación que más se utiliza es el término displasias y NIC (Dzul et al., 2004) (Tabla1).

Nomenclatura del Carcinoma de cérvix

Sistema Bethesda	Normal	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado LSIL		Lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado HSIL	
Richart	Normal	Coilocitosis	NIC I	NIC II	NIC III
Reagan	Normal	Displasia leve		Displasia moderada	Displasia severa/Carcinoma <i>in situ</i>

Tabla 1: Correlación de las nomenclaturas para las lesiones pre-malignas y cáncer *in situ* del cérvix

CLASIFICACIÓN DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL (NIC)

1. NIC I. Sólo las células de la capa profunda son inmaduras, las anomalías nucleares son moderadas, los núcleos son densos a menudo retraídos, las células binucleadas son numerosas.
2. NIC II. Las tres cuartas partes profundas del epitelio tiene células inmaduras, las anomalías nucleares son más acentuadas, los núcleos son más voluminosos e hiper cromáticos. Sólo las capas superficiales experimentan un esbozo de maduración y en ellas se aprecian células aplanadas.
3. NIC III. Todo el grosor del epitelio conserva células inmaduras, las anomalías nucleares son muy importantes, la mitosis es muy numerosa, anormal y se localizan en todos los niveles (Figura 1) (Ramírez, 1997, Dzul et al., 2004).

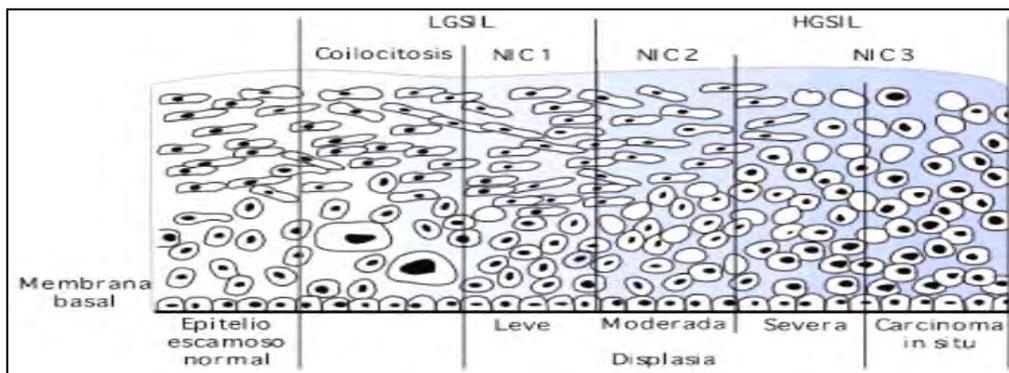


Figura 1. Cambios morfológicos en las células de la membrana basal "NIC" (Fernández, 1998).



CANCER Y MUERTE CELULAR

El crecimiento anormal y acelerado de células tumorales, es un claro ejemplo de la evasión a la muerte celular. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada necrosis (Figura 2), (Lizarbe, 2007).

La muerte celular se puede producir por **necrosis**, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego nekros “muerte”) es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deteriora las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias (Lizarbe, 2007).

La muerte celular programada o **apoptosis**, proviene del griego clásico (apo: “fuera de” o “separación” y ptosis: “caída”), su función principal en el organismos es la homeostasis celular destruyendo las células genéticamente dañadas evitando la aparición de enfermedades como el cáncer (Mendez, 2002).

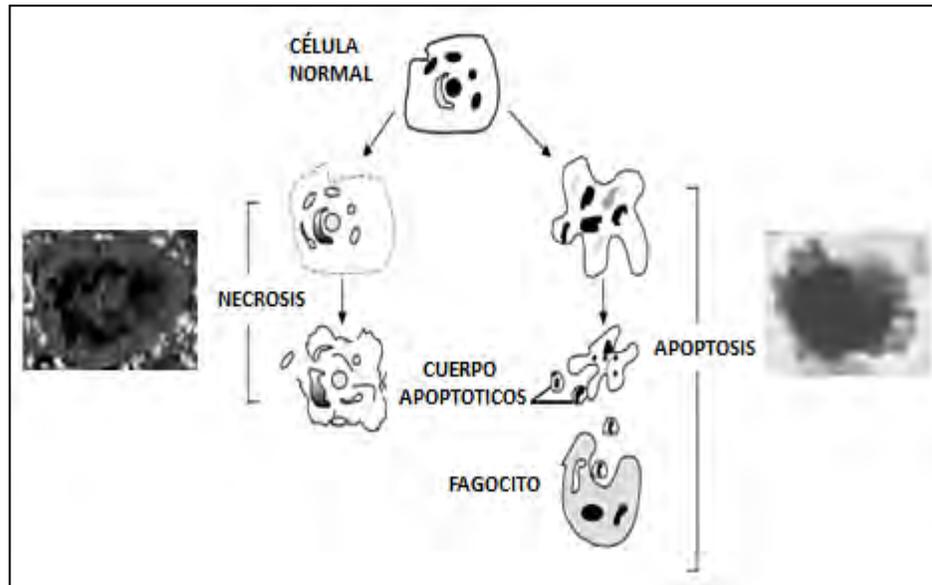


Figura 2. Esquema comparativo de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y necrosis, mostrando micrografías representativas de cada caso (Alonso, 2002 y modificado por Del Rio, 2013).

APOPTOSIS

La apoptosis como ya se había mencionado anteriormente, es un tipo de muerte celular fisiológica que mantiene el número adecuado de células en el organismo, eliminando a las células genéticamente dañadas, viejas, infectadas por virus y que tienen que ver con el desarrollo embrionario o morfogénesis (Mazumder et al., 2004). Este proceso se caracteriza por una serie de cambios en la arquitectura celular, que no solo contribuye a la muerte, si no también prepara su eliminación por medio de fagocitosis, evitando una respuesta inmunológica inadecuada (Taylor et al., 2007). La muerte celular es esencial para la prevención de la formación de tumores, y su desregulación se cree está involucrada en la patogénesis de muchas enfermedades humanas entre ellas el cáncer, ya que defectos en la expresión y la función de proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas (incluyendo a las caspasas) puede contribuir a la supervivencia del tumor (Mendez, 2007). Durante el proceso apoptótico se liberan señales bioquímicas que activan a un grupo de cisteínas proteasas conocidas como



caspasas, las cuales son las principales encargadas de los diversos cambios estructurales que ocurren en la célula (Guicciardi y Gore, 2009). La activación de las caspasas es un paso fundamental para el proceso apoptótico. Existen dos tipos de caspasa que participan en este proceso: Las caspasa iniciadoras o inductoras y las caspasa efectoras o de ejecución, que dan lugar a una proteólisis ordenada de las células con características morfológicas muy específicas, (Figura 2) (Kurosaka et al., 2003).

FASES DE LA APOPTOSIS

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: Iniciación, ejecución y eliminación, las cuales comienzan en el momento en que la célula recibe el estímulo apoptótico para dar lugar a diversos cambios morfológicos y bioquímicos, culminando en la eliminación de restos celulares (Kurosaka et al., 2003).

Fase de iniciación

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra y extracelulares, las primeras son en muchos casos originadas por el estrés biológico, el cual provoca la liberación del Citocromo c de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas citocinas), biológica (virus, bacterias, parásitos), química (fármacos) o físicas (radiaciones); pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferente e incluso opuestos.

Fase de ejecución

La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplasmáticos permanecen intactos excepto la mitocondria que reduce su potencial transmembranal, la cromatina se condensa

manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta, finalmente la célula genera un número variable de vesículas, rodeados de la membrana plasmática íntegra, que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se les conocen como cuerpos apoptóticos.

Fase de eliminación

Remoción de cuerpos apoptóticos por fagocitos, células dendríticas, epiteliales y fibroblastos (Luvia, 2003, Savill y Fadock, 2000) (Figura 3).

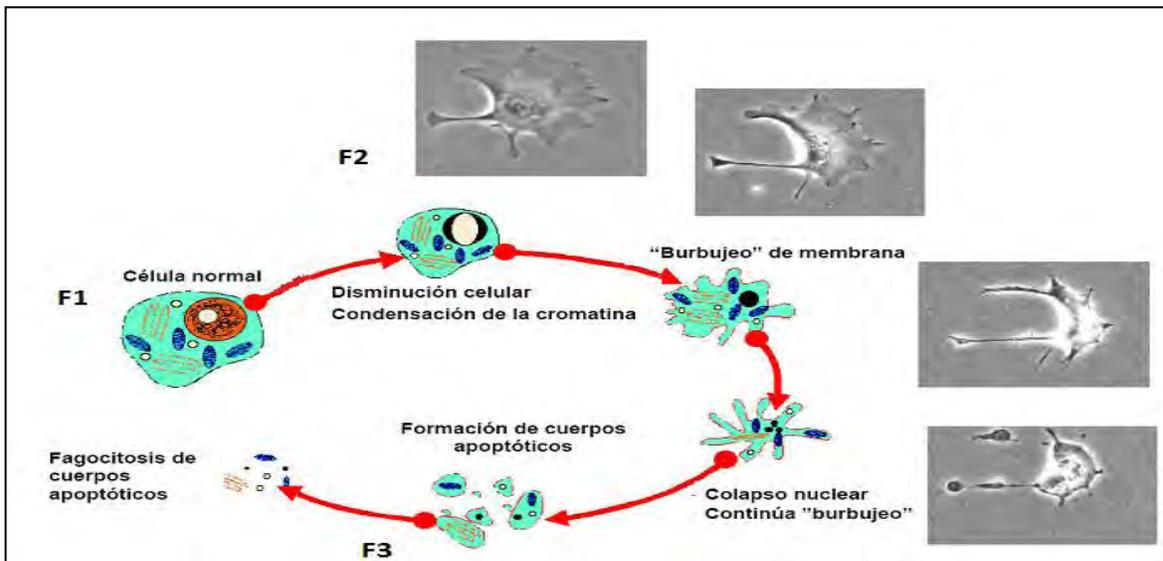


Figura 3. Fases de la apoptosis: Iniciación (F1) la célula recibe la señal de entrar en apoptosis, Ejecución (F2) diversos cambios morfológicos en la célula y eliminación (F3) remoción de los cuerpos apoptótico por fagocitosis (<http://dcashop.eu>, modificado por Del Rio, 2013).

Los cambios morfológicos que sufre la célula, son debidos en su mayoría a la activación de las diferentes caspasas.

CASPASAS: PROCESADORAS DE LA MUERTE CELULAR

Las caspasas pertenecen a la familia de cistein proteasas (Cistein Aspartato Specific Protease), que cortan las cadenas protéicas ubicadas después de residuos de ácido aspártico (Alnemri et al., 1996). Son proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución (Stennicke et al., 1998). Las cuales están presentes normalmente en las células sanas como zimógenos (precursores inactivos) con



poca o nula actividad y deben someterse a una proteólisis para su activación, la cual ocurre en el proceso apoptótico (Creagh et al., 2003).

Las caspasas activas fragmentan muchas proteínas celulares vitales como las de la familia de las Bcl-2 o actúan en varios substratos nucleares como laminina, además de que activan proteolíticamente enzimas tales como la DNasa DFF40/CAD que contribuyen a la destrucción celular (Janeway et al., 2000).

La familia génica de las caspasas contiene 14 miembros en mamíferos de los que se conocen 12 enzimas humanas (Figura 4). El análisis filogenético indica que esta familia de genes está compuesta por dos grandes subfamilias que están relacionadas con ICE (grupo inflamatorio) o con el homólogo de mamíferos de CED-3 (grupo apoptótico). Las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, en la estructura y especificidad de sustratos (Alnemri et al., 1996).

Las caspasas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG y una subunidad pequeña (p10) en el C-terminal. Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio mayor que las caspasas efectoras que contiene dominios como los de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) en el caso de caspasa 2 y caspasa 9, o efectores de muerte celular (DED) en el caso de caspasa 8 y 10, que le permite interactuar con otras moléculas que regulan su activación (Elinos et al., 2003).

Las caspasas son unas de las proteasas más específicas con un requerimiento inusual y absoluto de cortar después de un residuo de ácido aspártico (Asp). Para la maduración del zimógeno se requieren de un mínimo de dos cortes, uno que separe el pro-dominio de la subunidad grande y otro que separe la subunidad pequeña. La presencia de Asp en los motivos de corte para la maduración es consistente con la habilidad de las caspasas de auto activarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación (Rai et al., 2005, Pistritto et al., 2002).

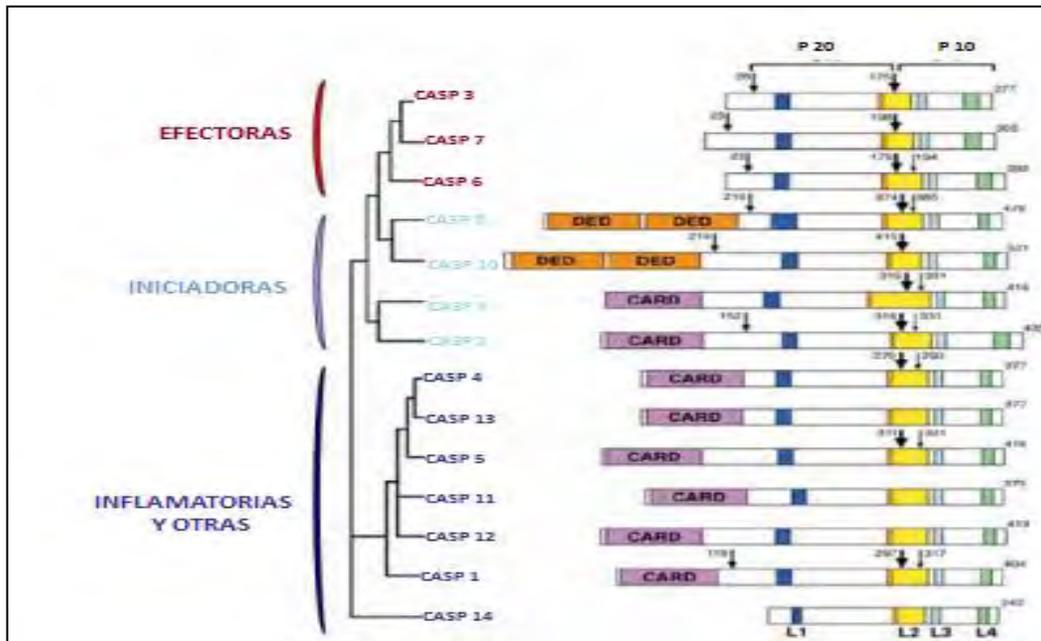


Figura 4. Familia génica de las caspasas contiene 14 miembros en mamíferos de las cuales la caspasa 9, 2,8 y 10 son iniciadoras con un dominio CARD o DED y las caspasa 3,7 y 6 son efectoras las cuales llevan a cabo los cambios morfológicos principales en la célula (Syi, 2002).

Las caspasas pueden participar en tres vías de señalización principalmente:

- I) Activadoras de citocina inflamatorias como es el caso de las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, y 14 (Martinon, 2007).
- II) Iniciadoras o precursoras de muerte celular: caspasa pro-apoptóticas 2, 8, 9, 10 y 12, que son generalmente consideradas como las responsables de iniciar la cascada de activación durante la apoptosis. Estas caspasas tienden a tener pro-dominios largos N- terminal, los cuales presentan motivos de interacción proteína-proteína que son los Dominios Efectores de Muerte (DED), el cual es el caso de caspasa 8 y 10 y los Dominios de Reclutamiento de Caspasas (CARD) en donde se encuentran las caspasas 1, 2, 9 y 12 (Elinos et al.,2003).
- III) Ejecutoras o efectoras: 3, 6 y 7 que se encargan de la destrucción efectiva de las células (Elmore, 2007). Las caspasas efectoras son responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas.

Cabe mencionar que la caspasa 8 puede activar a la proteína apoptótica Bid mediante proteólisis, la cual se transloca a la mitocondria para cooperar con BAX y BAK, produciendo poros en la membrana y la liberación automática de proteínas mitocondriales apoptóticas. Por lo cual, la proteína Bid puede ser el puente de unión de dos vías apoptóticas que se mencionarán a continuación.

ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

Las caspasas, como ya se había mencionado, son zimógenos que necesitan ser activados para llevar a cabo el proceso apoptótico, existen varios mecanismo de activación que pueden ser trans-activaciones, por corte proteolíticos de otras caspasas, o por auto activación (Caballero y Mora, 2002). Dicha activación requiere de un mínimo de dos cortes, uno que separe la subunidad grande y otro que separe la subunidad pequeña; la enzima se madura a un heterotetrámero compuesta por dos heterodímeros constituidos por dos sitios catalíticos (Thornberry y Lazebnik, 1998). La presencia de residuos de aspártico en el sitio DED (Dominio efector de muerte) y la separación de las subunidades se relaciona con la capacidad de las caspasa de ser activadas entre ellas, o auto activarse (Pistritto et al., 2002) (Figura 5).

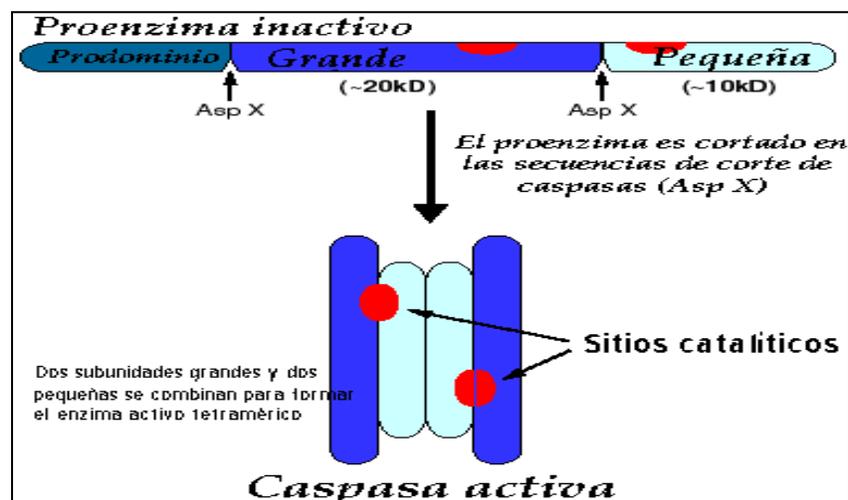


Figura 5. Estructura de las caspasas donde se muestran dos subunidades: una grande (p20), una pequeña (p10) y un prodominio, en donde se lleva a cabo el corte (Asp) y activación de caspasa (Boticario y Cáscales, 2009).



Existen diferentes mecanismos de activación entre las caspasa iniciadora y efectoras, por ejemplo se ha propuesto mecanismo de activación por medio de dimerización en caso de las iniciadoras y de escisión en caso de las efectoras (Riedl y Salvesen, 2007).

Activación por dimerización: Ocurre principalmente en las iniciadoras, las cuales se encuentran en monómeros inertes que requieren como dimerización para su activación (Boatright y Salvesen, 2003, Shi, 2004). Se requiere la participación de ciertas proteínas para la formación de complejos activadores; esto ocurre cuando los prodominios de las caspasas se unen específicamente, los cuales pueden ser los DEDs (Dominios Efectores de Muerte) de las caspasa 8 y 10 y los CARDs (Dominios de Reclutamiento de Caspasas) pertenecientes a las caspasa 1,2,9 y 12. Estos dominios les sirven para unirse a otras proteínas o plataformas de activación, que al reclutar moléculas de caspasas, las acercan permitiendo su activación; el reclutamiento exige un aumento local de la concentración de la caspasa y genera la actividad por la dimerización inducida por la proximidad (Riedl y Yigong, 2004).

Activación por escisión: se lleva a cabo en las efectoras por escisión proteolítica en un residuo de aspártico para separar las subunidades pequeñas y grandes mencionada anteriormente. (Shi, 2005).

FUNCIONES PRINCIPALES DE LAS CASPASAS EFECTORAS EN LA APOPTOSIS

Las caspasas efectoras 3, 6 y 7 tienen una función específica y definida, que dan como consecuencia la muerte celular: **Caspasa 3:** Es la encargada de activar a CAD/DFF40 una DNasa responsable de la fragmentación del ADN, al ser liberada de su inhibidor ICAD (Inhibidor de la Desoxiribonucleasa Activada por Caspasas), cabe mencionar que CAD nucleasa de 40 kDA fragmenta el material genético en 50 a 300 kilobases (Kb) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) y múltiplos de ellos; por corrimiento electroforético generan

lo que se conoce como patrón en escalera o escalera de la muerte. **Caspasa 7:** Desregula enzimas encargadas de la replicación y reparación del DNA como PARP (Poli ADP Ribosa), molécula implicada en la maquinaria celular para reparar el daño en el ADN (Benchoua et al., 2001, Roseto et., al 1999). **Caspasa 6:** Es la encargada de activar la vía que conduce a la condensación de la cromatina y participa en la destrucción de la lámina nuclear y proteínas del citoesqueleto: laminina, actina, gelsolina, vicentina etc. (Figura 6), (Taylor et al., 2007, Buendia et al., 1999).

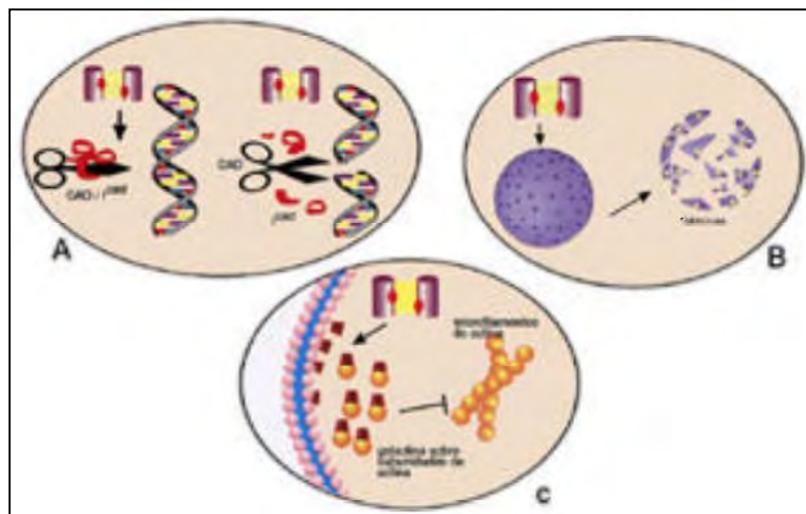


Figura 6: A) Caspasa 3 se encarga de liberar a CAD de su inhibidor ICAD para que fragmente el ADN, B) Caspasa 6 interviene en la destrucción de las proteínas de membrana y del citoesqueleto y C) Caspasa 7 desregula enzimas regeneradoras del ADN (Roseto y Brenner, 1999).

VÍAS APOPTÓTICAS

Existen dos vías principales para la activación de muerte celular:

Vía extrínseca o de los "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. En el proceso apoptótico, dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y TNF. Cuando la proteína transmembranal Fas se une a su ligando FasL, se lleva a cabo una trimerización del receptor lo que provoca el reclutamiento y unión de moléculas adaptadoras

como FADD (Proteína Relacionada con Fas con Dominio de Muerte), mediante sus dominios de muerte, después de este cambio conformacional se une a una forma inactiva de la caspasa 8, lo que ocasiona su activación, la cual inicia la cascada proteolítica (activando a las caspasas efectoras como la caspasa 3) que lleva a la muerte celular (Strasser et al., 2000). Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF que se une con su ligando TNFR y TRADD (formación del complejo DISC) lo que ocasiona la activación de la caspasa 8 y ésta a su vez activa a las caspasas efectoras. Recordemos que la caspasa 8 también puede activar a la proteína pro-apoptótica Bid (Figura 7), (Bhardwaj y Aggarwal, 2003, Curtin y Cotter, 2003).

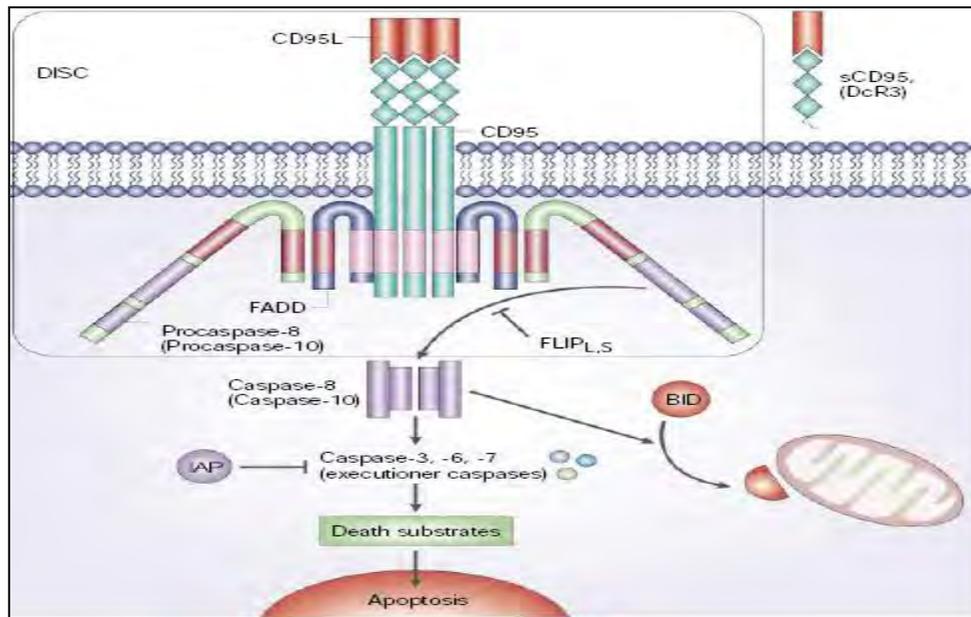


Figura 7. Vía Extrínseca, donde se muestra el receptor unido a su ligando Fas/FasL (CD 95/CD95L), para formar un complejo llamado DISC que activa a la caspasa 8 y esta a su vez a las caspasas efectoras (Frederik et al., 2002).

Vía Intrínseca o Mitocondrial, está ligada a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, Mitocondrial Outer Membrane Permeabilización), puesto que es un evento crucial en esta vía. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del

espacio intermembranal; entre ellas, el Citocromo c, el cual inicia la formación del apoptosoma y se considera un punto de no retorno del proceso apoptótico (Wang, 2001, Enari et al., 1998).

El Citocromo c, una vez en el citosol, se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 Activador de Proteasa Apoptótica) efectuando un cambio conformacional dependiente de ATP. Esta unión induce la oligomerización de Apaf-1, cuyo dominio CARD queda expuesto provocando el reclutamiento de la procaspasa 9, la cual es activada dentro del apoptosoma. Una vez que la caspasa 9 está activada, activa sucesivamente a las caspasas efectoras como la caspasa 3, lo que desencadena la última fase de la apoptosis (Shi, 2002) (Figura 8).

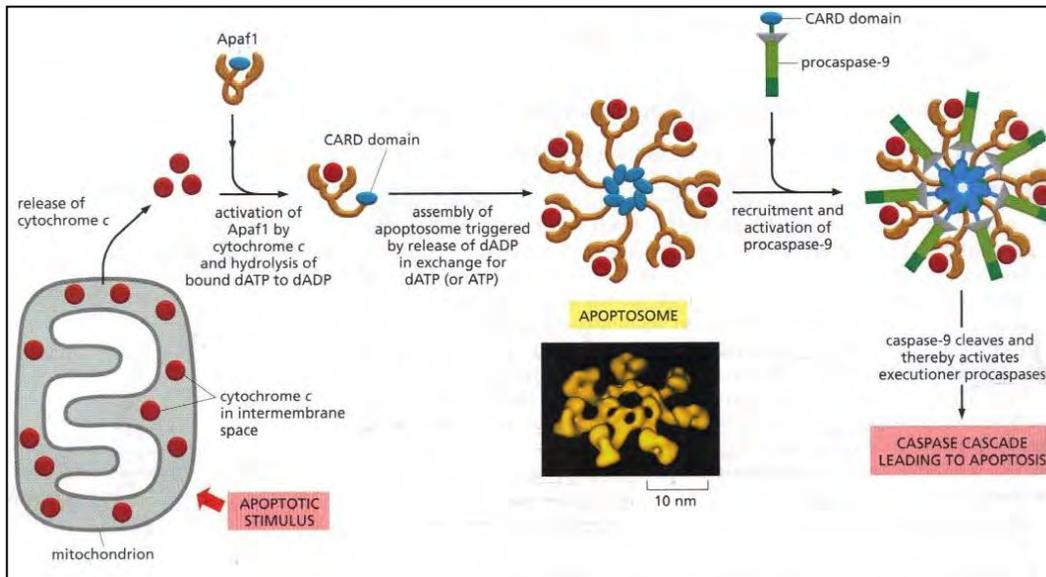


Figura 8. Formación del apoptosoma en la vía intrínseca: Al liberarse el Citocromo c de la mitocondria, se une con la proteína APAF 1 y mediante su domino CARD se une a la procaspasa 9 (formación del apoptosoma), la cual será activada y llevará a cabo la cascada proteolítica (Voet, 2006, <http://biolcell4350.wikispaces.com>).

Además del Citocromo c existen otras proteínas que son liberadas de la mitocondria: SMAC/DIABLO (Inhibidores de las IAPs: Inhibidoras de caspasas), HTRA/OMI (proteína de unión a XIAPs), AIF (Factor Inductor de Apoptosis) del espacio intermembranal mitocondrial, independientes de caspasa y endonucleasas G. Algunas de ellas son proteínas pro apoptóticas; por ejemplo la función de SMAC y OMI es unirse a los inhibidores de caspasas (IAPS), para que así se tenga

una vía en la que la caspasa efectora está libre de actuar (dado que sus inhibidores fueron neutralizados (Chunhai, 200, Pliego, 2006).

La vía mitocondrial, como ya se había mencionado, se puede conectar también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa 9 (Pliego, 2006). Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres subfamilias: la familia de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 etc); la familia de proteínas pro-apoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas pro-apoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad etc) (Willis y Adams, 2005). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del Citocromo c (Bras et al., 2003, Nijhawan et al., 2003) (Figura 9).

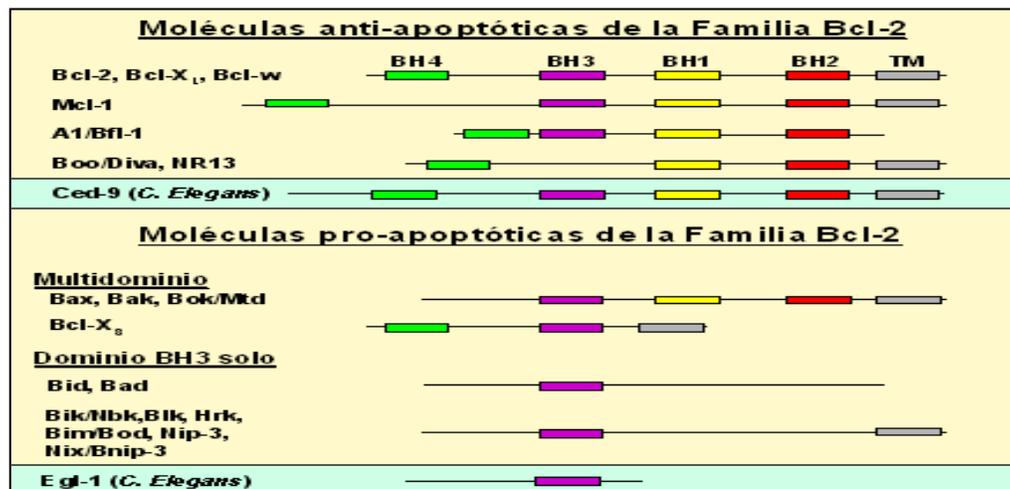


Figura 9. Moléculas de la familia Bcl-2: anti- apoptóticas y pro-apoptóticas, con sus diferentes dominios (multidominios y dominio único) (<http://intensivos.uninet.edu/24/2406.html>).

CADENA RESPIRATORIA

La función principal de las mitocondrias es la producción de ATP a través del acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la respiración aeróbica (sistema OXPHOS). En el año 1961 el bioquímico Peter Mitchell (Premio Nobel de Química en 1978) propuso por primera vez un mecanismo por el cual las células derivaban ATP a partir del metabolismo oxidativo. Este sistema proporciona a la mayoría de



tipos celulares alrededor del 90% de su requerimiento energético (Caro, 2010). En la mitocondria entran ácidos grasos que se oxidan en acetilcoenzima A (acetilCoA) durante el proceso denominado β -oxidación. El piruvato (producto final de la glucólisis en el citoplasma celular) también entra en la mitocondria y se descarboxila gracias a la piruvato descarboxilasa, la cual incorpora la molécula del coenzima A produciendo acetilCoA. La parte acetato de esta molécula se oxida en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs. Al final de este ciclo se generan dos moléculas de CO_2 y 4 pares de átomos de hidrógeno que se transfieren al dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD^+) y al dinucleótido de flavina y adenina (FAD), los cuales se reducen en NADH y FADH₂ respectivamente.

Estas dos moléculas presentan una capacidad donadora de electrones muy elevada, esta energía se va liberando a lo largo de una serie de reacciones redox en las crestas mitocondriales con la participación de complejos enzimáticos y coenzimas. Esta serie de reacciones constituye la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) o cadena de transporte de electrones (Zamzami et al., 1996).

La cadena respiratoria es un sistema complejo que debe responder a las necesidades energéticas de la célula. La CRM está formada por una serie de complejos multiproteicos localizados en las membranas de las crestas mitocondriales que atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y el espacio intermembranoso. Las coenzimas están disueltas en lípidos y difunden a lo largo de la membrana o a través de su superficie. El complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa o también llamado NADH deshidrogenasa) es el de mayor tamaño y está formado por al menos 42 polipéptidos (7 codificados por el ADN mitocondrial). Su función es catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II (Succinato Deshidrogenasa) se compone de 4 péptidos y cataliza la oxidación del succinato a fumarato (en el ciclo de Krebs) y transfiere también los electrones a la ubiquinona en la CRM (este complejo está codificado completamente por el ADN nuclear). El complejo III (Citocromo c oxidoreductasa), contiene aproximadamente 10 subunidades de las cuales solo una es codificada por el ADN mitocondrial. El cual se va encargar de transferir electrones al Citocromo c, localizado en el espacio intermembranoso en cual en condiciones normales los transportara al siguiente complejo. El complejo IV (Citocromo c oxidasa o también conocido como COX IV), compuesto de 13 subunidades de las cuales 3 son codificadas en el ADN

mitocondrial, transfiere 4 electrones desde el Citocromo c a una molécula de oxígeno, creándose una molécula de agua (Skulachev, 2004), (Figura 10).

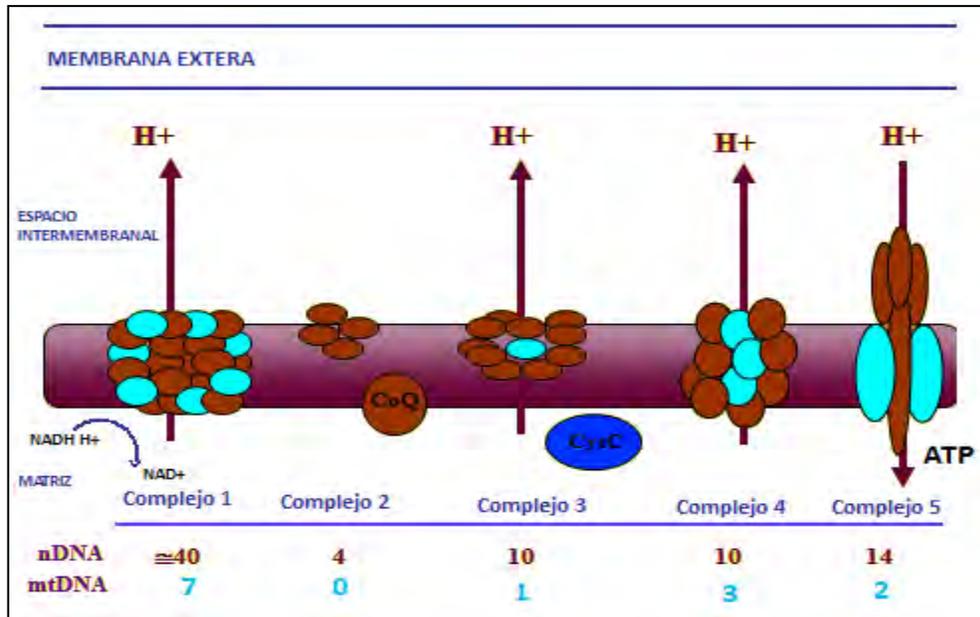


Figura 10: Cadena respiratoria y complejos mitocondriales en los cuales se lleva a cabo el transporte de electrones de complejo a complejo y la translocación de H^+ a la membrana externa de la mitocondria. La subunidades de los complejos son codificadas por el núcleo y mitocondria a excepción del complejo II y Citocromo c están codificados por el núcleo únicamente (<http://epidemiologiamolecular.com/la-mitocondria>, modificado por Del Rio 2013).

Esta transferencia de electrones entre los complejos de la cadena respiratoria se aprovecha de forma indirecta para sintetizar ATP. Al principio de la cadena las moléculas reducidas NADH y FADH₂ transfieren los electrones del hidrógeno al siguiente complejo enzimático y liberan los protones a la matriz mitocondrial mediante mecanismos desconocidos hasta el momento. La transferencia de electrones llevada a cabo entre los complejos I-IV es efectuada a través de subunidades portadoras de grupos prostéticos, por ejemplo grupos hierro-sulfuro en los complejos I, II y III, o grupos hemo-hierro en el Citocromo c y complejo IV. La energía liberada durante este proceso de transferencia se usa en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La acumulación de protones en este espacio frente a los electrones de la matriz, crea un potencial eléctrico que tiende a llevar a los electrones de nuevo a la matriz. La distribución asimétrica de iones como Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ a lo largo de la membrana interna contribuye a la creación de un gradiente químico (Lehninger et al., 2002).



La membrana interna presenta una impermeabilidad extrema a los protones y se hace necesaria la intervención del complejo V para que puedan ser transportados de nuevo al interior de la mitocondria. Esta entrada de protones genera energía que es usada para sintetizar adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi) (Souza, 2008). Dos requisitos son necesarios para que se produzca la fosforilación oxidativa: integridad de la membrana interna (de forma que los protones que vuelven a la matriz solamente lo puedan hacer mediante un proceso acoplado a la síntesis de ATP) y concentración elevada de protones en el espacio intermembranal (Zamzami et al., 2001).

COMPLEJOS MITOCODRIALES

El aislamiento de proteínas mitocondriales con propiedades específicas de transferencia de electrones, realizado por Green y sus colaboradores, proporcionó el concepto de “complejos” de la cadena respiratoria (Green y Vande, 1982). En los años 50s Chance y su equipo, usando técnicas espectrofotométricas, describieron los niveles de reducción-oxidación de los componentes de la cadena respiratoria en la transición que sigue la adición de ADP, e identificaron los sitios que son termodinámica y cinéticamente compatibles con la transducción energética (Chance y Williams, 1956). Los diferentes complejos tienen funciones y estructuras específicas.

Complejo I (NADH Deshidrogenasa)

Está constituido por 46 cadenas polipeptídicas de las cuales, 7 están codificadas por el ADN mitocondrial y el resto por el nuclear (Carroll et al., 2005). Los transportadores de electrones en este complejo son flavinas, centros hierro-sulfurados y ubiquinonas. En conjunto, este complejo es el componente más grande de la cadena respiratoria, con cerca de 800-900 KDa; tiene forma de L, con el brazo largo como una proteína de membrana integral hidrofóbica, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones, y el brazo corto constituido por un dominio globular hidrofílico situado en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina y 9 centros hierro-sulfurados (Sazanov, Hinchliffe,

2006). Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el dominio de membrana donde se encuentran las quinonas. Así, la flavina acepta dos electrones simultáneamente del NADH y los transfiere, uno a uno, a los centros hierrosulfurados (Figura 11). Estos, a su vez, reducen la quinona, embebida en la membrana, a quinol, en dos pasos sucesivos de un solo electrón (Sazanov y Hinchliffe, 2006). Esta transferencia electrónica está acoplada al bombeo de cerca de cuatro protones a través de la membrana, ayudando a proporcionar la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP (Yagi y Matsuno, 2003).

Este proceso supone cerca del 40% del gradiente de protones transmembrana generado en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria mitocondrial (Sazanov y Hinchliffe, 2006). Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de los diferentes transportadores del complejo (Herrero y Barja, 2000); de todos ellos cabe destacar la rotenona, que actúa bloqueando la transferencia de equivalentes de reducción desde los centros hierro-sulfurados hasta la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma.

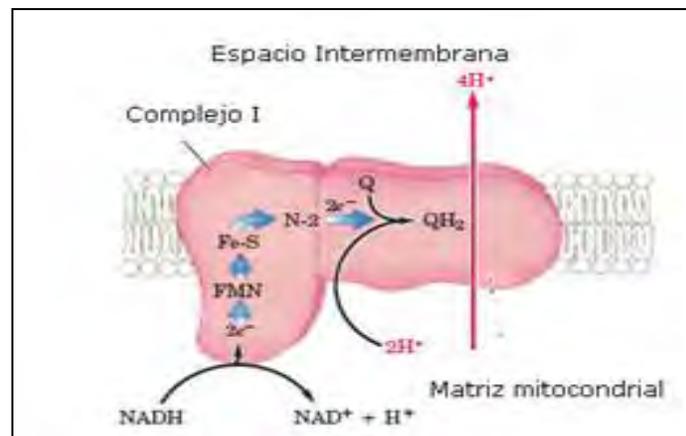


Figura 11. Estructura de COX I: NADH Deshidrogenasa (<http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/CI.htm>).

Complejo II (Succinato Deshidrogenasa)

Es el único complejo codificado íntegramente en el ADN nuclear. Dos de las cuatro subunidades proteicas que lo componen conforman la enzima succinato deshidrogenasa, componente clave en él, mientras que las otras dos se encargan del anclaje de dicha enzima a la membrana.

En su participación en el ciclo de Krebs interviene en la transferencia de electrones desde el succinato hasta el FAD, formando FADH₂, mientras que en su papel dentro de la cadena de transporte electrónico transfiere los electrones del FADH₂ a la ubiquinona (Cecchini et al., 2003). Carece de sitio de acoplamiento energético. A diferencia del NAD⁺ que difunde libre en la matriz mitocondrial, el FAD no existe libre en disolución; por ello el complejo II contiene una molécula de FAD. La tenoiltrifluoroacetona (TFA) bloquea la transferencia de electrones a través del complejo II, posiblemente mediante interacciones débiles con el hierro del último componente del complejo, un centro hierro-sulfurado (Tyler, 1992). También a través de los equivalentes de reducción entrantes vía complejo II, se produce un flujo reverso de electrones hacia el complejo I (Figura 12).

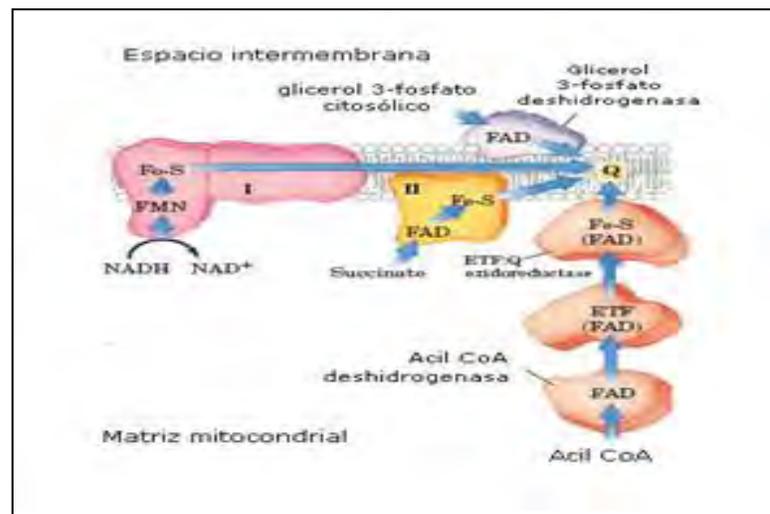


Figura 12. COX II: Succinato Deshidrogenasa
(<http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/CII.htm>).

Otros sustratos de las deshidrogenadas mitocondriales también pasan electrones a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona (CoQ), pero no a través del Complejo II. a) El primer paso en la beta-oxidación de los ácidos grasos (Acil CoA) por la flavo proteína Acil CoA deshidrogenasa es la transferencia de electrones desde el sustrato al FAD de la enzima. A continuación, los electrones son cedidos a la proteína transferidora de electrones (ETFP) quien a su vez pasa los electrones a la ETFP-Ubiquinona óxido reductasa. Esta reductasa es una proteína Fe-S que también tiene unido un nucleótido de flavina y pasa los electrones a la cadena respiratoria al reducir al CoQ. b) El glicerol que viene de la degradación de los

triglicéridos, se convierte por fosforilación en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por la glicerol 3- fosfato deshidrogenasa, enzima localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, que reduce a la CoQ (lanzadera del glicerol fosfato), (Caro, 2010).

Complejo III (Ubiquinol-citocromo c reductasa)

Se trata de una estructura dimérica donde cada monómero está constituido por diez subunidades proteicas diferentes insertadas en la membrana mitocondrial interna. Tres de estas subunidades, un centro hierro sulfurado (FS) y los citocromos c1 y b, contienen centros redox y participan en la transferencia de electrones (Figura 13). Todos los elementos del complejo III están codificados por el ADN nuclear excepto el Citocromo b, que lo está por el mitocondrial (Zara et al., 2009). Además, dentro del complejo III se ha propuesto un ciclo de transporte de electrones, denominado ciclo Q, donde coexisten distintas formas de la ubiquinona. Los detalles del proceso de transporte electrónico son complejos: el ubiquinol cede dos electrones, uno al centro Rieske que lo cede a su vez a un Citocromo c para actuar como transportador hacia el complejo IV, mientras que el otro es reciclado a través del ciclo Q vía Citocromos b566 y b560 y de semiquinonas (Trumpower, 1990). Este ciclo permite el bombeo de protones al citosol. El flujo de electrones en el complejo III puede ser bloqueado, entre otros, por los inhibidores antimicina A, ilicicolina H y funiculosina, que actúan en el sitio de reducción de la quinona (Rotsaert et al., 2008).

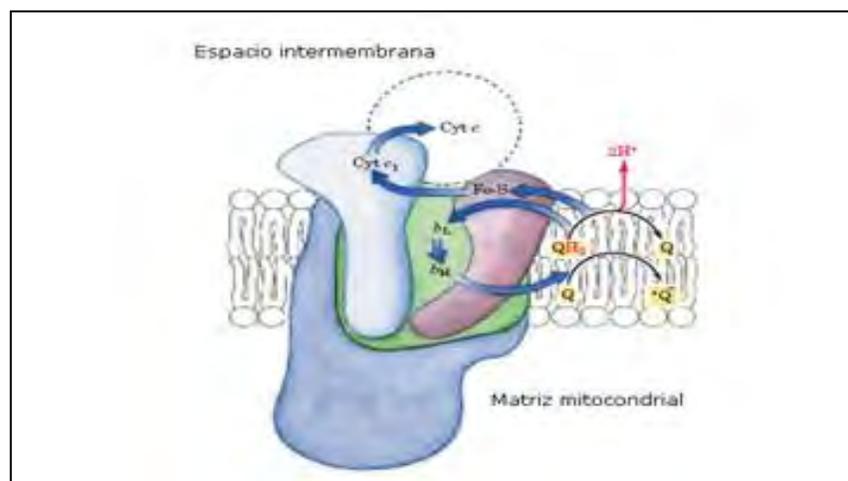


Figura 13. COX III: Ubiquinol Citocromo c Oxidoreductasa
(<http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/CIII.htm>).

Complejo IV (Citocromo c oxidasa)

En este último complejo de la cadena de transporte se produce la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua, aceptando los electrones del Citocromo c transfiriéndolos al oxígeno para realizar la siguiente reacción irreversible:



El complejo Citocromo oxidasa contiene hemo a, hemo a₃, CuA (que consiste en 2 átomos de Cu adyacentes) y CuB. El O₂ reacciona en un centro binuclear que consiste en hemo a₃ y CuB. Por cada dos electrones que pasan a través del complejo IV se transfieren 2 H⁺ hacia el espacio intermembranal. Este complejo está ampliamente distribuido en la naturaleza; se cree que es el responsable del consumo de más del 90% del oxígeno en los animales aerobios (Figura 14).

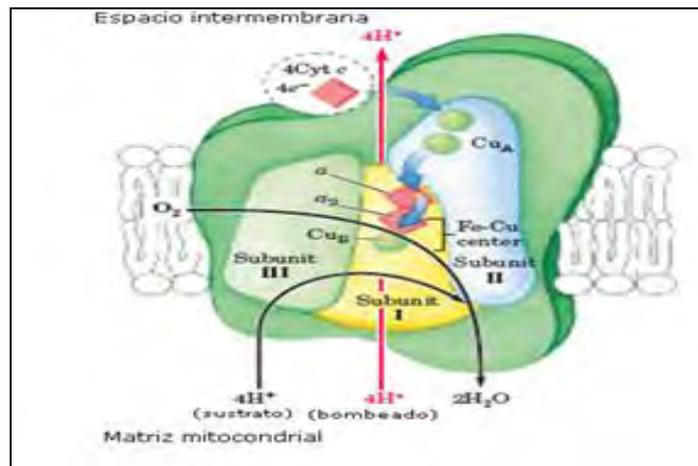


Figura 14. COX IV: Citocromo c Oxidasa
(<http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/CIV.htm>).

Presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que se piensa que está adaptado a condiciones de escasez del mismo. Las unidades catalíticas del complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear (Tyler, 1992). Los transportadores electrónicos y los complejos están organizados en “ensamblajes” con interacciones específicas proteína-proteína, que son efectivas para la transferencia rápida de electrones gracias a la limitación de las distancias intermoleculares entre ellas (Chance y Williams, 1956).

Estructuralmente está compuesto de 3 subunidades: Subunidad I, contiene dos grupos hemo, Citocromo a y Citocromo a₃, y un ion cobre, Cu_B. El hemo a₃ y el Cu_B forman un centro binuclear Fe–Cu, que acepta electrones del hemo a y los trasfiere al O₂ previamente unido al hemo a₃. Subunidad II, contiene dos iones cobre, Cu en un centro binuclear, Cu_A, y, acomplejados con los grupos –SH de dos Cys (similar a un centro sulfoferricos [2Fe–2S]). Este centro binuclear y el sitio de unión del Citocromo c se encuentran en un dominio de la Sub I que sobresale hacia el espacio intermembranal de la mitocondria. En el centro binuclear Cu_A, los dos iones comparten los electrones con igualdad, oxidados 1⁺,1⁺; reducido, 1.5⁺,1.5⁺. Subunidad III, aparentemente es esencial para la función del Cox IV, pero todavía no se entiende su papel (Caro, 2010, Barrientos et al., 2002).

El Citocromo c

Es una proteína que está presente en todos los organismos que contienen una cadena respiratoria mitocondrial, plantas, animales y microorganismos. Su función es transportar los electrones del complejo III al IV y es clave fundamental para la formación del apoptosoma en la muerte celular programada (Figura 15).

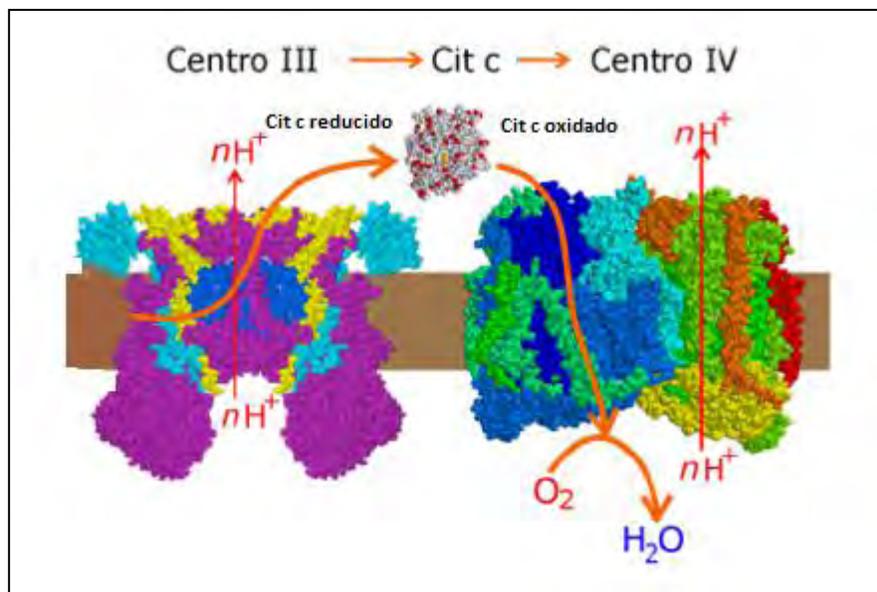


Figura 15. Citocromo c transporta electrones del COX III, al COX IV, aceptando electrones del COX III, el Citocromo c queda en su forma reducida y al donarlos al COX IV, se oxida (<http://bioquibi.webs.ull.es>, modificado por Del Rio 2013).



Este transportador evoluciono hace más de mil millones de años, la función de la proteína se ha mantenido vigente durante todo este tiempo. La secuencia de más de 80 especies eucariotas ha sido determinada por Emil Smith y Col (Stryer, 1985), el hallazgo más importante es que 26 de los 104 aminoácidos han permanecido inalterables durante más de 1500 millones de años, algunos ligados como metionina e histidina son invariantes, en algunas regiones la secuencia es casi invariable en todas las moléculas de Citocromo c, el arrollamiento compacto de la proteína requiere la presencia de glicina en sitios determinados, varios residuos invariantes de Lisina y Arginina están localizados en los centros cargados positivamente en la superficie de la molécula (Caro, 2010).Cada uno de los miembros de la cadena respiratoria en especial el Citocromo c, son esenciales para el proceso apoptótico; se ha reportado que ciertas mutaciones de los complejos dan como consecuencia daño en el genoma mitocondrial y por consiguiente un desequilibrio que bien puede llevar a la muerte celular.



ANTECEDENTES

El cáncer de cérvix es una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mexicanas, por lo cual en la actualidad se buscan alternativas para el tratamiento de este tipo de cáncer. Al respecto nuestro grupo de trabajo desarrolla diferentes líneas de investigación con el propósito de contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en los procesos de proliferación y muerte de las células de CaCu. Hasta el momento nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma del receptor para IL-2 (RIL-2) en cultivos celulares (Rocha, 2004), así como en cortes histológicos observando que existe una expresión diferencial de las tres subunidades, que conforman el receptor, dependiendo del estadio del tumor (Rangel 1998). Por otro lado, experimentos realizados con las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, establecidas en nuestro laboratorio, confirman que 100 UI/mL de IL-2 tienen un efecto inhibitorio de su proliferación *in vitro*, la cual se repite en modelos *in vivo* teniendo como resultado la reducción en un 80% de masas tumorales (Bañuelos, 2000 y Rangel, 2010). Sin embargo, poco se sabe de los procesos moleculares, relacionados con la muerte vía apoptótica, que están siendo regulados por IL-2, por esta razón, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la participación de IL-2 en la regulación de la expresión del RNA mensajero de genes de la cadena respiratoria: COX I, COX II, COX III, COX IV así como Citocromo c y su efecto apoptótico en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.



HIPOTESIS

Se ha confirmado que 100 UI/mL de IL-2 inhibe la proliferación de células de carcinoma de cérvix y que dicha inhibición conduce a apoptosis. Asimismo, sabemos que en este proceso participan moléculas como Citocromo c y los complejos de la cadena respiratoria, cuya función se sabe, es clave para dicho proceso. Por lo cual, sí cultivamos las líneas celulares de carcinoma de cérvix, CALO e INBL en presencia de 100UI/mL de IL-2 observaremos una regulación de la transcripción del mensajero para Citocromo c y los complejos de la cadena respiratoria COX I, COX II, COX III y COX IV.



OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la IL-2 sobre la regulación de la expresión de genes de la cadena respiratoria y su efecto apoptótico en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Extraer, purificar y retrotranscribir el RNAm de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.
2. Analizar la expresión del producto de amplificación de los genes: COX I, COX II, COX III, COX IV y Citocromo c en las células de CaCU: CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.
3. Determinar la fragmentación del DNA genómico, inducidos por IL-2 en células de CaCU: CALO e INBL.
4. Evaluar la muerte celular por apoptosis en células de CaCU: CALO e INBL, cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2.
5. Evaluar la presencia de la proteína Citocromo c en las células de CaCU: CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.



MATERIALES Y METODOS

Líneas Celulares de CaCU

Líneas celulares de carcinoma de cérvix (CaCU): CALO e INBL, provenientes de tumores en estadios II-B y IV-B respectivamente y ambas positivas a HPV 18, fueron obtenidas de la reserva crio preservada en el Laboratorio de Oncología de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Interleucina 2 (IL-2)

La Interleucina 2 recombinante humana, fue adquirida de R&D Systems. Es una proteína bioactiva destinada para su uso en aplicaciones de cultivo celular que provoca la proliferación de células T y es un regulador central de la respuesta inmune.

Cultivo y proliferación de las líneas celulares

Las líneas celulares CALO e INBL se cultivaron en cajas de 25cm² con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en una incubadora con pH de 7- 7.2 a una atmósfera de 5% de CO₂ y temperatura de 37°C.

Se incubaron y proliferaron hasta obtener la cantidad adecuada para los diferentes ensayos en presencia y ausencia de IL-2 y a diferentes tiempos de exposición a la citocina. Para excluir células muertas, se realizaron ensayos de viabilidad con azul tripano antes de proceder a los diferentes experimentos, utilizando solo aquellas que mostraban células viables

Extracción de RNAm

La técnica de extracción se realiza para obtener RNAm puro para convertirlo en DNA complementario. La extracción se llevó cabo por medio de Trizol, una solución monofásica que incorpora una mezcla estable de fenol, tiocianato de guanidina, colorante y estabilizante que facilitan el aislamiento del RNA. Durante



la homogenización el trizol mantiene la integridad del RNA de la muestra mientras que solubiliza componentes de la célula. La adición de cloroformo es para separar la mezcla en dos fases, acuosa y orgánica. El RNA se encuentra en la fase acuosa y es recuperado por la precipitación con isopropanol.

Se cultivaron 1×10^6 de células de las diferentes líneas celulares en presencia de 100 UL/mL de IL-2 a diferentes tiempos: 30min, 2hrs, 24hrs y 48hrs. Transcurrido el tiempo de exposición a la citocina se les realizó un lavado agregando 1ml de PBS, se centrifugó para obtener el botón celular y se le realizaron dos lavados más decantando por último el PBS. Se le agregó al botón celular 1ml de Trizol, dejándolo actuar por 15 minutos para que se lleve a cabo la reacción (lisado), transcurrido el tiempo se agregaron 200 μ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 12000 rpm/ 15 minutos a una temperatura de 4–8 °C. Se obtuvo la fase acuosa y se adicionó 500 μ L de isopropanol frío y se dejaron incubando 24hrs en –70 °C, para que se lleve a cabo la precipitación del RNA, transcurrido el tiempo se centrifugó nuevamente y se decantó. Se agregó 1mL etanol al 70% para su purificación mezclando vigorosamente y se centrifugó a 7000 rpm/ 10minutos, se desechó cuidadosamente con ayuda de una micropipeta para evitar pérdida del RNA. El último paso es el secado de la muestra de RNA a temperatura ambiente durante dos horas aproximadamente. Ya libre de alcohol se re suspendió en 20 μ L de agua dietilpirocarbonatada (DEPC) para hidratarlo y así obtener nuestro primer stock. Se determinaron las concentraciones de cada una de las muestras realizando una segunda dilución [2:200] con agua DEPC (segundo stock), procediendo a su cuantificación en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260nm y así realizar los cálculos correspondientes para lograr una concentración en μ g/ μ L, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{RNA} = (\text{Abs } 260\text{nm}) (40\mu\text{g}) (\text{Volumen de la dilución}) / 1000 = \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

La cantidad adecuada de RNA para la retrotranscripción que es de 2 μ g/ μ L para cada una de las muestras.



RT-PCR

Para evaluar la expresión del RNAm obtenido de nuestras líneas celulares, se realizó la técnica de RT-PCR, mediante condiciones específicas de los diferentes kits, para la retrotranscripción (MMLV-RT) y PCR (Polimerasa). Así como los primers específicos para la amplificación de nuestros genes y la búsqueda de condiciones óptimas para los mismos.

Los diferentes primers se elaboraron utilizando el programa Primer3 (v. 0.4.0) (Tabla 2).

Nombre de Primers	Secuencia	Tamaño del amplificado (Pb)
β-actina	GGG TCAGAAGGATTC CTA TG GGT CTCAAA CAT GAT CTG GG	234
COX I	GTGGTTCCAAGATGGTTGCT CACATGGGGATGGGAATTAG	191
COX II	GGG CCT TGG ACA AGT TGT TA CAT GACAAA GCA GAG GCA AA	226
COX III	CCAGCTACCATGTCCCAGAT TATGCCAGCTTCCGACTCTT	185
COX IV	GTCAC TTGGGTTTGGCCTTA GCAAAGCATTAGGCAAGAGG	242
CITOCROMO C	TTGGCAATCCGTCATCAGTA CCCGACAGTGCCTAGAAGAG	183

Tabla 2. Primers utilizados para amplificación del RNAm de la Cadena Respiratoria.

Retrotranscripción RT

La RT, es una técnica en la cual se utiliza la enzima transcriptasa reversa, presente en retro virus, para sintetizar una hebra de DNA complementario (DNAc) de cada molécula de ARNm. Esta enzima es capaz de polimerizar trifosfato de desoxinucléotido para formar una hebra de DNAc usando una molécula de ARN como molde. La labor de esta enzima es agregar nucleótidos al extremo 3' de un iniciador (primer) apareado por sus bases a la plantilla. Esta función la cumple un oligo-dt libre agregado al hibridar la cola poli(A) 3' de cada plantilla de mRNA (Panduro, 2000).

De acuerdo a la concentración de RNAm obtenido se determinó el volumen de la solución necesaria para tomar 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNAm requerido en la técnica. Se



procedió a la retrotranscripción de cada una de las muestras bajo condiciones determinadas (Tabla 3), se incubó en el termociclador durante 1 hora a 42°C, obteniendo así el DNA complementario.

Reactivo	μL/ RX
Amortiguador 5X	5
dNTP's 10 mM (Mix)	1.5
Enzima MMLV-RT (Promega)	1.0
Oligo DT	1.8
Muestra de RNAm	2μg/μL
H ₂ O libre de RNAsas	Ajustar Volumen total

Tabla 3. Condiciones de una reacción de RT Para un volumen de 24 μL por RX (reacción).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica con la cual es posible amplificar una secuencia pequeña y específica de un gen utilizando la enzima Taq Polimerasa. Se compone de tres fases: Desnaturalización, hibridación y elongación. Los productos de la retrotranscripción fueron utilizados para la amplificación del cDNA con los primers específicos. La amplificación por medio de la PCR se llevó a cabo bajo condiciones determinadas (Tabla 4).

Reactivo	μL/ RX
Amortiguador 5X Green	6
dNTP's 10 mM (Mix)	0.8
Primers	
5' - 3' sentido	1.0
3' - 5' antisentido	1.0
Go Taq polimerasa 5 unidades/μL	0.15
Muestra de DNAc	4
H ₂ O libre de RNAsas	7.05

Tabla 4. Condiciones de una reacción de PCR para un volumen de 20 μL por RX (reacción1).



Las reacciones se colocaron en un termociclador y se programo para efectuar los siguientes ciclos de amplificación:

94°C Desnaturalización: 6 minutos

56°C Hibridación: 2 minutos

72°C Extensión: 2 minutos

94°C Desnaturalización: 45 segundos

Se repiten **30** veces del paso 2 al 4

56°C Hibridación: 2 minutos

72°C Elongación: 7 minutos

Finalmente se prepararon geles de agarosa al 1.5 % en TBE 1X añadiendo 30 μ L de bromuro de etidio. Ya polimerizado se colocó en el primer pozo del gel el control de pesos moleculares (escalera PB), posteriormente se colocaron 4 μ L de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis, cubierto de TBE 0.5 % a 80–90 volts durante 60 minutos; transcurrido el tiempo se colocó el gel en un transiluminador que con ayuda de la luz ultra violeta ayuda a observar los productos.

Electroforesis de DNA genómico (Escalera de la muerte)

La electroforesis de DNA, o Escalera de la muerte, es una técnica en la cual podemos comprobar la fragmentación de la cromatina que nos permite visualizar el patrón de la escalera típico del proceso apoptótico (Escalera de la muerte) dado por fragmentos de 180 a 200 pb y múltiplos.



Se cultivaron 2×10^6 células de las diferentes líneas CALO e INBL con 10 y 100 UI/mL de IL-2 a diferentes tiempos; 1, 4, 7 y 9 días, pasando el tiempo de incubación se obtuvo el botón celular y se le hicieron lavados con PBS, posteriormente se agregaron 500 μ l de DNazol resuspendiendo lentamente y se le dio un tiempo de reposo de 10 a 15 minutos en hielo. Al término del cual se agregó 1 ml de etanol absoluto y se agitó por inversión 6 veces y se centrifugó a 12 000 rpm por 4 minutos. Se le realizaron 2 lavados con etanol al 75%, y se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm / 12 minutos. Finalmente se retiró el etanol con ayuda de una micropipeta para no perder el botón. Se dejó secar de 1 a 3 minutos aproximadamente a temperatura ambiente y se agregó de 20 a 40 μ l de agua libre de RNAsas dependiendo el tamaño del botón para obtener el stock de cada muestra.

Se realizó la electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 1.5% y se corrió el gel en una cámara de electroforesis cubierto de TBE 0.5 % a 80–90 volts durante 60 min. Finalmente se observó el ADN extraído en un trans-iluminador.

Determinación de muerte celular por Anexina V

Para la determinación de muerte celular por apoptosis y su diferenciación de la muerte celular por necrosis se detectaron tanto la presencia extra membranal de fosfatidilserina (PS), que es una característica de las células apoptóticas al exponer extracelularmente proteínas que solo se encuentran intracelularmente, (Rodríguez, 2004), por medio de Anexina V que es una proteína que le es afín, la cual se encuentra conjugada con un marcaje verde fluorescente (Fluorescein isothiocyanate: FITC), así como con yoduro de propidio (IP) que fluoresce en rojo que identifica a las células necróticas que han perdido su integridad membranal al dejar pasar el yoduro de propidio y unirse al DNA (Koopman et al., 2013), identificando así a las células no viables. Ambas fluorescencias son evaluadas por citometría de flujo.

Se verificó el funcionamiento del equipo y se realizó la calibración correspondiente con el uso de los controles que permiten una calibración más rápida del equipo y la discriminación de las diferentes fluorescencias, posteriormente, se realizó la lectura de 10,000 eventos de cada una de las muestras utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur (Tabla 6).



Control 1: Células sin marca	Células sin tratamiento en amortiguado hepes (morfología y autoflorescencia)
Control 2: + Apoptosis	Células tratadas con camptotecina para inducir a apoptosis y marcadas con Fitc
Control 3 + Necrosis	Células tratadas con etanol al 70% (15min) y IP (necrosis)
Control 4: Células positivas a las dos marcas	Células tratadas con camptotecina y permeabilizadas con etanol

Tabla 6. Controles para calibrar el citómetro.

Se cultivaron 5×10^5 células por ensayo con diferentes tiempos de exposición con y sin IL-2: 1, 2, 3, 4 días. Se obtuvo el botón, tanto de las células en suspensión como las que están pegadas y se le realizó de uno a dos lavados con PBS. Posteriormente se agregó al botón celular 200µl de Anexina-FITC (1:200) diluida en amortiguado HEPES (HEPES: 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 5mM a pH7.4), se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Realizándose nuevamente un lavado con PBS para quitar el exceso de anticuerpo, se centrifuga y decanta. Posteriormente se agregó 2µl de IP (50µg/µL) y se incubó durante 15min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se procedió a la lectura del citómetro de flujo.

Microscopía confocal

La microscopía láser confocal es una nueva técnica de observación microscópica que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia. Su éxito se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc.) y, sobre todo, a la posibilidad de obtener "secciones ópticas" de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional.

Se colocaron ensayos de 20 000 células en cubre objetos con 200 µl de medio RPMI con 10% de SFB en cajas petri. Se dejó con el estímulo (IL-2) durante 24hrs. Se retiró el medio sin tocar el cubreobjetos, realizando 2 lavados con PBS y decantándolo; se fijaron las células con formaldehído al 1% durante 10 minutos y nuevamente se realizaron 2 lavados con PBS. Se permeabilizaron las células con



0.2 % de tritón X-100 durante 5 minutos en hielo y se lavaron en dos ocasiones con PBS. Posteriormente se bloquearon las células con 5% de SFB en PBS durante 30 minutos. Se hicieron dos lavado con PBS. Se dejaron incubando durante 1 hora con anticuerpo primario contra Citocromo c (1:75) en hielo, y se lavaron 3 veces las placas con PBS y se dejaron incubando 30 minutos con anticuerpo secundario acoplado a Rojo Texas (1:150) y se lavaron con PBS. Finalmente se montaron las muestras en PBS- glicina, para su observación en el en microscopio de fluorescencia. Los anticuerpos se preparan en PBS con 3% de BSA o en 5% de SFB.

Para realizar el montaje se preparó una solución de PBS con 1% de glicina más el mismo volumen de glicerol. Se agregó a los portaobjetos previamente marcados 20 μ l de la solución y se colocó el cubreobjetos que contenían las células de manera que estas quedaran en medio de la solución; finalmente se sellaron con barniz transparente.



RESULTADOS

Expresión del RNAm

Una de las técnicas más utilizadas para evaluar la regulación de la expresión génica es la RT-PCR, la cual nos permite amplificar DNA complementario (cDNA) obtenido por retrotranscripción utilizando como molde RNAm. Por lo cual, es la técnica utilizada en este trabajo para evaluar la expresión del mensajero para Citocromo c y componentes de la cadena respiratoria.

Se sabe que el Citocromo c es un miembro importante de la cadena respiratoria, ya que es un transportador de electrones el cual recibe electrones del complejo III (Citocromo c en estado reducido) y los pierde al transportarlos al complejo IV (Citocromo c en estado oxidado). También, es conocida la participación del Citocromo c en el proceso apoptótico cuando es liberado al citosol desde la mitocondria. Y dado que contamos con evidencia que indica que 100 UI/ml de IL-2 inhibe la proliferación de células de CaCU, y que esta inhibición causa la muerte celular, en este trabajo se evaluó la expresión del mensajero para Citocromo c en células de carcinoma de cérvix INBL y CALO, cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 a 30min, 2, 24 y 48hrs.

Los resultados para la línea celular INBL, muestran el producto de 183 pb correspondiente a Citocromo c, cuyo amplificado mostro un aumento en las células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2, en comparación a las células ausentes de la citocina, sin cambios con respecto al tiempo de cultivo (Figura 1).

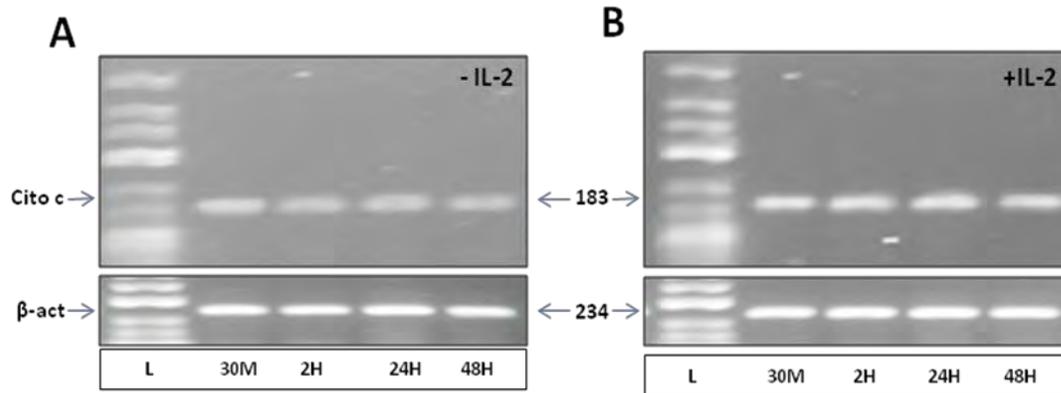


Figura 1. Productos de amplificación para Citocromo c (183 pb) en la línea celular INBL cultivada a diferentes tiempos: A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 que muestran amplificado en todos los tiempos y B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2 donde se observa un aumento en la expresión del mensajero. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador de pares de bases).

Para las células de la línea CALO, también observamos un aumento en la transcripción de Citocromo c en células cultivadas en presencia de IL-2 en comparación a las células ausentes de la citocina (Figura 2).

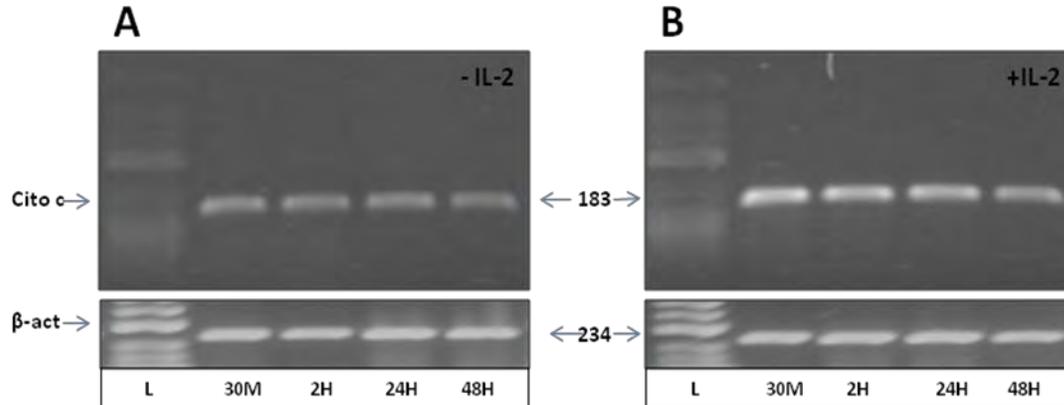


Figura 2. Productos de amplificación para Citocromo c (183 Pb) en la línea celular CALO cultivada a diferentes tiempos: A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 que muestran amplificado en todos los tiempos y B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL de IL-2 donde se observa un aumento en la expresión del mensajero. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases)



El Citocromo c es un elemento indispensable para la formación del apoptosoma y es un componente clave de la cadena respiratoria, la cual está constituida por una serie de complejos moleculares llamados, COX I, II, III y IV. Cada uno de estos complejos está constituido de diversas subunidades que realizan funciones específicas en cada complejo molecular. En COX I el más relevante es un centro de hierro sulfurado (FeS) encargado del transporte de electrones a la ubiquinona. En COX II destaca una proteína transmembranal de la cara interna de la mitocondria encargada de la reducción del succinato. En COX III la subunidad proteica denominada Citocromo c1 (Cyt-c1) transporta electrones al Citocromo c reduciéndolo. Finalmente en COX IV la subunidad I es la encargada de transferir electrones al oxígeno, paso importante para la formación de agua, además es esencial en la biogénesis del complejo IV. Dado la importancia de cada complejo en la cadena respiratoria, cualquier alteración o mutación desencadenaría la muerte apoptótica. Razón por la cual en este trabajo se diseñaron primers específicos para cada uno de ellos y se evaluó el papel de 100UI/ml de IL-2 sobre la regulación de la expresión del mensajero para estos complejos en células de las líneas CALO e INBL.

Expresión de COX I

COX I es el primer componente de la cadena respiratoria, recibe los electrones obtenidos del ciclo de Krebs para transportarlos al siguiente complejo. En este ensayo para COX I se analizó la expresión del mensajero para centro de hierro sulfurado (COX I-FeS).

Los resultados muestran el producto del amplificado para COX I de 191pb, en la línea celular INBL en presencia y ausencia de IL-2 a los 30 min y a las 2, 24 y 48 hrs, observando que no existe un aumento significativo en la expresión de este mensajero en comparación a las células en ausencia de la citocina (Figura 3).

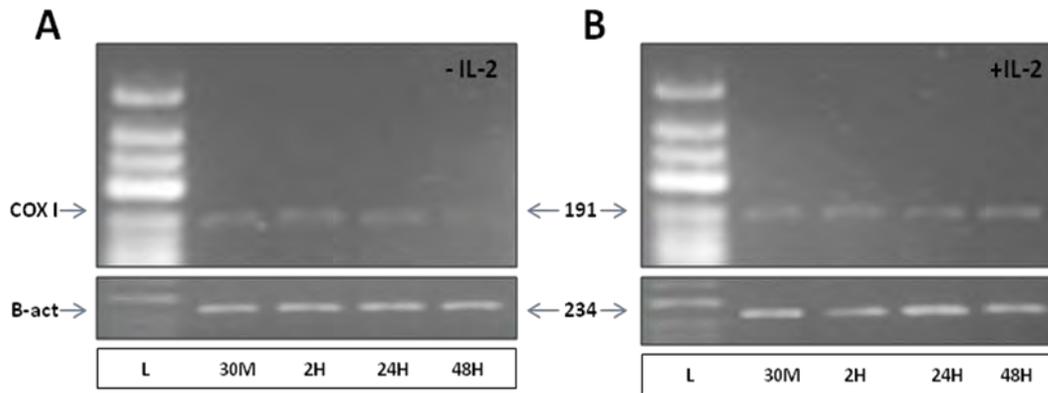


Figura 3. Productos de amplificación para COX I-FeS (191 pb), en la línea celular INBL cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2. No se observa cambio en la expresión del mensajero. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

De igual manera en la línea celular CALO cultivada en presencia de IL-2, no se observó cambio significativo en la expresión de COX I en comparación a las células cultivadas en ausencia de la citocina y sin cambios con respecto al tiempo (Figura 4).

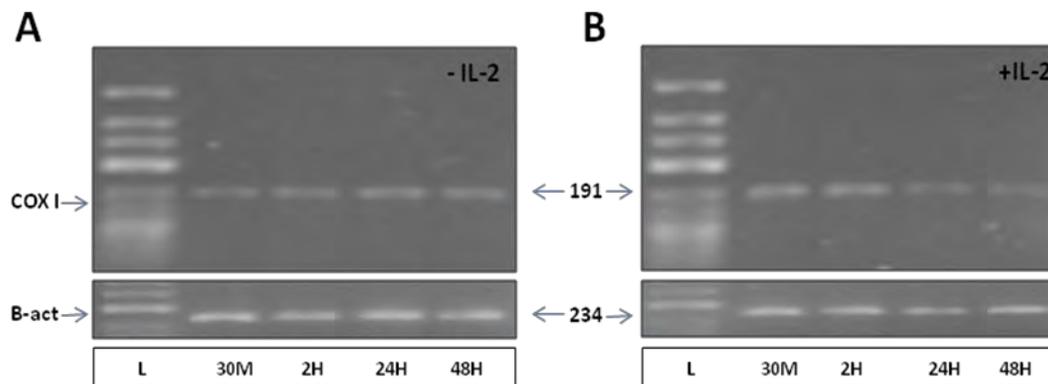


Figura 4. Productos de amplificación para COX I-FeS (191 pb), en la línea celular CALO cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de base).

+}

Expresión de COX II

Por su parte COX II al igual que Citocromo c está codificado únicamente por DNA nuclear y es el encargado de transportar electrones al COX III de la cadena respiratoria por medio de una serie de centros FeS y la Ubiquinona. Los productos de amplificación para COX II obtenidos en las células de la línea INBL cultivadas a diferentes tiempos en presencia y ausencia de 100 UI/ml de IL-2 muestran una banda de 226 pb sin diferencia con la obtenida de células cultivadas en ausencia de IL-2 y sin cambios con respecto al tiempo (Figura 5).

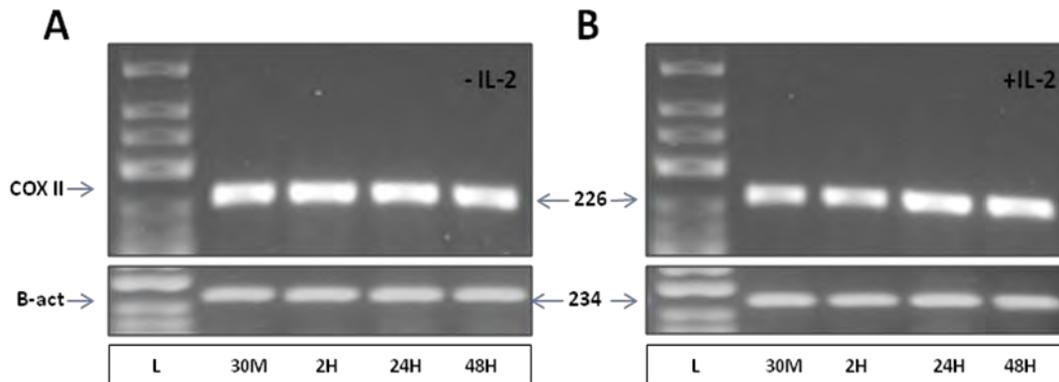


Figura 5. Productos de amplificación para COX II (226 pb), en la línea celular INBL cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2 la cual, no muestras cambio en la expresión del mensajero. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y E: Marcador pares de bases).

Al igual que INBL, la línea celular CALO no muestra cambio en la expresión del producto de amplificación para COX II en presencia de IL-2 y sin cambios con respecto al tiempo de exposición a la citocina (Figura 6).

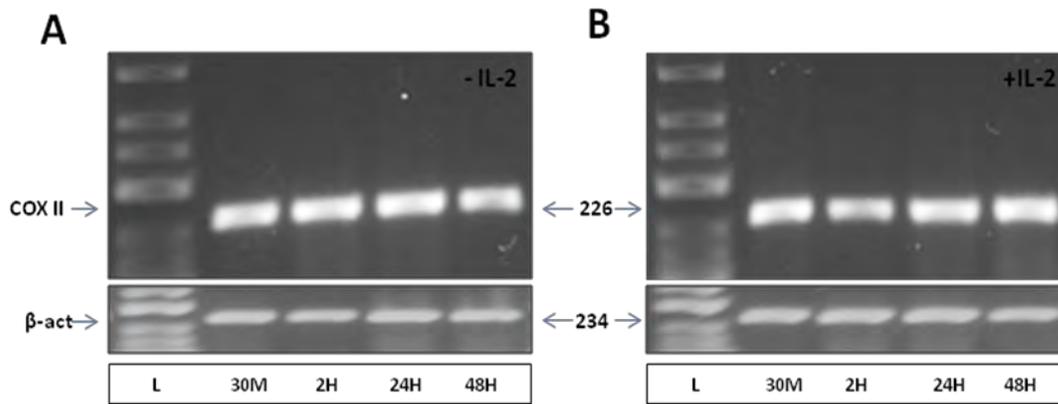


Figura 6. Productos de amplificación para COX II (226 pb), en la línea celular CALO cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2. Recuadro inferior producto para β-Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

Expresión de COX III

Otro complejo especialmente importante en la cadena respiratoria es COX III, quien reduce a Citocromo c por la transferencia de electrones mediada por la subunidad Cyt-c1. En las mismas condiciones que con COX I y COX II no se observa cambio en la expresión del mensajero para COX III (Cyt - c1) en células de la línea INBL con un amplificado de 185 pb en presencia y ausencia de IL-2 en función del tiempo de cultivo (Figura 7).

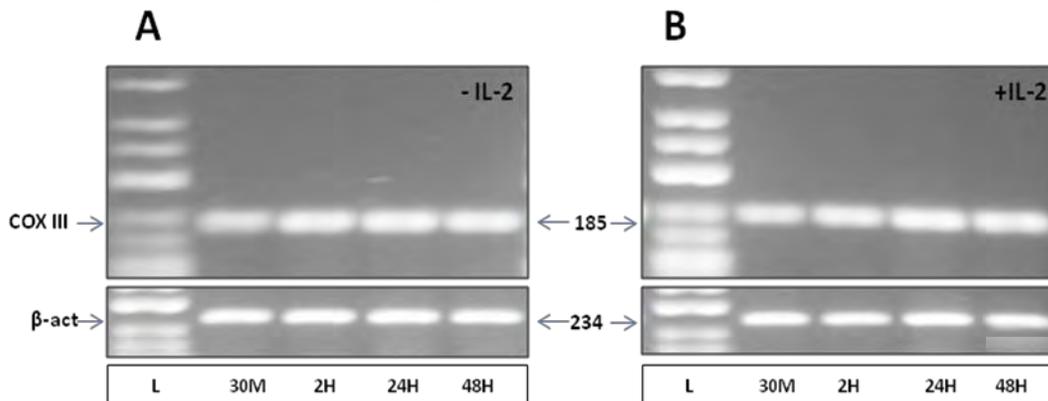


Figura 7. Productos de amplificación para COX III-Cyt-c1(185 pb), en la línea celular INBL, cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2, sin cambio significativo en la expresión. Recuadro inferior producto para β-Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

La línea celular CALO tampoco mostró cambios significativos en la expresión del mensajero para COX III en las mismas condiciones de cultivo (Figura 8).

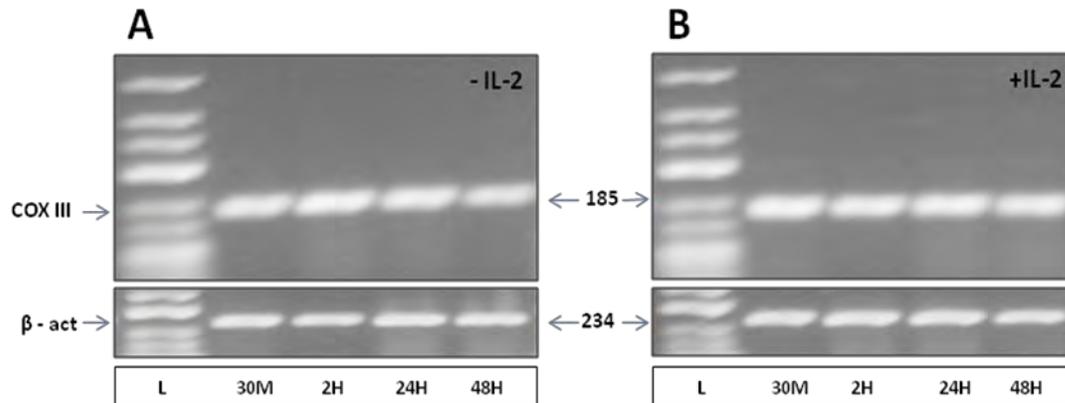


Figura 8. Productos de amplificación para COX III-Cyt-c1 (185 pb), en la línea celular CALO, cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2, sin cambio significativo en la expresión. Recuadro inferior producto para β-Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

Expresión de COX IV

Se sabe que el COX IV es considerado uno de los principales sitios de regulación de la fosforilación oxidativa, puesto que cataliza el paso final de la cadena respiratoria al transportar los electrones donados del Citocromo c (oxidado) a la ATP sintasa para la formación de ATP. Debido a que es importante detectar su presencia en la cadena respiratoria se evaluó la expresión del mensajero para este compuesto.

Los resultados del producto de amplificación en la línea celular INBL en las mismas condiciones que COX I, COX II y COX III muestran una banda de 242 pb correspondiente a COX IV en los controles, mientras que en los productos obtenidos de las células cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2 observamos una inhibición total de la expresión del mensajero para dicho complejo (figura 9).

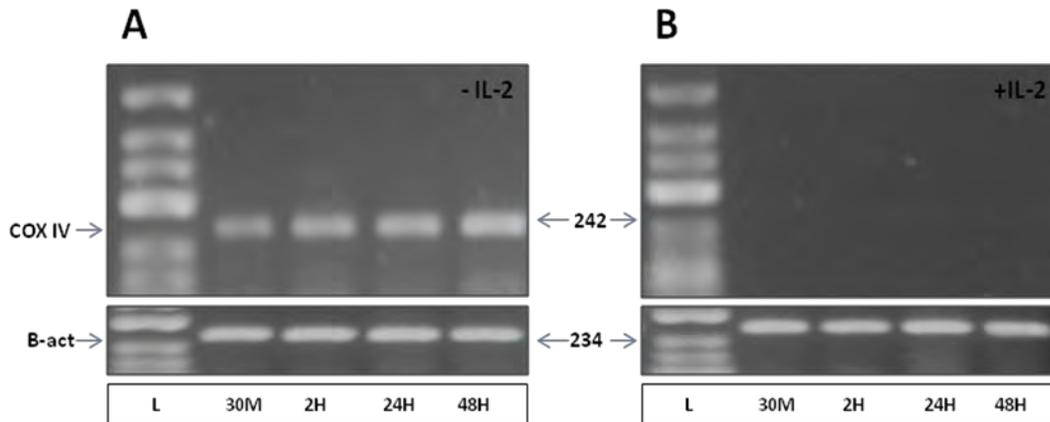


Figura 9. Productos de amplificación para COX IV (242 pb), en la línea celular INBL, cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2, no hay expresión en ninguna de las muestras. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

En la línea celular CALO también observamos una completa inhibición del complejo COX IV en las células cultivadas en presencia de IL-2 en comparación a las células ausentes de esta citocina (figura 10).

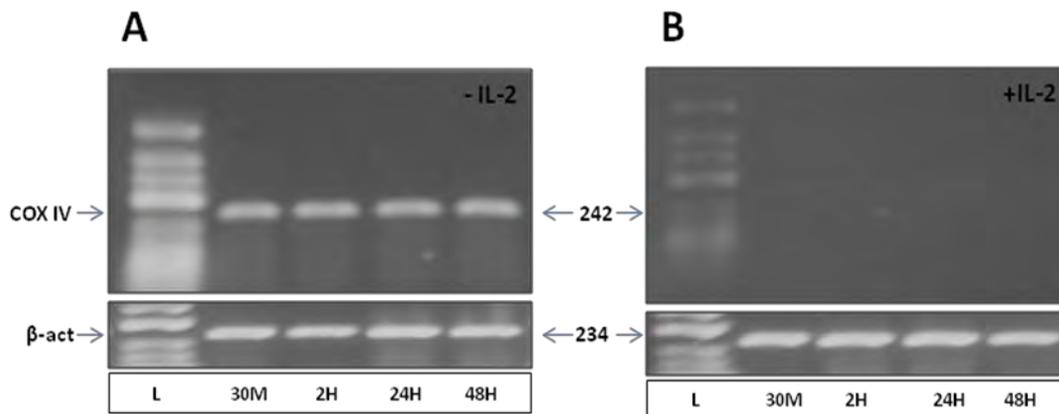


Figura 10. Productos de amplificación para COX IV (242 pb), en la línea celular CALO, cultivada a diferentes tiempos A) Células cultivadas en ausencia de IL-2 mostrando amplificado en todos los tiempos; B) Células cultivadas en presencia de 100UI/mL IL-2, no hay expresión en ninguna de las muestras. Recuadro inferior producto para β -Actina 234 pb usada como control (M: Minutos, H: Horas y L: Marcador pares de bases).

Muerte celular programada: Apoptosis

Después de demostrar que IL-2 regula positivamente la expresión del mensajero para Citocromo c y negativamente la expresión del mensajero para COX IV, se decidió evaluar la inducción de apoptosis en las células cultivadas en presencia de la citocina.

Escalera de la muerte

Escalera de la muerte (fragmentación de DNA): Se realizó la extracción del DNA genómico de las líneas celulares CALO e INBL por medio del DNazol y se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1.5%. La extracción de ADN se realizó a 4 y 7 días de cultivo en presencia y ausencia de IL-2. Podemos observar en los geles la fragmentación del DNA extraído de las células cultivadas en presencia de IL-2 provenientes de ambas líneas celulares, a diferencia de la integridad del DNA de las células en ausencia de la citocina. Es importante destacar que a los 7 días se observa la mayor fragmentación de DNA indicando que el proceso apoptótico continúa (Figura 11).

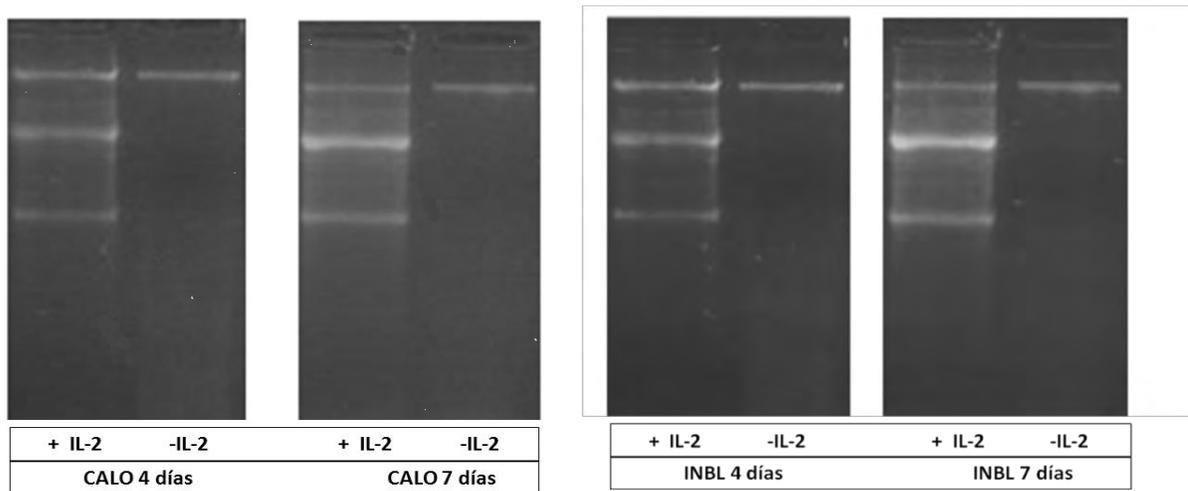


Figura 11. DNA extraído de las células CALO e INBL cultivadas en presencia y ausencia de IL-2 a diferentes tiempos de exposición a la citocina, observando fragmentación del DNA en las células tratadas.

Con el propósito de confirmar que la fragmentación del DNA observado en las células de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, es debida a la alta concentración de IL-2, se realizaron cultivos celulares de 2 días para ambas líneas en presencia de bajas dosis de IL-2, con solo 0.1, 1,10 UI/mL. Los resultados obtenidos después de la electroforesis mostraron la ausencia de la fragmentación del DNA, confirmando que altas dosis de IL-2 son necesarias para que dicho proceso se lleve a cabo (Figura 12).

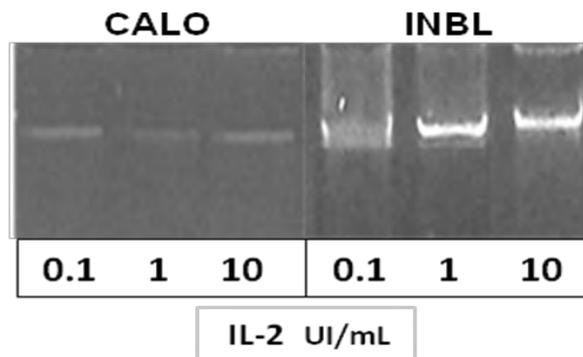
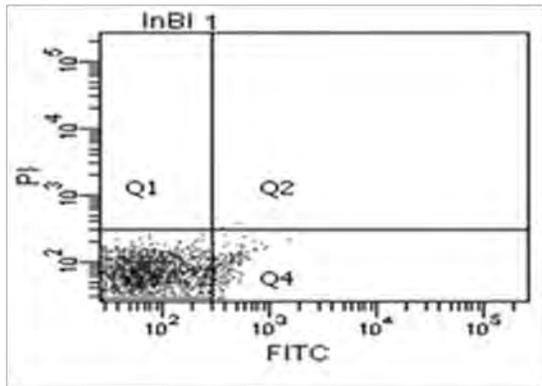


Figura 12. DNA extraído de las líneas celulares CALO e INBL cultivadas por 2 días en presencia de 0.1,1,10 UI/mL de IL-2, para ambas líneas se observa el DNA integro.

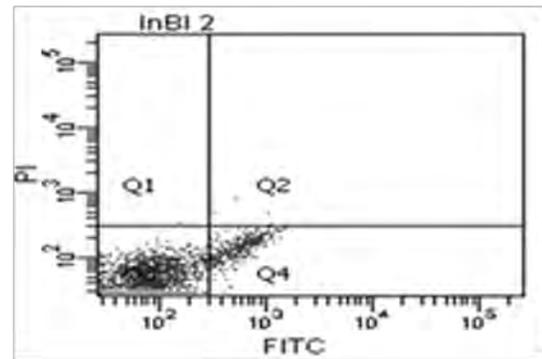
Detección de muerte celular por Anexina V-FITC

Dentro de los aspectos bioquímicos que se evalúan para establecer la inducción de apoptosis se encuentran la determinación de la presencia de fosfatidilserina en la membrana externa celular, por ello se evaluó dicha presencia en las células de CaCU cultivadas en presencia de 100 U/mL de IL-2 por medio de citometría de flujo usando el ensayo de Anexina-V.

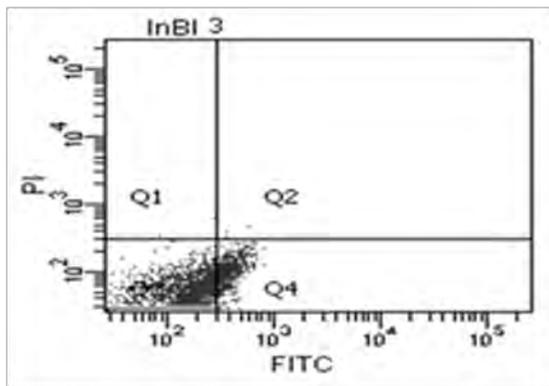
Los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos después del análisis en el citómetro de flujo para la línea celular INBL muestran un aumento en el porcentaje de células positivas a fosfatidilserina - FITC con respecto al tiempo, obteniendo el mayor porcentaje (48%) a los 4 días de cultivo en presencia de la citocina (Figura 13).



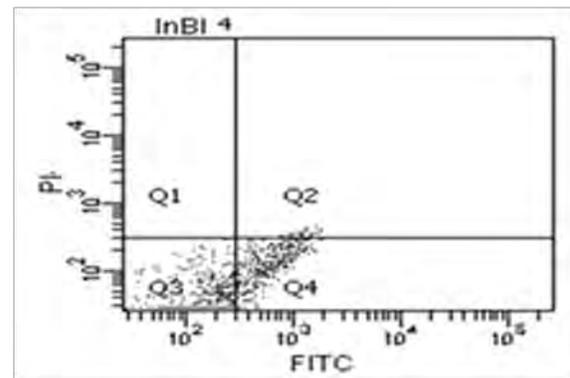
(A) Apoptóticas: 6.7
Necróticas:0.1



(B) Apoptóticas: 10.5
Necróticas:0.2



(C) Apoptóticas: 22.5
Necróticas:0.2



(D) Apoptóticas: 48.5
Necróticas:0.1

Figura 13. Determinación de apoptosis en la línea celular INBL, en presencia de IL-2, en la figura (A): 1 día de cultivo en presencia de IL-2, (B) 2 días, (C) 3 días y (D) 4 días de tratamiento con la IL-2. Relación de cuadrantes (Q). Q1: doble marca de fluorescencia, Q2: células necróticas marcadas con IP, Q3: población celular sin marcaje y Q4: células apoptóticas marcadas con FIT-C.

Cabe mencionar que se detectó un porcentaje menor al 1% de células necróticas (IP: yoduro de propidio) evaluados a través de la presencia de IP fluorescente.

Los resultados de la intensidad de fluorescencia obtenidos en la línea celular CALO en las mismas condiciones de cultivo que INBL, muestran resultados semejantes obteniendo el mayor porcentaje (46%) a los 4 días en presencia de la citocina y muy poca de necrosis (Figura 14).

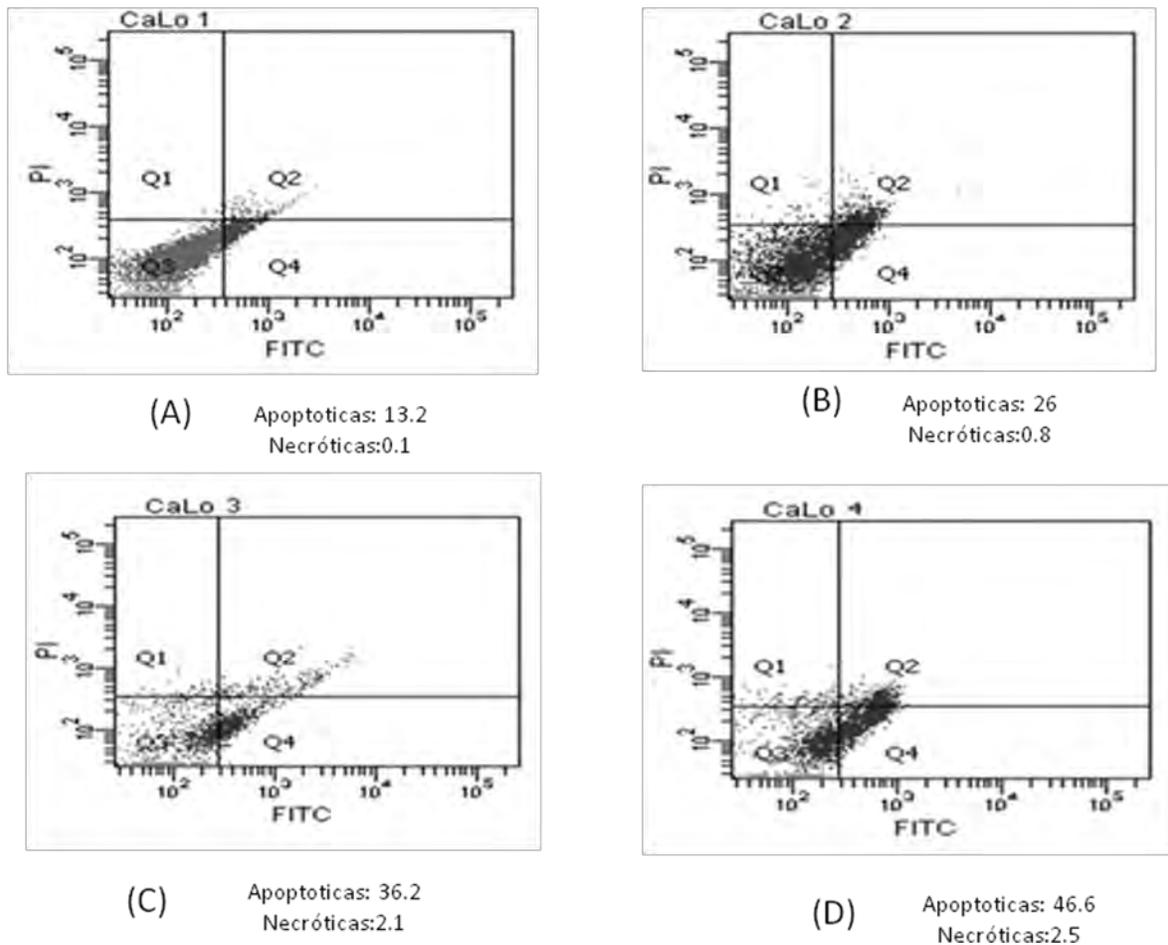


Figura 14. Determinación de apoptosis en la línea celular CALO, en presencia de IL-2, en la figura (A): 1 día de cultivo en presencia de IL-2, (B) 2 días, (C) 3 días y (D) 4 días de tratamiento con la IL-2. Relación de cuadrantes (Q). Q1: doble marca de fluorescencia, Q2: células necróticas marcadas con IP, Q3: población celular sin marcaje y Q4: células apoptóticas marcadas con FIT-C.

Microscopia confocal

La microscopia confocal es una técnica mediante la cual, podemos localizar una fluorescencia acoplada a un anticuerpo que reconoce proteínas específicas. Se utilizan diversos fluorocromos como FIT-C (fluorescencia emitida: verde) para monitorear y verificar la intensidad, de las proteínas. Por lo antes mencionado, se utilizó dicha técnica, con un anticuerpo específico para Citocromo c conjugado con FIT-C para identificar su presencia y verificar su intensidad que puede ir en

aumento dependiendo de la cantidad de proteína en las células de carcinoma de cérvix cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2.

Los resultados de la línea celular INBL, muestran células positivas a FIT-C (fluorescencia verde), en la cual se conserva una mayor emisión de fluorescencia en las células cultivadas en presencia de 100UI/ml de IL-2 en comparación a su control, células ausentes de la citocina.

En un acercamiento de la micrografía de las células con mayor fluorescencia se puede apreciar un número considerable de pequeños cúmulos fluorescentes en el citosol de las células cultivadas con IL-2, los cuales no se observan en las cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 15 y 16).

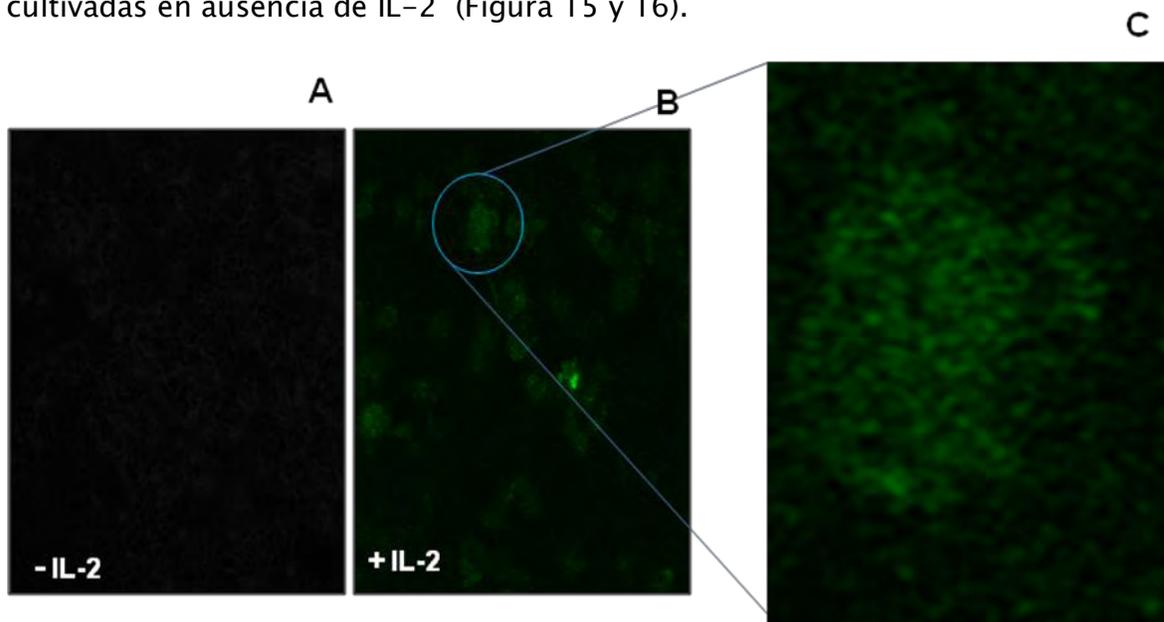


Figura 15. Imagen de microscopia confocal (10X) de las células INBL cultivadas por 24hrs: A) Ausencia IL-2, B) Presencia de IL-2 y C) Amplificación del campo B (100X) donde se observa cúmulos con alta fluorescencia, probablemente mitocondrias de las cuales se observa salir nubes fluorescentes, lo que implicaría la salida del Citocromo c al citosol.

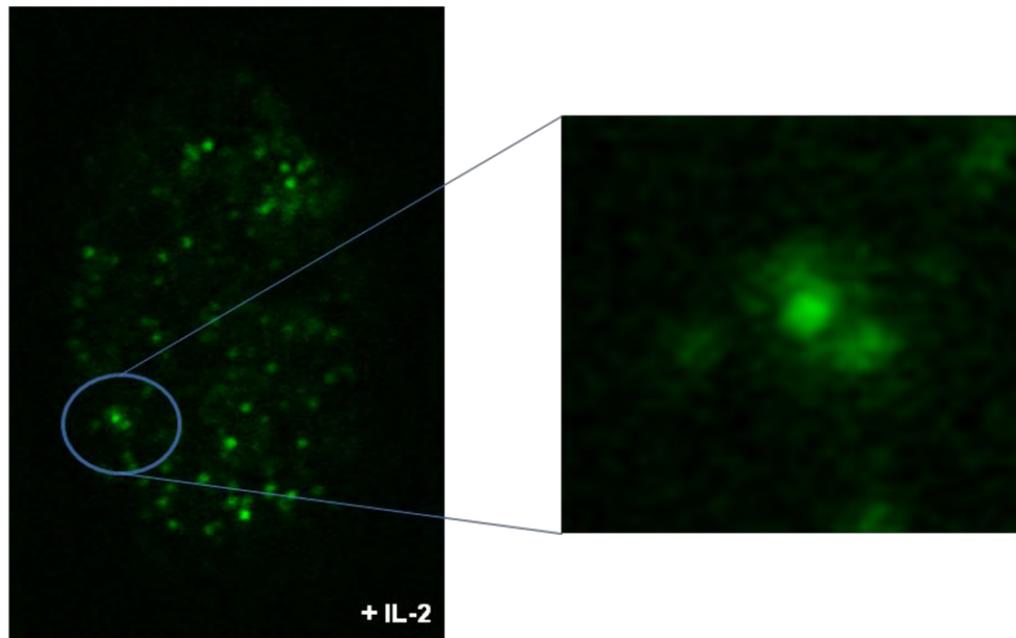


Figura 16. Microscopía de células INBL, aumento 100X donde se observan cúmulos positivos a FIT-C en los que se aprecia una nube de fluorescencia que suponemos es provocada por la salida de Citocromo c de la mitocondria.

Los resultados para la línea celular CALO, nos muestra, de igual manera un aumento en la fluorescencia emitida en las células en presencia de 100UI/mL de IL-2 la cual, es más intensa que las células ausentes de IL-2. En un acercamiento de la micrografía de las células con mayor fluorescencia se observa un número considerable de pequeños cúmulos fluorescentes en el citosol de las células cultivadas con IL-2, los cuales no se observan en las cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 17).

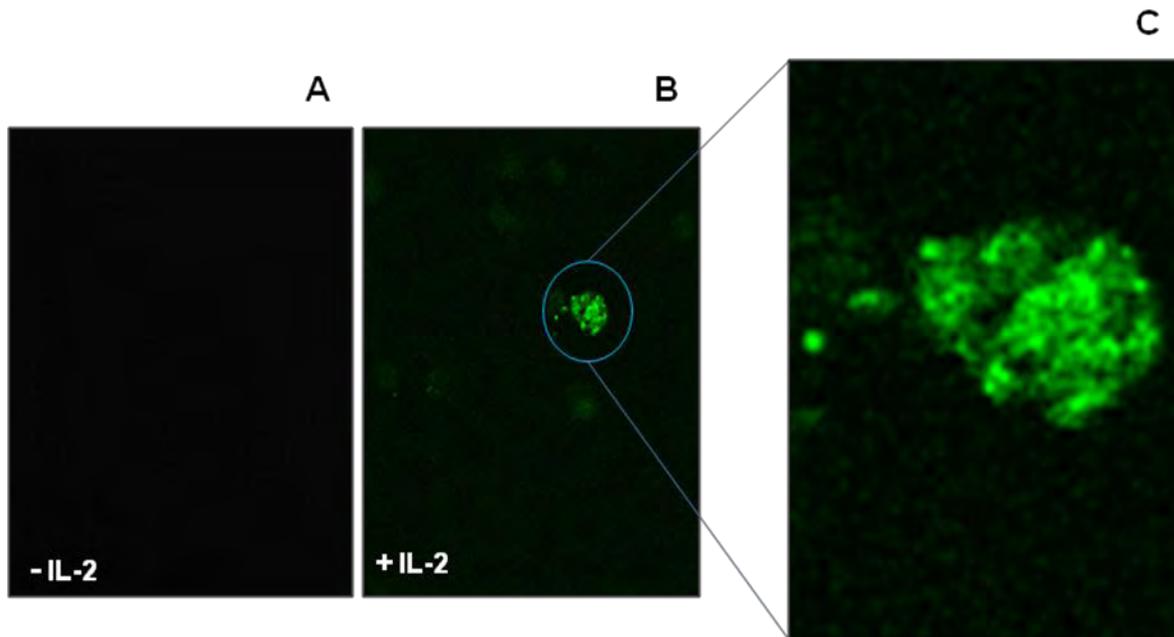


Figura 17. Imagen de microscopía confocal (10X) de las células CALO cultivadas por 24hrs: A) Ausencia IL-2, B) Presencia de IL-2 y C) Amplificación del campo B (100X) donde se observa cúmulos con alta fluorescencia, probablemente mitocondrias de las cuales se observa salir nubes fluorescentes, lo que implicaría la salida del Citocromo c al citosol.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Interleucina 2 (IL-2) es una citocina muy importante para la respuesta inmunológica, al promover la activación y proliferación de los linfocitos T. Su acción se inicia con la unión de la proteína a su receptor, el cual está principalmente presente en células de origen hematopoyético. En la actualidad diversos autores han descrito que este receptor para IL-2 (RIL-2) no es exclusivo de este tipo celular, ya que también se expresa en células normales de riñón y en células de carcinomas humanos (McMillan et al., 1995). Su efecto antitumoral es mediado no únicamente por linfocitos T, sino también por la activación de células asesinas naturales (NK), que al ser activadas por linfocinas se denominan Lymphokine Activated Killer cells (LAK).

IL-2 además de ser un potente activador e inductor de proliferación de los linfocitos T ayuda a su supervivencia, sin embargo se ha reportado que esta citocina también puede ejercer efectos simultáneos y opuestos sobre la expresión de proteínas pro apoptóticas y anti apoptóticas (Rami et al., 2003), ya que promueve la muerte de los linfocitos T en altas dosis (muerte celular inducida por la activación), al inducir proteínas pro apoptóticas y suprimir a FLIP (proteína anti apoptótica), regulando así, la supervivencia o muerte de las células T, según la concentración. Estos resultados nos llevan a suponer que una de las funciones principales de la IL-2 es la homeostasis celular (Refaeli et al; 1998). Cabe mencionar que también se ha reportado que IL-2 aumenta la transcripción y expresión de FasL una proteína transmembranal que al unirse a su receptor induce muerte por apoptosis, (Rami Aqeilan et al., 2003) una vez activada la vía de receptores de la muerte como FasL, se activa caspasa 8, la cual puede hidrolizar a BID, proteína pro apoptótica que se transloca a la mitocondria promoviendo la liberación del Citocromo c y por consecuencia la apoptosis (Massé, 2013).



El uso de la IL-2 en la inmunoterapia contra el cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales (estudios preclínicos), incluyendo el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas, plasmocitoma, carcinoma de mama y linfomas (Deshmukh, 2001). Nuestro grupo de trabajo ha usado como modelo de estudio al carcinoma de cérvix (CaCU), debido a su alta incidencia en la población mexicana, y actualmente evalúa el uso de IL-2 en liposomas como una alternativa terapéutica para este tipo de tumor (Bañuelos, 2000). El mecanismo de inhibición del desarrollo tumoral por IL-2 se ha determinado por su capacidad para promover el infiltrado de linfocitos T y células NK en el sitio del tumor, lo que aumenta el nivel de actividad lítica (Indrova, 2003, Mikyskova, 2000). Además, la presencia de IL-2 favorece la expresión de las subunidades β y γ del receptor de IL-2 (IL-2R), las cuales se requieren para los eventos de traducción de señales (Alvarado, 1997, Rocha et al., 2004) Por otro lado, se ha demostrado que el IL-2R no sólo se expresa en células linfoides, puesto que se ha reportado su presencia en fibroblastos humanos, células endoteliales y células epiteliales intestinales (Yasumura et al., 1994) de igual manera se ha encontrado ampliamente distribuido en distintos tumores sólidos (Bañuelos, 2000, Alvarado, 1997, Yasumura et al., 1994).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha publicado la presencia del receptor para IL-2, de alta afinidad, en líneas celulares de CaCU (Rocha et al., 2004, Rangel et al., 2010). Asimismo, se sabe que el receptor para IL-2 en estas células tumorales, tiene una expresión diferencial dependiente del estadio clínico del tumor (Rangel et al., 1998) y dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de líneas celulares de CaCU se obtiene diferentes respuestas, puesto que a 100UI/mL inhibe la proliferación celular y a 10 UI/mL induce su proliferación (Alvarado, 1997).

También se ha demostrado que las células de CaCU, no sólo expresan IL-2R, sino que producen y secretan IL-2, lo que sugiere que las células tumorales de CaCU han adquirido una dependencia por este factor para su proliferación como un mecanismo de evasión inmunológico (Alvarado, 1997).



Con la finalidad de evaluar si la apoptosis es uno de los mecanismos por los cuales IL-2 inhibe la proliferación de las células de CaCU, el presente trabajo evaluó la expresión del mensajero para Citocromo c y los complejos de la cadena respiratoria, basados en los resultados previos de Rangel 2006 en donde se encontró una regulación positiva de Citocromo c dada por IL-2. Nuestros resultados muestran que en efecto existe un incremento en la expresión del mensajero para Citocromo c inducida por 100UI/mL de IL-2 en las líneas de CaCU: CALO e INBL, y que este incremento está fuertemente asociada a la apoptosis. Este fenómeno nos indica que la citocina está interviniendo en el aumento de la transcripción del gen para Citocromo c, el cual se sabe interviene en la formación del apoptosoma y la activación de caspasa 9 la cual desencadena la cascada proteolítica propia de la muerte celular apoptótica, razón por la cual, la célula requiere un aumento en la transcripción de Citocromo c tal y como lo observamos en ambas líneas celulares.

Asimismo, se sabe que durante la apoptosis existen cambios en la membrana mitocondrial que permiten la salida del Citocromo c al citosol y que ésta puede estar relacionada con cambios en el funcionamiento de la cadena respiratoria que conduce a la generación de ATP. Por ejemplo en el cáncer hepático (murino) avanzado se menciona que la terapia con altas dosis de IL-2 y cloroquina (fármaco contra la malaria) reduce significativamente la síntesis de ATP, requerida en la división celular (Liang et al., 2012), sin embargo, no se cuenta con reportes que indiquen que IL-2 regula la expresión de estos complejos en células tumorales humanas. Por esta razón, también nos dimos a la tarea de investigar el papel de IL-2 como regulador de la expresión de diversos genes de la cadena respiratoria: COX I, COX II, COX III y COX IV. Los resultados obtenidos para COX I, COX II y COX III, muestran que no hay cambios significativos en la expresión del RNA mensajero de células cultivadas con IL-2, lo que nos indica que el proceso de transporte de electrones en las células se está llevando de manera normal hasta COX III. Sorpresivamente encontramos que el gen para COX IV se encuentra completamente inhibido por



IL-2, tanto en células CALO como INBL. Cabe mencionar que el transporte de electrones de COX III a Citocromo c, se realiza en forma normal, dejando a este último en su forma reducida al aceptar los electrones. De tal manera que al estar inhibido el COX IV por IL-2, no existe continuidad para la donación de electrones, por lo cual Citocromo c permanece en su forma reducida y es liberado de la mitocondria al citosol para llevar a cabo la muerte vía apoptótica. Existen reportes que indican que Citocromo c en su forma oxidada es más eficiente y tiene una mayor afinidad por el factor activador de la apoptosis (APAF 1) y por consiguiente mayor activación de caspasa 9 y 3, que se sabe son importantes para desencadenar la cascada de eventos morfológicos y bioquímicos de la muerte por apoptosis (Suto et al., 2005, Pan et al., 1999). No obstante, la forma reducida del Citocromo c también puede formar el apoptosoma con una afinidad no tal alta que el Citocromo en su forma oxidada, lo cual explica el que hayamos obtenido 48% de células apoptóticas en presencia de IL-2.

Por otro lado, existen publicaciones que muestran variaciones en la expresión de los diferentes COXs durante el proceso apoptótico (Johannes, 2008, Camares, 2003) y hasta una disminución de COX IV en cáncer colorrectal (Sagar et al., 2010). Sin embargo, esta es la primera vez que se reporta una completa inhibición de COX IV inducida por IL-2 en células de carcinoma de cérvix.

Es interesante mencionar que el COX IV es uno de los principales reguladores de la fosforilación oxidativa y su desaparición equivale, a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial y una baja en la producción de ATP, condición que promueve la muerte celular programada (Xu et al., 2004). También, se ha reportado que al inhibir a este complejo se da una hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial y dicho aumento puede llevar a la formación de ROS y la inducción de la apoptosis (Kadenbach et al., 2004).



En este proceso apoptótico la caspasa 3 activa, hidroliza la unión ICAD/CAD y una vez libre CAD entra al núcleo y actúa como DNAsa con una elevada actividad específica, comparable a la Dnasa I o Dnasa II, y degrada rápidamente al DNA, dando como resultado la fragmentación de 180–200 pb o múltiplos de éstos (Cascales, 2003). Dado que en este trabajo se observó la típica escalera de fragmentación del DNA en las células de CaCU cultivadas en presencia de IL-2, proponemos que esta fragmentación es resultado del proceso apoptótico iniciado por IL-2. Reportes que apoyan la teoría de que IL-2 induce muerte por apoptosis son los publicados por Torres 2012, quien reportó un aumento en la proteína caspasa 3 en las células CALO e INBL cultivadas con IL-2. Asimismo, Martínez 2012 observó un aumento en la expresión del mensajero para caspasa 9 y 3. El hecho de que la IL-2 sólo induce a la muerte de células de CaCU en altas dosis, se corrobora en este trabajo, ya que la fragmentación del DNA sólo se llevó a cabo con una concentración de 100 UI/mL, y no a bajas dosis de IL-2 (0.1, 1 y 10 UI/mL). Estos resultados apoyan la hipótesis de nuestro grupo de trabajo en la cual recomienda a los protocolos de terapia contra el cáncer en donde se utilice IL-2 en bajas dosis, se tengan las precauciones necesarias, ya que dosis bajas induce la proliferación de las células tumorales (Alvarado, 1997), y como se demostró en este trabajo, tampoco induce la muerte por apoptosis.

Otro dato que apoya la inducción de apoptosis por IL-2 en células de CaCU es la detección de la fosfatidilserina, ya que este lípido es translocado de la cara interna de la membrana celular a la externa durante el proceso apoptótico. Razón por la cual se utilizó Anexina V/FITC mediante citometría de flujo para medir el porcentaje de muerte por apoptosis en las líneas celulares CALO e INBL tratadas con 100 UI/mL de IL-2, obteniendo como resultados un aumento de apoptosis dependiente del tiempo de exposición a la IL-2, que va en INBL de 6.7% después de un día y hasta 48.5% a los 4 días y en CALO de 13.2% hasta 46.2%. Consideramos que el porcentaje de muerte obtenido para INBL en los primeros días es menor que CALO (II-B), puede estar relacionado a que INBL (IV-B) proviene de un tumor de estadio más avanzado y por lo tanto más



resistente, sin embargo, al extender el tiempo de exposición a IL-2, INBL aumenta su porcentaje de muerte por lo que sería conveniente analizar la inducción de apoptosis líneas celulares de diferentes estadios para poder hacer una generalización de los resultados. Es interesante recalcar que mientras la translocación de la fosfatidilserina es una fuerte indicación de apoptosis, la fragmentación del DNA es una sólida confirmación que este proceso se está llevando a cabo, tal y como sucedió en nuestro sistema.

Otra prueba para confirmar apoptosis es por medio de la determinación de Citocromo c liberado al citosol. Para confirmar esto se visualizó su liberación identificando su presencia en el citosol de células de CALO e INBL usando la micrografía confocal. Mediante esta técnica observamos un aumento significativo en la fluorescencia de Citocromo c en células cultivadas en presencia de 100 UL/mL de IL-2. Al magnificar estas micrografías detectamos que existen focos intensos de fluorescencia y que de éstos salen nubes fluorescentes, lo cual nos indica que los focos fluorescentes corresponden a las mitocondrias que contienen al Citocromo c, y las nubes, a la salida de esta molécula desde la mitocondria al citosol, evento relacionado con el inicio de la apoptosis. Asimismo demostramos que no únicamente hay salida del Citocromo c, sino que la síntesis de esta molécula se encuentra amplificada.

El conjunto de resultados del presente trabajo indican que la IL-2 efectivamente, tiene un papel modulador de la apoptosis. Encontramos que no únicamente se presenta apoptosis a través de translocación de fosfatidilserina y fragmentación de DNA, sino que también modifica la expresión de algunos de los complejos de la cadena respiratoria, como es el caso de la COX IV la cual es completamente inhibida. También, incide en una alta producción del Citocromo c lo que nos lleva a pensar que tiene un papel clave en la liberación de este complejo al citosol para llevar a cabo la cascada proteolítica propia de la apoptosis. Asimismo, la regulación negativa de COX IV, es un aporte significativo al proceso apoptótico en células de CaCU, inducido por IL-2, ya



que puede bloquear la síntesis de ATP como un mecanismo de ahorro energético al mismo tiempo que activa la apoptosis.

Por último mencionaremos el aporte al conocimiento del sistema apoptótico al suministrar datos que indican que durante dicho proceso el Citocromo c puede salir de la mitocondria en forma reducida. Es evidente que al conocer con más detalle los mecanismos involucrados en el proceso apoptótico inducido por la IL-2, estamos contribuyendo al diseño de nuevas estrategias terapéuticas para la aplicación de este factor en la lucha contra el cáncer.



CONCLUSIONES

- IL-2 induce un aumento significativo en la transcripción del RNAm para Citocromo c en las líneas celulares CALO e INBL.
- IL-2 inhibe completamente la transcripción del RNAm para COX IV en ambas líneas.
- IL-2 no modifica la expresión del mensajero de los complejos COX I, COX II y COX III de las líneas celulares CALO e INBL.
- IL-2 indujo a muerte vía apoptótica a las células de CaCU: CALO e INBL mediante la liberación del Citocromo c.
- IL-2 provoca la fragmentación de DNA genómico de las células de CaCU: CALO e INBL.



PERSPECTIVAS

- Evaluar la cantidad de proteína de Citocromo c, existente en citosol y mitocondria en células de CaCU cultivadas en presencia de IL-2.
- Analizar es estado de oxido-reducción del Citocromo c en el proceso apoptótico.
- Realizar una comparación mediante microcopia confocal para Citocromo c en células cultivadas con IL-2 y un conocido inductor de apoptosis.
- Analizar la transcripción del mensajero de FAS/FASL.
- Medir el potencial de membrana mitocondrial en células cultivadas con IL-2.



REFERENCIAS

- **Adolfo E.** Mecanismos de muerte celular: Apoptosis y Necrosis. Rev.Arg.Anest (2002) 60: 391–401.
- **Alnemri E, Livingston D, Nicholson D, Salvensen G, Thornberry N, Wong W, Yuan J.** Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. J Cell (1996) 87.
- **Alvarado M.** 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. Tesis de Licenciatura (1997). FES-Zaragoza UNAM.
- **Alonso P, Lozano E y Hernández M** (2000). Cáncer Cervico-Uterino diagnostico, prevención y control. Edit Panamericana. 254–267.
- **Bañuelos M.** Reducción de tumores de carcinoma de cérvix inducidos en ratones singenicos de la cepa CBA por la administración de IL-2 encapsuladas en Liposomas positivos. Tesis de Licenciatura (2000). FES-Zaragoza UNAM.
- **Barrientos, Barrosa, Valnotb, Rötigb, Rustinb, Tzagoloffa.** Cytochrome oxidase in health and disease. Gene (2002) 286: 53–63.
- **Benchoua A, Guégan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onténiente B.** Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. J Neurosci (2001)18:7127–7134.
- **Bhardwaj A, Aggarwal B.** Receptor mediated choreography of life and death. J Immunology (2003) 23: 317–332.
- **Boatright K, Salvesen G.** Mechanisms of caspasa activation. J Cell Biol (2003) 15:72–731.



-
- **Boni L, Batenjany M, Neville E, Guo Y, Xu L, Wu F, Mason J, Robb R, Popescu M.** Interleukin-2-induced small unilamellar vesicle coalescence. *J Science B.V* (2001) 1514:127-138.
 - **Boticario C, Cascales A** (2009). *Innovaciones en cáncer*. Edit UNED. 226-228.
 - **Bras M, Queenan B, Susin S.** Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *J Biochemistry* (2005) 70:231-239.
 - **Buendia B, Santa Maria A, Courvalin J.** Caspase dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Science* (1999) 112:1743-1753.
 - **Caballero A, Mora J.** Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *J Reb* (2002) 2:235-244.
 - **Camarés B, Cillero P, López A.** La inhibición del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial por el factor de necrosis tumoral A (TNFA) y la interleucina-1b (IL-1b) modula la apoptosis en condrocitos humanos en cultivo. *J Reumatología* (2003) 30.
 - **Caro M.** Restricción de metionina y de dieta en relación con el estrés oxidativo en mamíferos de laboratorio. Tesis de Doctorado (2010). Facultad de Ciencias Biológicas.
 - **Carroll J, Fearnley I, Skehel J, Runswick M, Shannon R, Hirst J, Walker J.** The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Mol Cell Proteomics* (2005) 4: 693-699.
 - **Cascales A.** Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm* (2003) 69.



-
- **Cecchini G, Maklashina E, Yankovskaya V, Iverson T, Iwata S.** Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* (2003) 545: 31–38.
 - **Chance B, Williams G.** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *J Adv Enzymol Relat Subj Biochem* (1956) 17:65–134.
 - **Chunhai H, Beguinot F, Condorelli G, Trencia A, Van Meir V, Yong W, Parney, Wilson H Roa, Petruk K.** Induction and Intracellular Regulation of Tumor Necrosis Factor–related Apoptosisinducing Ligand (TRAIL) Mediated Apotosis in Human Malignant Glioma Cells. *J Cancer Research* (2001) 61: 1162–1173.
 - **Ciacchi C, Mahida R, Dignass A, Koizumi M, Podolsky K.** Functional Interleukin–2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells. *J Clin Invest* (1993) 92:527–532.
 - **Coventry J, Weeks C, Heckford E, Sykes J, Bradley J, Skinner M.** Of IL–2 Cytokine Expression Despite IL–2 Messenger RNA Transcription in Tumor–Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *J Immunology* (1996)156:3486–3492.
 - **Creagh E, Conroy H, Martin S.** Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. *J Immunol* (2003) 193.
 - **Curtin J, Cotter T.** Life and let die: Regulatory mechanisms in Fas mediated apoptosis. *J Cell Signal* (2003)15.
 - **Deshmukh P, Glick R, Lichtor T, Moser R, Cohen E.** Immunogene therapy with interleukin–2–secreting fibroblasts for intracerebrally metastasizing breast cancer in mice. *J Neurosurg* (2001) 94:287–292.
 - **Dzul R, Puerto S, González L.** Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *J Rev Biomed* (2004)15:233–241.



-
- **Elinos B, Maldonado V, Meléndez Z.** Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *A.C. Gac Méd Méx* (2003) 139.
 - **Elmore S.** Apoptosis: A Review of programmed cell death. *J Toxicol pathol* (2007) 35.
 - **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S.** A caspasa activated DNasa that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *J Nature* (1998) 391:43–50.
 - **Fernandez D** (1998). *Cancer genital femenino*. Edit Intersistemas. 45–47.
 - **Frederik H, Krammer I, Krammer P.** Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *J. Nature* (2002) 2: 277–288.
 - **Guicciardi M, Gores G.** Life and death by death receptors. *J Faseb* (2009) 23.
 - **Gulcin D, Xian C.** IL-2 and IL-15 Exhibit Opposing Effects on Fas Mediated Apoptosis. *J Immunology* (2004) 223–228.
 - **Green D, Vande Z.** On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) 79:1064–1068.
 - **Herrero A, Barja G.** Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J Bioenerg* (2000).
 - **Indrová M, Bubeník J, Mikysková R, Mendoza L, Símová J, Bieblová J, Jandlová T, Jinoch P, Smahel M, Vonka V, Pajtasz P.** Chemoimmunotherapy in mice carrying HPV16-associated, MHC class I+ and class I- tumours: Effects of CBM-4A potentiated with IL-2, IL-12, GM-CSF and genetically modified tumour vaccines. *J Oncol* (2003) 22:691–699.



-
- **Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2013).**
 - **Janeway C, Travers P, Walport M, Capra D. (2000).** El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Edit Masson Barcelona, 115–136.
 - **Johannes, Meierhofer, Zimmermann, Feichtinger, Kogler, Ratschek, Schmeller, Sperl and Kofler.** Loss of Complex I due to Mitochondrial DNA Mutations in Renal Oncocytoma. J Clin Cancer Res (2008) 14.
 - **Kadenbach B, Arnold S, Leec I, Huttemann C.** The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. J Biochimica et Biophysica (2004) 1655:400–408.
 - **Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y.** Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. J Immunol (2003) 171–182.
 - **Lehninger D, Michael N, Cox M (2002).** Principles of Biochemistry Edt Fourth. 659–670
 - **Lehtinen M, Pawlita M, Zumbach K, Lie K, Hakama M, Jellum E, Koskela P, Luostarinen T, Paavonen J, Pukkala E, Sigstad E, Thoresen S, Dillner J.** Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. J Obstet Gynecol (2003) 188:49–55.
 - **Liang X, De Vera, Buchser, Romo de Vivar, Loughra, Beer Stolz, Per Basse, Wang, Van Houten, Zeh III, Lotze.** Inhibiting Systemic Autophagy during Interleukin 2 Immunotherapy Promotes Long-term Tumor Regression. Microenvironment and Immunology (2012)
 - **Lizarbe I.** El suicidio y la muerte celular. Rev. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (2007) 101:2.
 - **Luvia E, Sanchez T, Vargas.** Apoptosis: El fenómeno y su determinación. Tec Pecu Mex (2003) 41: 49–62.



- **Martinon F, Tschopp J.** Inflammatory caspasa and inflammasomes: Master switches of inflammation. *J Cell Death Differ* (2007)14.
- **Martínez F.** Determinación de la expresión de RNAm para caspasa 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de Cancer Cervico Uterino: HELA, INBL y CALO, cultivadas con IL-2 a diferentes tiempos. Tesis de Licenciatura (2012). FES-Zaragoza UNAM.
- **Masse A.** IL-2 regula la expresión de RNAm de la proteína Bid en células de las líneas de Cáncer de Cérvix INBL y CALO. Tesis de Licenciatura (2013). FES-Zaragoza UNAM.
- **Mazumder E. DuPree, Almasan.** A Dual Role of Cyclin E in Cell Proliferation and Apoptosis May Provide a Target for Cancer Therapy. *J Curr Cancer Drug Targets* (2004) 4: 65-75.
- **Mendez F.** Inducción a la apoptosis y acumulo de alteraciones genéticas en la progresión metastatica del cáncer de mama: variabilidad genética y selección poblacional. Tesis de Doctorado (2002). Universidad autónoma de Barcelona.
- **McMillan D, Kernohan M, Flett M, Heys S, Deehan D, Sewell H, Walker F, Eremin O.** Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localization in human solid tumor cells in situ and in vitro evidence for a direct role in the regulation of tumor cell proliferation. *J Cancer* (1995) 60: 776-785.
- **Mikysková R, Bubenik J, Mendoza L, Vonka V, Smahel M, Símová J, Jandlová T.** Local cytokine treatment of HPV16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clin Exp Metastasis* (2000)18:581-589.
- **Ministerio de Salud. Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino (MSCN).** Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino, Chile (2004).
- **Mire S and Thorpe R.** Academic Press Great Britain. *Cytokines* (1998)19-33.



-
- **Nazzal N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F, Bronda M.** Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual. *J Chil Obstet Ginecol* (2006) 71:341–348.
 - **Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X.** Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *J Genes* (2003) 17:1475–1486.
 - **Pan Z, Voehringer D, Meyn R.** Analysis of redox regulation of cytochrome c-induced apoptosis in a cell-free system. *J Cell Death Differ* (1999) 6: 683–688.
 - **Parkins, Robert A** (1993). *Las bases del diagnóstico clínico*. Edit Continental México.
 - **Pistritto G, Jost M, Srinivasula S, Baffa R, Poyet J, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri E.** Expression and transcriptional regulation of caspasa 14 in simple and complex epithelia. *J Cell Death Differ* (2002) 9:9.
 - **Pliego V.** Evaluación de la frecuencia de apoptosis en linfocitos de niños desnutridos. Tesis de Maestría (2006) UAM–Iztapalapa.
 - **Rai N, Tripathi K, Sharma D, Shukla V.** Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *J Low Extrem Wounds* (2005) 4.
 - **Rami A, Rotem K, Ahmi B, Haya L.** Mechanism of action of interleukin-2 (IL-2)-Bax, an apoptosis-inducing chimaeric protein targeted against cells expressing the IL-2 receptor. *J Biochem* (2003) 370:129–140.
 - **Ramírez A** (1997). *Inmunología básica y clínica*. Edit Manual Moderno México.
 - **Rangel C, Rodríguez C, Flores C. Gómez R, Soto C, Mendoza R, Weiss S** (1998). Differential expression of the two components of the Interleukin 2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* 3:1239–1243.



-
- **Rangel C.** Expresión diferencial de genes en células de carcinoma de cérvix estimuladas con IL-2. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas (2006). Proceso de titulación. FES-Zaragoza UNAM.
 - **Rangel C, Corona O, Soto C, López L, Pablo A, Torres G, Weiss S.** Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine* (2010) 50(3):273-7.
 - **Refaeli Y, Van Parijs L, London C, Tschopp and Abbas A.** Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Immunity* (1998)8, 615-623.
 - **Riedl S, Salvesen G.** The apoptosis: signaling platform of cell death. *J Mol Cell Biol Nat Rev* (2007) 5: 405-413.
 - **Riedl S, Shi Yigong.** Molecular mechanisms of caspasa regulation during apoptosis. *J Nature Reviews Mol Cell Biol* (2004) 5:897-907.
 - **Rocha Z, Huitron C, Cacéres C, Alvarado M, Valle M, Soto C, Weiss S, Rangel C.** Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta gamma signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *J Cellular signaling* (2004) 16: 1239-1247.
 - **Roseto A, brener C** (1999) . Apoptosis o la muerte celular programada. *Arch. argen. Pediatr* 97: 253-554.
 - **Rotsaert F, Ding M, Trumpower B.** Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome bc1 complexes by center N inhibitors antimycin, ilicicolin H and funiculosin. *Biochim Biophys Acta* (2008) 1777: 211-219.



-
- **Sagar L, Sales K, Taanman J, Dijk S, Winslet M.** Lowering the apoptotic threshold in colorectal cancer cells by targeting mitochondria. *J Cancer Cell* (2010)10:31–42.
 - **Sánchez R, Gonzalo A.** Mitochondria y muerte celular. *Nova Pub Científica en ciencias biomédicas* ISSN (1998):1794–2470.
 - **Sasagawa T, Inoue M, Lehtinen M, Zhang W, Gschmeissner S, Hajibagheri M, Finch J, Crawford L.** Serological responses to human papillomavirus type 6 and 16 virus-like particles in patients with cervical neoplastic lesions. *Clin Diagn Lab Immunol* (1996) 3:403–410.
 - **Savill J, Fadok V.** Corpse clearance defines the meaning of cell death. *J Nature* (2000) 407:784–788.
 - **Sazanov L, Hinchliffe P.** Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* (2006) 311:1430.
 - **Schiffman M, Castle P, Jeronimo J, Rodriguez A, Wacholder S.** Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* (2007) 8:370.
 - **Shi Y.** Caspase Activation: Revisiting the induced proximity model. *Cell* (2004) 117: 855–858.
 - **Shi Y.** Activation of initiator caspasas: History. Hypotheses and perspectives. *Cancer Mol* (2005) 1: 9–18.
 - **Shi Y.** Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* (2002) 9:459–470.
 - **Skulachev V.** Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group. *Aging Cell* (2004) 3:17–19.
 - **Smith A.** Lowest Dose Interleukin-2 Immunotherapy. *J Blood* (1993) 81:1414–1423.



-
- **Stennicke H, Jurgensmeier J, Shin H, Deveraux Q, Wolf B, Yang X, Zhou Q, Ellerby M, Bredesen D, Green D, Reed J, Froelich and Salvesen G.** Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol* (1998) 273.
 - **Strasser A, O'Connor.** Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* (2000) 69:217-245.
 - **Stryer L,** (1985) *Bioquímica.* Edit Reverte, 303-309.
 - **Suto D, Sato K, Ohba Y, Yoshimura T, Fuji J.** Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism. *J Biochem* (2005) 392: 399-406.
 - **Taylor R, Brumatti G, Ito S, Hengartner M, Derry W, Martin S.** Establishing a blueprint for CED-3 -dependent killing through identification of multiple substrate for this protease. *J Biol Chem* (2007)282.
 - **Thornberry N, Lazebnik.** Caspases: Enemies within. *J Science* (1998) 281:1312-116.
 - **Torres C.** Interleucina 2 regula la expresión de la caspasa 3 en líneas celulares de cáncer Cérvico Uterino CASKI, CALO, INBL, SIHA. Tesis de Licenciatura (2012). FES-Zaragoza UNAM.
 - **Trumpower, B.** The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* (1990) 265:11409-11412.
 - **Tyler D.** The mitochondrion in health and disease. VHC Publishers, INC (1992).
 - **VanderSpek C, Sutherland J, Ratnarathorn M, Howland K, Ciardelli L, Murphy R.** Interleukin-2 Receptor Binding Domain Mutations. *J Biol Chemistry* (1996) 271:12145-1249.



-
- **Vella A, Dow S, Potter T, Kappler J, Marrack P.** Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A. PNAS* (1998) 95:3810–3815.
 - **Viscidi R, Sun Y, Tsuzaki B, Bosch F, Munoz N, Shah K.** Serologic response in human papillomavirus-associated invasive cervical cancer. *J Cancer* (1993) 55:780–784.
 - **Voet D, Voet J** (2006). *Bioquímica*. Edit Panamericana. 156–158.
 - **Wang X.** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *J Genes* (2001) 15:2922–2930.
 - **Willis S, Adams J.** Life in the balance: How BH3-only proteins induce apoptosis. *J Cell Biol* (2005) 17:617–625.
 - **Yagi T, Matsuno YA.** The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* (2003) 42, 2266–2274.
 - **Yasumura S, Chang W, Weidmann E, Hebda P y Whiteside T.** Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *International Journal of Cancer* (1994) 59: 225–234.
 - **Youfen L, Jeong S, Jian H, Yidong B.** Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex. *J Bioenerg Biom* (2006) 38: 283–291.
 - **Yosef R, Luk V, Cheryl A, London, Tschopp, Abul K.** Biochemical Mechanisms of IL-2-Regulated Fas-Mediated T Cell Apoptosis. *Immunity* (1998) 8: 615–623.



-
- **Xu Y, Ge R, Du J, Xin H, Yi T, Sheng J, Wang Y, Ling C.** Corosolic acid induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human cervix adenocarcinoma HeLa cells. *Cancer Letters* (2009) 229–237.
 - **Zaino R, Ward S, Delgado G.** Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* (1992) 69: 1750–1758.
 - **Zamzami N, Kroemer G.** The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s Box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001)2:67–71.
 - **Zara V, Conte L, Trumpower B.** Biogenesis of the yeast cytochrome bc (1) complex. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1793:89–96.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

- <http://dcashop.eu>
- http://www3.sap.org.ar/staticfiles/archivos/1999/arch99_4/99_253_275.pdf
- <http://biolcell4350.wikispaces.com>
- <http://intensivos.uninet.edu/24/2406.html>
- <http://epidemiologiamolecular.com/la-mitochondria>
- <http://web.usal.es/~jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar>
- <http://bioquibi.webs.ull.es>



ANEXO I

Medio y soluciones de cultivo

Medio de Cultivo

RPMI-1640 (Microlab)

Suero Fetal Bovino: SFB (Gibco)

Solución fisiológica de verseno (Sigma)

Solución de Fosfatos: PBS (Sigma)

IL-2 (R&D Systems)

ANEXO II

Reactivos para Extracción ARN Total

Trizol (Invitrogen)

Cloroformo (Sigma)

Isopropanol (Sigma)

Etanol 70% (J.T BAKER)

H₂O inyectable (Promega)

H₂O libre de RNAsas (Fermentas)



Reactivos para Retrotranscripción (RT)

Amortiguador 5X (Promega)

Enzima MMLV-RT (Promega)

dNTP´S 10mM (Invitrogen)

Oligo dT (Promega)

H2O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos PCR

Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)

DNTP´S 10 mM (Invitrogen)

Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)

Primers: COXs y Citocromo c (XX IDT)

H2O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

Agarosa (Invitrogen)

TBE 10X, 1X, 0.5 X (Sigma)

Gel de agarosa al 1.5% (invitrogen)

Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range (Promega)

Buffer de carga Blue/Orange 6X (Promega)

Bromuro de etidio (Mercury)



Reactivos para escalera de la muerte

DNAzol (Promega)

Agua libre de RNAsas (Promega)

Etanol (J.T Baker)

Reactivos para la detección de fosfatidilserina

Anexina V-FITC (1:200) (Sigma)

IP (50µg/µL) (Promega)

Camptotecina (Sigma)

HEPES (Sigma)

Confocal

Formaldehido (Invitrogen)

Tritón X-100 (Invitrogen)

Citocromo c (1:75) (Santa cruz)

Secundario anti-mouse (1:150) (Sigma)

Glicina (Sigma)



ANEXO III

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El suero fetal bovino 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

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares.

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

- Tris base 3.04 gramos (Sigma)
- Cloruro de sodio 800 gramos (Sigma)
- Cloruro de potasio 0.40 gramos (Sigma)
- Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.20 gramos (Sigma)

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)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

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

- Cloruro de sodio 8.0 gramos (Sigma)
- Fosfato de sodio monobásico 2.88 gramos (Sigma)
- Fosfato de potasio 0.4 gramos (Sigma)
- Cloruro de potasio 0.20 gramos (Sigma)

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:

- 10nM de A
- 10nM de G
- 10nM de T
- 10nM de C

Estos se diluyen en agua libre de RNasas para obtener



TBE 10X

- 108 gramos de Tris base (Sigma)
- 55 gramos de Acido bórico (Sigma)
- 40 mL de EDTA 0.5 M (Sigma)

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

TBE 1X

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

TBE 0.5X

Tomar 250 mL de TBE 1X 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 1X



HEPES

- 10 mM Hepes (Sigma)
- 5 mM CaCl₂ (Sigma)
- 140 mM NaCl (Sigma)

Nota: lleve a 1000 mL con agua destilada y Ph 7.4

Anexina -FITC

- Se disuelve con la solución de hepes y se prepara al momento, en ausencia de luz.

Anticuerpos Confocal

Citocromo c (1:75), diluir el anticuerpo con PBS -BSA 3%

Anti- mouse (1:150) diluir el anticuerpo con PBS -BSA 3%

Marcador de Peso Molecular

El marcadores de pesos moleculares ó escalera utilizado en la electroforesis fue de 25 a 700 pb (Fermentas).

