



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Participación de la Cinasá Lck en la activación de Señales Anti-Apoptóticas en Células de Carcinoma de Cérvix

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BILOGÍA MOLECULAR

P R E S E N T A:

Bíol. EVELIN NIEVES ESCAMILLA BELLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. María Isabel Soto Cruz

FES Zaragoza, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Rebeca López Marure

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

México D.F. Noviembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS ZARAGOZA

BIOLÓGÍA EXPERIMENTAL

Participación de la Cinasá Lck en la activación de Señales Anti-Apoptóticas en Células de Carcinoma de Cérvix

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOLÓGÍA MOLECULAR

P R E S E N T A:

Bíol. EVELIN NIEVES ESCAMILLA BELLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dra. María Isabel Soto Cruz

FES Zaragoza, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Rebeca López Marure

Instituto Nacional de Cardiología

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Instituto Nacional de Cancerología

México D.F. Noviembre 2013

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

Me permito informar a usted, que en la reunión del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de octubre de 2013, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ESCAMILLA BELLO EVELIN NIEVES** con número de cuenta **402005412**, con la tesis titulada **"Participación de la Cinasa Lck en la activación de señales Anti-Apoptóticas en Células de Carcinoma de Cérvix"**, bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ:**

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: M EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

Sin otro particular, me despido.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. a 31 de octubre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS:

- Al posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por la formación académica y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

- Al programa de becas para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con número de registro: 346824

- Por el financiamiento brindado para el desarrollo del proyecto a la UNAM (PAPIIT IN22512) y al CONACYT (103761).

- A la Dra. Isabel Soto Cruz por su dirección y apoyo incondicional en la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTOS:

- A los sinodales: Dr. Alejandro Manuel García Carranca, M en C. Luis Sánchez Sánchez, Dra. Rebeca López Marure, Dra. María de Lourdes Mora García y la Dra. Vilma Maldonado Lagunas por sus observaciones que ayudaron a enriquecer mi trabajo.

- Al Dr. Arturo Valle Mendiola por su valiosa colaboración y asesoría para la realización del trabajo Experimental.

- Al Técnico Don José Chavarría por su apoyo incondicional en el laboratorio.

- A mis compañeros de laboratorio por su amistad: Octavio, Mari, Evelin y Pilar.

- Al técnico Luis Alberto por su valiosa colaboración en la realización de los ensayos de microscopia confocal.

DEDICATORIAS:

- A mis padres Héctor y Ofelia por su apoyo incondicional, por su dedicación y por qué a pesar de los problemas siempre creyeron en mí.

- A mis hermanos Eder y Enos por sus consejos y su apoyo incondicional.

- A Julio por su apoyo, dedicación y amor.

- A mis amigas que siguen siendo parte de mi vida y de mis logros académicos las quiero Itzel Del Río y Reina Roldan.

- A mis amigas de toda la vida Alejandra Álvarez y Jessica Pérez.

Índice

Abreviaturas.....	¡Error! Marcador no definido.
Resumen	2
Abstract.....	3
Introducción.....	4
El cáncer cervicouterino (CaCu)	4
Las Citocinas.....	5
La interleucina 2 (IL-2)	7
El Receptor de la IL-2	8
La familia de las cinasas de tirosina Src	15
La proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (Lck)	16
La Lck y otras enfermedades	18
La PI3K	19
La familia de la BCL-2.....	21
La Bcl-2.....	23
Antecedentes.....	24
Hipótesis	25
Objetivo General.....	25
Objetivos Particulares	25
Metodología	26
Material Biológico.....	26
Extracción de linfocitos de sangre periférica	26
Inmunoprecipitación de las cinasas Lck y PI3K	27
incubación de las esferas de agarosa	27
Electroforesis (SDS-SPAGE)	27
Western- Blot	28
Elución de anticuerpos.....	28
Técnica de Microscopía confocal	29
Extracción Mitocondrial y Citoplasmática	29
Resultados	31
Presencia de las cinasas Lck y PI3K en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL	31
Co- localización de las cinasas Lck y PI3K en líneas de carcinoma de cérvix.....	36
Efecto de la camptotecina sobre la fosforilación de la Lck.....	39
Presencia de la Bcl-2 en las células CALO e INBL	40
Determinación de la presencia de la Bcl2, en las líneas celulares CALO, INBL y JURKAT tratadas con la IL-2 a dos concentraciones 100U/ml y 10U/ml	41

Discusión	44
Conclusiones	48
Perspectivas	49
Referencias Bibliográficas	50
Anexos	55

ABREVIATURAS

CaCu: Cáncer Cervicouterino

HPV: Virus del Papiloma Humano

ICTV: Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus

LCR: Región Larga de Control

NK: Células Naturales Asesinas

IL-2: Interleucina 2

IL-1: Interleucina 1

IL-3: Interleucina 3

IFN γ : Interferón gamma

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa

JAK: Cinasa Janus

STAT: Transductor de Señal y Activador de la Transcripción

TYR: Tirosina

Lck: Cinasa específica de linfocitos

PI3K: Cinasa de Fosfatidil-Inositol 3 Fosfato

PTKs: Proteínas tirosina cinasa

VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirida

Treg: Células T reguladoras

LAK: Células asesinas activadas por linfocinas

Teff: Células T efectoras

TCR: Receptor de Células T

ITAM: Motivos de activación basados en tirosina

ZAP70: Proteína cinasa asociada a la cadena ζ

CTLs: Linfocitos T citotóxicos

RTK: Receptores con actividad de tirosina cinasa

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu), es la segunda enfermedad más común entre las mujeres del mundo. Este tipo de cáncer es un problema de salud pública muy importante en México, en 2001 ocupó el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina. Por esta razón, es importante conocer las vías de señalización que utilizan estas células para mantener su fenotipo maligno, ya que esto nos permitirá desarrollar inhibidores específicos que sirvan como tratamiento a futuro. Se ha demostrado que las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL expresan las tres subunidades del receptor de la IL-2. También, se ha demostrado que la cinasa Lck está presente en estas líneas celulares tumorales y además se asocia con la cadena beta del receptor para la IL-2. Sin embargo, se ha reportado que en linfocitos normales la cinasa Lck activa la vía de la cinasa PI3K para inducir mecanismos de supervivencia celular, por lo tanto el objetivo de este trabajo fue analizar la participación de la cinasa Lck en la activación de señales anti-apoptóticas en células de carcinoma de cérvix CALO e INBL tratadas con IL-2. Se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación y co-localización de las cinasas Lck y PI3K para demostrar que existe una interacción entre ambas cinasas, también se observó la co-localización de Lck y PI3K en las células CALO e INBL. Además, se analizó la presencia de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en células CALO e INBL tratadas con 10 U/ml y 100 U/ml de IL-2. Los resultados muestran una disminución de la proteína Bcl-2 en células tratadas con 100 U/ml de IL-2. Estos resultados sugieren que existe una interacción entre las cinasas Lck y PI3K y probablemente participen en la vía que induce mecanismos de supervivencia celular ya que la proteína Bcl-2 que está presente en las células CALO e INBL se modifica probablemente cuando hay eventos apoptóticos.

ABSTRACT

Cervical Cancer (CaCu) is the second most common disease among women worldwide. This type of cancer is a very important public health problem in Mexico in 2001 ranked first among malignant tumours in the female population. For this reason, it is important to understand the signalling pathways used by these cells to maintain their malignant phenotype, as this will allow us to develop specific inhibitors to serve as future treatments. It has been demonstrated that CALO and INBL cell lines derived from cervical cancer express the three subunits of the IL-2 receptor. Also, it has been shown that the Lck kinase is present in these tumour cell lines, and that it is associated with the beta chain of the IL-2 receptor. However, it has been reported that in normal cells the Lck kinase activates the PI3K signalling pathway to induce cell survival therefore the aim of this study was to analyze the involvement of the Lck kinase in anti-apoptotic signals in cervical cancer cell lines CALO and INBL treated with IL-2. Co-precipitation and co-localisation assays of Lck and PI3K kinases were carried out, our results show that there is an interaction between the two kinases and that they co-localise mainly in the cytoplasm of both cell lines. The presence of the Bcl-2 anti-apoptotic protein was also analyzed in cells treated with 10 U/ml and 100 U/ml of IL-2. The results show a decrease in the Bcl-2 protein in cells treated with 100 U/ml of IL-2. These results suggest that there is an interaction between Lck and PI3K kinases and it could be possible they are involved in the pathway that induces cell survival probably by regulating Bcl-2 to activate apoptotic signals.

INTRODUCCIÓN

CANCER CÉRVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que suceden en etapas de lesiones de bajo y alto grado, que evolucionan a cáncer “*in situ*”, en grado variable cuando ésta circunscribe a la superficie epitelial y luego a cáncer invasor cuando traspasa la membrana basal produciendo metástasis (1). Para llevar a cabo el proceso metastásico, las células modifican tanto las interacciones célula-célula, como célula-sustrato, todas estas modificaciones pueden exhibir cambios de todo tipo. En conjunto, las alteraciones que pueden presentar las células cancerosas incluyen modificaciones en su forma y tamaño, cambios en su apariencia, alteraciones en la distribución de la cromatina nuclear, en la forma y número de cromosomas (2). Todos estos cambios tienen una causa genética, es decir aparecen cuando ocurren alteraciones en los genes que no son corregidas por los mecanismos de reparación del material genético. Para que la célula mantenga sus características normales los genes deben funcionar de manera ordenada y regulada, si alguno de estos genes se altera en su estructura ó función ocurre su pronta detección y reparación, usualmente a través de proteínas codificadas por otros genes; así la célula se mantiene en orden. Algunas veces estas alteraciones en los genes activos no son detectadas y los genes afectados dejan de funcionar ó funcionan de manera anormal, produciendo cantidades anormales de proteínas y sin actividad fisiológica aparente, si esto continúa, la célula puede llegar a transformarse en una célula cancerígena.

El CaCu, es la segunda enfermedad más común entre las mujeres del mundo con 400,000 casos diagnosticados anualmente. En México en el año 2002, se presentaron 12,512 nuevos casos de cáncer cervicouterino, de los cuales 5,777 (46%) fueron decesos. Esta enfermedad fue la primera causa de muerte entre las mujeres mexicanas con cáncer, ocupando un 16.6% de otros cánceres. La mayoría de las mujeres que lo desarrollan tienen entre 40 y 50 años de edad. Sin

embargo, cada vez es más común ver mujeres jóvenes infectadas, que a edades de 20 y 30 años se les diagnostica CaCu (3).

La evidencia de estudios epidemiológicos realizados en todo el mundo indica claramente que la infección por el virus del papiloma humano (HPV) es la causa principal del desarrollo de este cáncer (4).

A la fecha, diferentes tipos de HPV han sido clasificados como de alto riesgo (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), los cuales pueden llegar a desarrollar cáncer en hombres y mujeres. Los virus de bajo riesgo (HPV-6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57) han sido asociados con verrugas benignas del epitelio oral o urogenital en adultos y en niños, es poco frecuente encontrarlos en tumores malignos (6).

En la actualidad, la prevención del cáncer de cérvix se basa en la detección y en el tratamiento de las lesiones pre-cancerosas, en el uso de nuevas tecnologías como la prueba de detección del HPV, en el desarrollo de vacunas profilácticas contra este virus, en la investigación de vías de señalización en proteínas que controlan la muerte celular (apoptosis) ó la supervivencia, y en el uso de citocinas como tratamiento para dicha enfermedad. Con estos descubrimientos se ofrecerán alternativas terapéuticas para combatir y prevenir el cáncer a futuro (4).

LAS CITOCINAS

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, 15-30 KDa, constituídas por 120-180 aminoácidos, que pueden secretarse ó permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de nanogramos a picogramos. Las citocinas actúan de manera autócrina al modular la actividad celular, ó de manera parácrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune. Las citocinas se secretan en respuesta a una amplia variedad de

estímulos como el estrés celular, lesiones inducidas por carcinógenos e infecciones o inflamación (7).

Se ha demostrado que la misma citocina puede ser producida por distintas células e incluso que un mismo tipo de citocina pueda realizar funciones diversas. De ahí que su clasificación en virtud de la célula madre ó de su función ha dejado de utilizarse para denominarlas con el término genérico de citocinas, que engloba a los productos secretados por las diferentes células y a todas sus funciones. Las citocinas también son mensajeros químicos u hormonas extremadamente potentes. A pesar de que actúan a concentraciones muy bajas, son muy específicas actuando sobre la célula blanco gracias a su afinidad por los receptores de membrana (8).

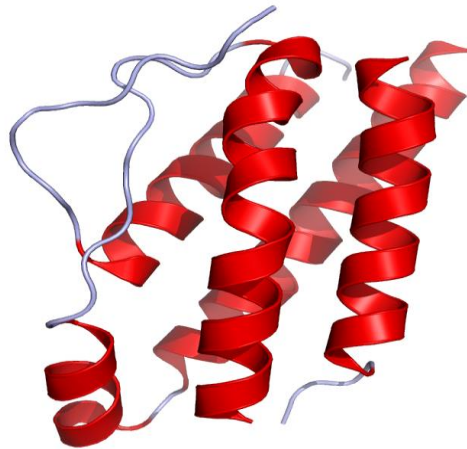
Los receptores de las citocinas son glicoproteínas de membrana formados por varias subunidades y se clasifican en receptores de clase I y II que emplean a la vía JAK-STAT, cuya función es la de transmitir la señal al interior de la célula, generándose un conjunto de reacciones en cascada en las que intervienen un gran número de proteínas. Las cinasas de la familia JAK, reclutan y activan factores de transcripción de la familia STAT, como consecuencia de estas reacciones en cadena, se inducen varios genes que son los que median las actividades biológicas de las citocinas. Además de los receptores de membrana en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citocinas semejantes a los de membrana. Estos receptores se encuentran en grandes cantidades y probablemente tienen como función regular la producción de las citocinas actuando como antagonistas de los receptores de membrana (9)(10).

Existen dos grupos de citocinas que se distinguen con base en su participación en los procesos de infección y/o inflamación. Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α) y promueven la respuesta inmune mediada por células. Las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas pro-inflamatorias son las citocinas anti-inflamatorias, por ejemplo, IL-4, IL-10 e IL-13, que son potentes mediadores de los linfocitos B. De esta manera,

el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmune activada (7).

LA INTERLEUCINA 2 (IL-2)

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15.5 kDa. Conformada principalmente por la unión de cuatro hélices alfa. El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4 en la región q26-28, 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 (11).



**Figura 1. Estructura de la Interleucina 2. Conformada principalmente por cuatro hélices alfa.
(Tomado y modificado de John C. Morris 2000)**

En condiciones normales, la IL-2 es producida principalmente por células T cooperadoras $CD4^+$ en órganos linfoides secundarios, en menor cantidad es sintetizada por células T $CD8^+$, por células naturales asesinas (NK) y por células T naturales asesinas (NKT). Bajo ciertas condiciones, la IL-2 puede ser producida en pequeñas cantidades por la activación de células dendríticas y por mastocitos(12).

La IL-2 fue la primera citocina en ser clonada junto con su receptor. Realiza funciones importantes y se considera una citosina pleiotrópica ya que interviene en el crecimiento de células T, en el aumento de la actividad citolítica de las células NK, en la diferenciación ó regulación de células T, y también participa en la activación de la muerte celular (12). La IL-2 es producida principalmente por las células T activadas y es requerida para la progresión del ciclo celular de la fase G a la fase S; activa a los macrófagos y juega un papel muy importante en la homeostasis de los linfocitos (13).

EL RECEPTOR DE LA IL-2

La IL-2 lleva a cabo sus efectos biológicos a través de la unión a su correspondiente receptor de superficie, el cual está conformado por tres subunidades: una cadena alfa (CD25), una cadena beta (CD122) y una cadena gamma (CD132). La unión de las tres subunidades con la IL-2 forma un trímero de alta afinidad, las subunidades β y γ dan lugar a un dímero de afinidad intermedia y la cadena α forma un monómero de baja afinidad (14). La interacción de la IL-2 con su receptor inicia una cascada compleja de eventos de señalización que finalmente definen el resultado biológico, este receptor se une con otras moléculas de señalización para transmitir señales intracelulares específicas (Fig. 2). La IL-2 tiene un papel importante en la protección de los linfocitos T ya que induce mecanismos anti-apoptóticos para evitar la muerte celular (15).

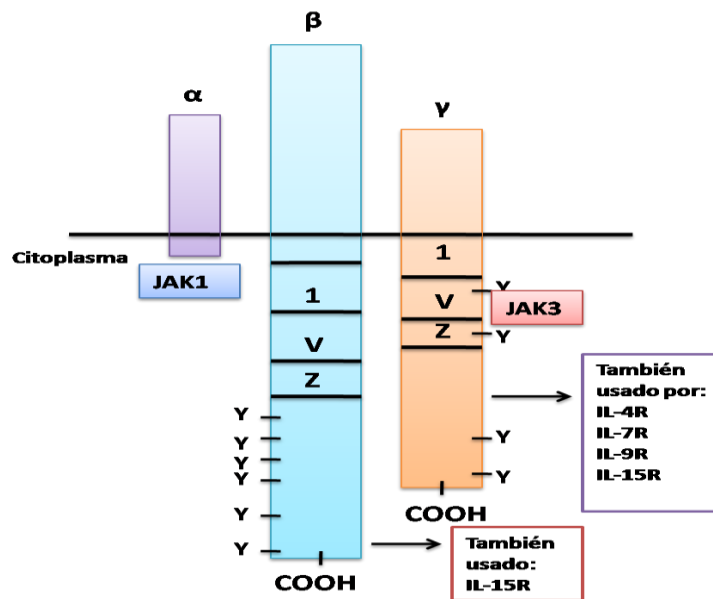


Figura. 2 Estructura de las subunidades α , β y γ del receptor de la IL-2. Cada una de las subunidades tiene regiones de unión a tirosinas utilizados por otros receptores. (Tomado y modificado de Gaffen 2001)

Cada una de estas subunidades lleva a cabo distintas funciones. La cadena α principalmente media la unión de la IL-2 con su receptor, la subunidad β también participa en la unión al ligando; ambas cadenas median la internalización y la transducción de señales a través de las vías activadas por las cinasas JAK1 y JAK3 (14). La ausencia de cualquiera de las tres cadenas lleva a la abrogación de la señal de la IL-2; por el contrario, la estimulación del complejo receptor por la IL-2 induce la activación de la Stat5 (16). La mayoría de las investigaciones se concentran en el papel que juega la IL-2 y su implicación en la proliferación celular, pero también es importante el papel que desempeña en la protección de la muerte de células inmunes mediante la inducción de mecanismos anti-apoptóticos (17).

La cadena γ es un componente esencial para los receptores de las citocinas IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, y la presencia de mutaciones en la cadena causaría severas combinaciones e inmunodeficiencias. Las subunidades β y γ , sin incluir a la cadena α , constituyen el complejo β/γ una forma del receptor de la IL-2 con afinidad intermedia, el cual está presente en células NK y T (18).

A pesar de la inhabilidad de la subunidad α para iniciar señales intracelulares, su significado fisiológico no debería ser subestimado. En ratones que presentan deleciones en la cadena α demuestran claramente que la ausencia de esta subunidad es funcionalmente equivalente a la ausencia de la IL-2. Por lo tanto, las concentraciones de la IL-2 encontradas *in vivo* no son suficientes para unir y disparar las señales por el complejo IL-2R β/γ , aunque este receptor sea totalmente competente para liberar las señales (39). En consecuencia, la expresión de la subunidad α del receptor de la IL-2 es regulada en varios tipos de células inmunes y también inducida por las IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, citocinas inflamatorias e infecciones por virus. Finalmente, la cadena α juega una función crítica en la respuesta regulatoria de la IL-2 para controlar la afinidad de su receptor por su ligando, aunque esta cadena no contribuye directamente a la transducción de señales (17).

El caballo de batalla para la señalización de la IL-2 parece ser la cadena β , debido a que casi todas las señales que han sido estudiadas tienen regiones específicas del receptor de IL-2 que se conectan a través de la subunidad β . Como otros miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, la cadena β contiene motivos conservados en la región citoplasmática próxima a la membrana llamadas Box1 y Box2, con un dominio que se sobrepone llamado Box V.

Después de que la subunidad β fue clonada, un dominio rico en serina llamado la región S, fue identificado en la región proximal a la membrana en donde se superponen Box1 y Box2 (aminoácidos 267-322); esta región es altamente significativa en la señalización. Más recientemente se ha demostrado que, Box1 y Box2 tienen sitios de interacción para las cinasas JAK, los cuales se han asociado con receptores de las citocinas. Los sitios de unión de la JAK3 en la cadena β también han sido identificados, y se localizan en las regiones que se superponen con los sitios de unión a la JAK1. Además de las JAKs, la tirosina cinasa SyK también se asocia con la región S, y esta activación es indispensable para una variedad de señales inducidas por la IL-2. La activación de la JAK ocurre inmediatamente después de la dimerización de su receptor, cuando JAK1 y JAK3

son fosforiladas en residuos de tirosina, estos residuos son localizados dentro de las asas de activación de su dominio de cinasa. La fosforilación de las JAKs causa un incremento dramático en su actividad catalítica y funcional. Uno de los blancos para la actividad de la JAK es la cola citoplasmática de la cadena β , la cual es fosforilada en residuos de tirosina, consecuentemente sirven como sitios de acoplamiento para la señalización de otras moléculas que tienen dominios de unión a fosfotirosina (Fig. 3).

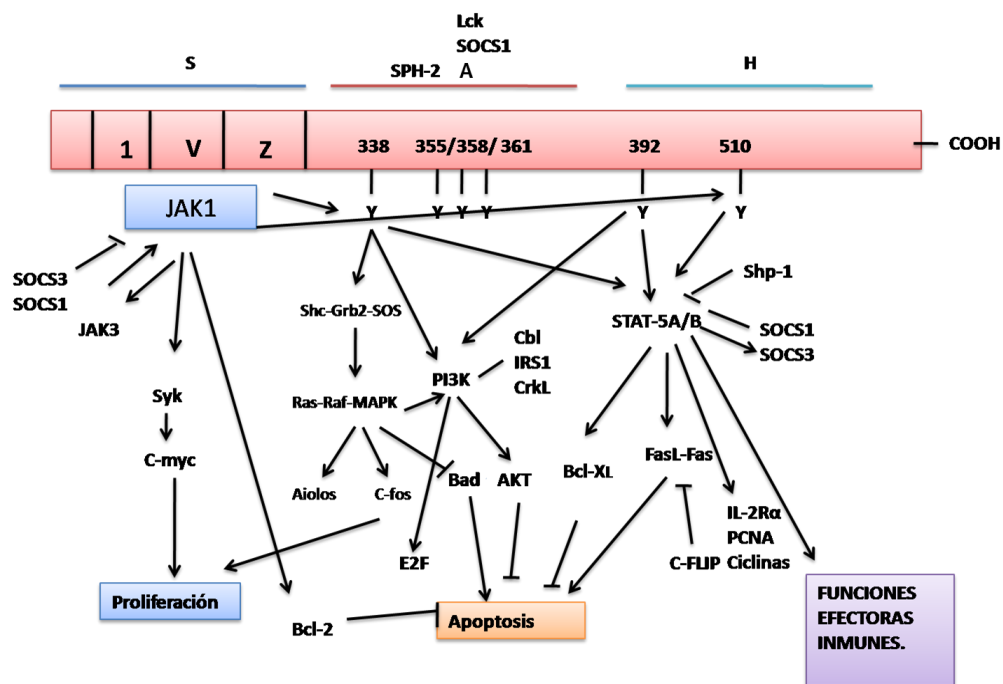


Figura 3. Sitios de acoplamiento para la señalización de otras moléculas que tienen dominios de unión a fosfotirosina del dominio citoplasmático de la cadena beta del receptor de la IL-2 (Tomado y modificado de Gaffen 2001).

La subunidad β del receptor de la IL-2 contiene otros dos dominios que son importantes para la señalización, se encuentran en la cola citoplasmática y son denominados como regiones "A" y "H" (Fig. 3). Es muy claro que la mayoría de las señales asignadas a estos subdominios dependen de residuos específicos de tirosina que se encuentran dentro de ellos. La cadena β contiene seis sitios potenciales de fosforilación en tirosina, cuatro de los cuales se encuentran en la

región “A” y dos en el dominio “H”. Dentro del dominio A, solo uno de los cuatro residuos de tirosina parece estar implicado en la señalización (Tyr 338). La tirosina 338 parece ser multifuncional, en ella pueden ligarse receptores de diversas vías de señalización, un ejemplo de ello es la vía de las MAPK que cuando se activa desencadena una serie de señales que traen como consecuencia la baja regulación de varios genes tales como *c-fos*, *Bcl2* y *Bcl-x*, estos dos últimos son mediadores anti-apoptóticos que promueven la supervivencia celular (17).

Otra de las vías implicadas es la de la cinasa de fosfatidilinositol (PI3K), una cinasa lipídica que cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) en el grupo hidroxilo D3, generando mensajeros intracelulares tales como el fosfatidilinositol PI3-fosfato (PI3P), el fosfatidilinositol 3,4-bifosfato(PI3,4P) y el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI3,4,5P). PI3K está conformada por una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad regulatoria de 85 kDa. Cuando la IL-2 se une a su receptor es capaz de activar a la PI3K induciendo la fosforilación de p85 en residuos de tirosina y por consiguiente el reclutamiento de la PI3K a la membrana celular. Esta vía de señalización está relacionada con la supervivencia y la proliferación celular (17).

Se ha encontrado que la región “A” es también un sitio de asociación para otras moléculas de señalización, aunque no han sido mapeadas especialmente en Tyr 338. Por ejemplo, la tirosina cinasa Lck (p56^{Lck}) se encuentra asociada con la subunidad β del receptor de la IL-2 en esta región, aunque aparentemente esta activación no es esencial para la proliferación en las células T. Posteriormente, en el dominio “H” se encuentran dos tirosinas que están implicadas en la señalización, Tyr-392 y Tyr 510; después de la fosforilación, estos residuos activan al factor de transcripción STAT-5, que generalmente se asocia con otros co-activadores (17).

Como se ha descrito anteriormente, la señalización iniciada por la IL-2 requiere de la cadena β y γ . Sin embargo, existen evidencias que indican que estas cadenas no actúan de igual manera para activar y coordinar vías de señalización cascada abajo. Tanto la subunidad β como la γ son miembros de la superfamilia de

receptores de citocinas, y éstos contienen motivos extracelulares conservados, así como Box 1 y Box2 en la cola citoplasmática, además la cadena γ contiene una región con homología parcial a un dominio SH2. Esta subunidad solo se une a un limitado número de señales, el primero y el más importante es la asociación de la cadena γ con la JAK3. Se ha comprobado que los residuos de tirosina en la cola de la cadena γ son necesarios para la activación de la JAK 3, ocurre en ambos Box1 y Box2 así como también en Box V (Fig.4) (17).

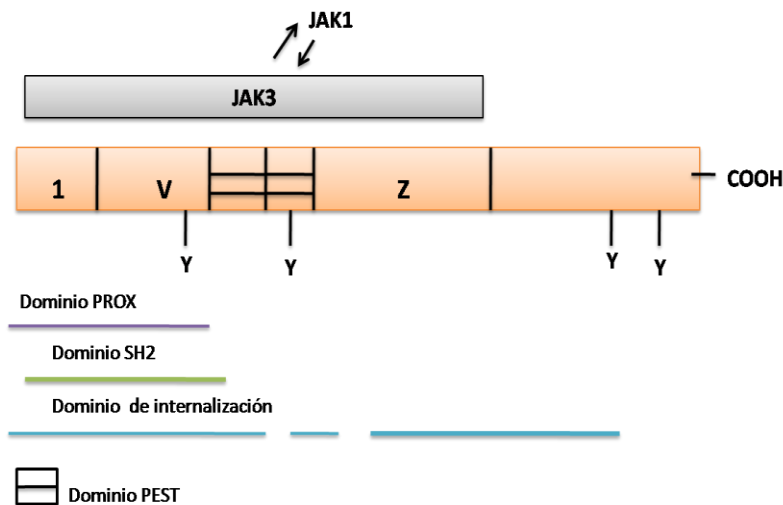


Figura 4. Asociación de la JAK3 al dominio citoplasmático de la cadena γ y del receptor de la IL-2 (Tomado y modificado de Gaffen 2001).

La mayoría de las vías de señalización conocidas están asociadas al receptor por medio de la cadena beta, generalmente a través de la fosforilación de los residuos de tirosina citoplasmáticos que reclutan varias proteínas tirosina cinasa del tipo no receptor, como las Lck, Jak y Syk. El mecanismo de reclutamiento de las cinasas se debe a la activación y estimulación con la IL-2, dando como resultado el desencadenamiento de las vías de señalización intracelular. Además, se ha demostrado que el complejo del receptor con la IL-2 (IL-2R), está relacionado con las tres vías de señalización celular diferentes que llevan a la inducción de genes como *c-fos/c-jun*, *c-myc* y *Bcl-2*. Todas estas vías son muy importantes para la

señalización proliferativa de la IL-2, ya que coopera con cada una para asegurar la transducción de la señal a una escala completa. Las vías de señalización del receptor de la IL-2 median múltiples procesos biológicos en varias poblaciones celulares como la proliferación y la diferenciación de células B y NK. Sin embargo, las células T siguen siendo el mejor blanco para la IL-2 (17).

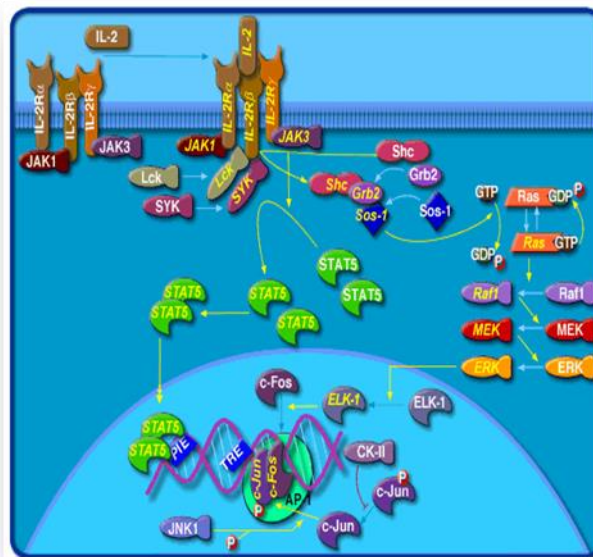


Figura.5 Vías de señalización que están asociadas al receptor de la IL-2.

La interacción de la IL-2 con su receptor induce la heterodimerización de sus componentes y posteriormente la transfosforilación y activación de las cinasas JAK3 y JAK1 asociadas al receptor. Una vez activadas, las JAK son capaces de fosforilar en tirosina a las cadenas del receptor creando sitios de unión para los dominios SH2 de los transductores y activadores de las señales de transcripción (STATs). Posteriormente, las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que ellas a su vez sean fosforiladas por las cinasas JAK. Las STATs después de ser fosforiladas, forman dímeros, se translocan al núcleo y estimulan la expresión de los genes inducibles por citocinas (Fig. 4) (19,20).

FAMILIA DE CINASAS DE TIROSINA Src

La familia consiste de ocho miembros que son Lyn, Hck, Lck, Blk, Src, Fyn, Yes y Fgr, proteínas que muestran mecanismos de regulación similares. Después de varios años de estudio, se han implicado en el control de arreglos de redes de señalización que regulan el metabolismo, la viabilidad celular, la proliferación, la diferenciación y la migración en gran variedad de linajes celulares. Estas cinasas pueden agruparse en dos subfamilias, por un lado las que están relacionadas con Lyn (Lyn, Hck, Lck, Blk); y por el otro, las relacionadas con Src (Src, Yes, Fyn, Fgr); además, existen tres cinasas relacionadas con las de la familia Src, que son Brk, Frk y Srm. Todos los miembros de la familia comparten un arreglo de dominios semejantes, poseen una región N- terminal única (50-70 residuos) de alta variabilidad entre los miembros de la familia, seguido por aproximadamente 50 aminoácidos que representan el dominio 3 de homología con Src, la cual dirige la asociación específica con motivos ricos en prolina relacionados con el consenso PXXP. En seguida se encuentra una región de 100 aminoácidos que presenta el dominio 2 de homología Src, que permite la interacción con motivos de la fosfotirosina. Los miembros de esta familia muestran una mayor afinidad por la secuencia consenso PYEEI. El último dominio corresponde al de cinasa (aproximadamente 300 residuos), o de homología Src 1, responsable de la actividad enzimática. El papel de las cinasas de la familia Src en el desarrollo y progresión del cáncer aún no se conoce completamente, apenas se están empezando a estudiar las múltiples vías en las que participan las cinasas de la familia Src, sus diversos sustratos y los productos de la expresión de genes que son regulados por la actividad de estas cinasas. Esto deberá conducir a un mejor entendimiento de cómo las numerosas proteínas que interactúan con c-Src se relacionan entre sí en las vías moleculares que llevan a la transformación y progresión malignas (20).

LA PROTEÍNA TIROSINA CINASA ESPECÍFICA DE LINFOCITOS (Lck)

La familia de las cinasas Src juega un papel clave en la transducción de señales de muchos receptores de superficie celular que llevan a cabo diversas funciones celulares tales como el crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia. En células T, la cinasa Lck es vital en la propagación y modulación de la señalización del receptor de células T (TCR). El TCR está compuesto por seis cadenas polipeptídicas, que se asocian formando dímeros. La especificidad del reconocimiento del antígeno está determinada por las cadenas TCR α y TCR β , derivadas de un proceso de reordenación génica. Estas cadenas forman un heterodímero, que se une directamente al péptido unido a la molécula del MHC. Una minoría de células T presenta un receptor compuesto por las cadenas TCR γ , similar a TCR β , y TCR δ , con gran homología en su secuencia al TCR α . La comunicación con las moléculas señalizadoras en el interior de la célula se realiza mediante las cadenas de la CD3, que se encuentran formando dímeros: $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$. Estos péptidos contienen unas secuencias características, denominadas ITAM (motivos de activación basados en tirosina), una en cada cadena γ , ϵ y δ , y tres en las cadenas ζ . Estas tirosinas son fosforiladas rápidamente por la tirosina cinasa Lck, de la familia de proteínas Src (activada a su vez, por la fosfatasa CD45), tras la unión del TCR al antígeno. Al fosforilarse, esos residuos de tirosina actúan como sitios de unión para las proteínas que contienen secuencias de tipo SH2 (dominios de homología a Src). La fosforilación de los ITAMs recluta a la proteína cinasa asociada a la cadena zeta 70 (Zap 70), la cual requiere adicionalmente la fosforilación por la Lck para ser activada. La Zap70 a su vez fosforila a otras proteínas en la cascada de señalización de la TCR, lo cual eventualmente lleva a la activación de células T (24)

Con el fin de mantener un sistema inmunológico funcional, los linfocitos necesitan a los receptores de superficie celular para comunicarse con su entorno y también para poder interpretar las señales ambientales de una manera apropiada. Algunas de las moléculas claves en la superficie de las células T implicadas en la interpretación de estas señales ambientales son el receptor de células T (TCR) y

la asociación de componentes de transducción de señal, CD3, CD4 y CD8. El compromiso del TCR resulta en la activación de una cascada de señalización que en combinación con señales de otras moléculas co-estimuladoras y receptores de citocinas mandan la respuesta a la célula. Dos de las primeras moléculas que son activadas río debajo del TCR son las cinasas de la familia Src, Lck(p56^{lck}) y Fyn (p59^{fyn}) (23).

La cinasa Lck se expresa principalmente en células T y NK. Esta proteína es una de las más importantes para la señalización y activación del receptor de células T. Su activación provoca la fosforilación de varias subunidades de transductores de señal del complejo TCR, llevando a la activación de segundos mensajeros, como la fosfolipasa C, la vía del fosfatidilinositol, la Rho GTPasa, la vía de las MAP cinasa, y varios factores de transcripción. Esta proteína juega un papel central en la maduración de linfocitos en el timo, y la activación y proliferación de células T maduras (22).

La cinasa Lck es una proteína con peso molecular de 56 kDa, se encuentra anclada a la membrana plasmática vía residuos de palmitoilación y miristoilación en el amino terminal (N-terminal), está conformada de un solo dominio SH2 y SH3 seguido por un dominio catalítico de tirosina cinasa (SH1) y de un extremo carboxilo terminal (C-terminal) de regulación negativa Figura 5 (25).

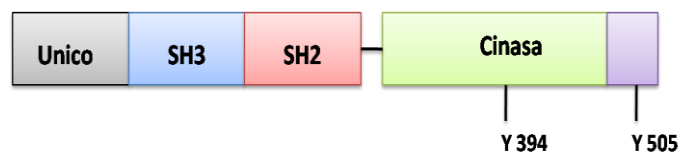


Figura 6. Estructura de los dominios de la cinasa Lck (Tomado y modificado de Gaffen 2001).

La estructura del dominio de esta molécula indica que no solo tiene funciones enzimáticas de tirosina cinasa, sino también sirve como proteína adaptadora, facilitando el ensamble de complejos macromoleculares vía interacción a través de sus dominios SH2 y SH3. En efecto, diferentes complejos de proteínas co-

inmunoprecipitan con las cinasas Lck y Fyn, la función de adaptadora es importante para algunos aspectos de la señalización y activación de las células T (23).

La cinasa Lck es regulada a través de dos residuos de tirosina; uno dentro del asa de activación del dominio catalítico, tirosina 394 (Y394), y el otro en el carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína, tirosina 505 (Y505). Cuando se fosforila el residuo de la tirosina 505, interactúa con el dominio SH2, la molécula adopta una conformación cerrada y como consecuencia un estado de actividad bajo. En contraste, la autofosforilación del residuo de la tirosina 394 dentro del asa de activación, induce a la proteína a adoptar una conformación abierta con una actividad enzimática significativa. Como otros miembros de la familia Src, la interconversión de la Lck es regulada por otras proteínas, en particular, las cinasas Csk y CD45. Además, la fosfatasa CD45 inhibe la actividad de la Lck a través de la desfosforilación de la Y394. (26)

Lck Y OTRAS ENFERMEDADES

Estudios previos basados en métodos bioquímicos e inmunocitoquímicos han revelado que la actividad de Lck es importante en la patogénesis de algunas infecciones crónicas en humanos. También se ha demostrado que la CD4 está asociada a la cinasa Lck, la cual es importante en la patogénesis del VIH. Por otro lado, la cinasa Lck está implicada en otras infecciones incluyendo lupus eritematoso sistémico (LSE), lepra y enfermedades del corazón (26).

Recientes reportes clínicos describen niveles de regulación baja de la Lck en el hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, sugiriendo así una asociación de la Lck con este desorden. Se ha reportado que esta cinasa es un regulador clave de la morfología de las neuronas y además está implicada en los procesos eléctricos (27).

La mayoría de las muertes por cáncer se deben al proceso de metástasis que es muy resistente a las terapias convencionales; por ello, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a las células metastásicas es importante. Muchos de los

antígenos tumorales reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) se han identificado en la última década. La Lck es esencial para el desarrollo y función de las células T, se expresa en forma aberrante en cáncer de colon, carcinoma de pulmón y en cáncer de próstata. Aunque el papel biológico de la Lck en células de cáncer aún no ha sido completamente aclarado, varias líneas de evidencia sugieren que contribuye al proceso de transformación neoplásica (28).

La PI3K

Las proteínas tirosina cinasas dentro de las cuales se encuentra la PI3K, son reguladores importantes de las rutas de transducción de señales intracelulares que median el desarrollo y la comunicación celular. Los lípidos fosforilados por las cinasas son producidos a partir de algunos componentes lipídicos de la membrana durante los eventos de señalización y contribuyen al reclutamiento y activación de varios de los componentes de señalización. La fosforilación de fosfatidilinositol en la posición D-3 del anillo de inositol por la enzima PI3K en respuesta a estímulos celulares, como factores de crecimiento e insulina, coordina una serie de eventos que permiten el crecimiento celular, la entrada al ciclo celular, la migración y la sobrevivencia celular (32).

Las PI3K están divididas en tres clases, de acuerdo con sus estructuras, especificidad de sustratos y formas de regulación.

Las PI3K de clase I son enzimas heterodiméricas reguladas por receptores que fosforilan, preferentemente, fosfatidilinositol -4, 5 bifosfato. Sus subunidades catalíticas de 1.070 residuos interactúan con Ras-GTP por medio de un dominio de unión a Ras cerca del N-terminal. Sus subunidades reguladoras son proteínas adaptadoras que conectan las subunidades catalíticas con los acontecimientos de señalización corriente arriba.

Las PI3K de clase II son monómeros de 1.650 residuos caracterizados por un dominio C-terminal C2 que parece no unir a Ca^{2+} . Ellas fosforilan preferentemente PtdIns y PtdIns -4-P. Dado que no poseen adaptadores, no se conoce la manera en que se controlan las PI3K de clase II.

Las PI3K de clase III, que tienen solo una isoforma conocida, fosforilan sólo a las PtdIns. Es un heterodímero con una subunidad catalítica de 887 residuos y otra adaptadora conocida como p150. La PI3K de clase III está activa de forma constitutiva, esto es, no esta regulada y en consecuencia, se piensa que es la proveedora celular principal de PtdIns-3-P, cuyo nivel permanece constante ante la estimulación celular. Figura 6.

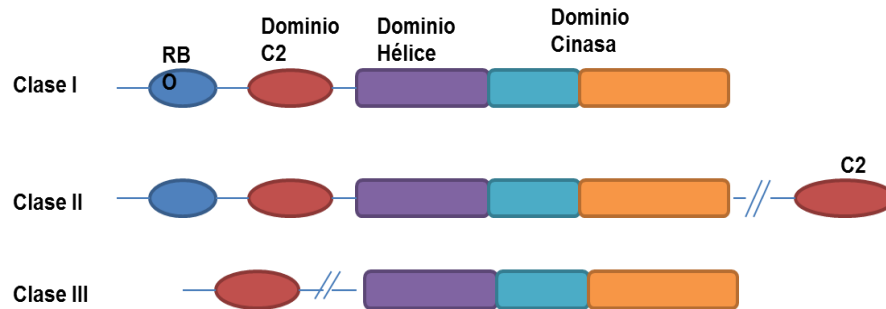


Figura 7. Estructura de los dominios de las tres clases de PI3K (Tomado y modificado de Voet 2006)

La PI3K de la clase I es una proteína heterodimérica que contiene una subunidad catalítica p110 y una reguladora p85. El sustrato preferido para esta clase de enzimas es PI (4,5)P₂ la activación de la PI3K da como resultado la producción de PI(3, 4, 5)P₃. Existen varias proteínas que tienen dominios que se enlazan a los fosfoinosítidos D3 fosforilados. Estas proteínas se localizan en el citosol de las células no estimuladas, pero en respuesta a la fosforilación de lípidos se acumulan en la membrana donde se activan y pueden iniciar varias respuestas como son la polimerización de actinas, el ensamble de complejos de señalización y el encendido de cascadas de proteínas cinasas. Las proteínas de señalización con dominios de homología a pleckstrina (PH) se acumulan en los sitios de activación PI3K enlazándose directamente al PIP₃. De estas proteínas, son de interés particular la proteína cinasa de serina/treonina PKB/Akt y la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1). Se ha establecido el siguiente modelo: la activación de los receptores con actividad de tirosina cinasa o RTK permite la producción de PIP₃, PKB/Akt interactúa con este último fosforiándose, lo que causa su translocación a la membrana interna. La interacción del dominio PH de

PKB/Akt con el 3fosfoinosítido induce cambios conformacionales en PKB/Akt, lo que permite la exposición de sus dos sitios principales de fosforilación. El dominio PH de la proteína también puede mediar la proximidad entre PKB/Akt y PDK1, esta última se cree que se activa constitutivamente y que fosforila a PKB/Akt en la treonina 308, lo cual estabiliza el bucle de activación en una configuración activa. La inactivación de la ruta de señalización dependiente de PI3K es a través de la desfosforilación de los fosfoinosítidos por la fosfatasa PTEN, la cual está mutada en muchos cánceres, lo que permite la activación constitutiva de la PI3K (29).

LA FAMILIA Bcl-2

El gen Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue descubierto por primera vez en el linfoma humano de células B. La familia Bcl-2 contiene los principales reguladores intracelulares de la apoptosis que se encuentran asociados a diferentes membranas celulares como el retículo endoplásmico, la mitocondria y el núcleo. Los miembros de la familia Bcl-2 son capaces de alterar el funcionamiento de estas membranas, cambiando el potencial de membrana y facilitando la salida o la entrada de iones. Pueden formar canales iónicos o pueden influir en la actividad de las proteínas que forman un canal ya existente (30).

La familia Bcl-2 contiene hasta el momento 34 miembros que se pueden dividir en tres grupos de acuerdo a sus estructuras:

Grupo I -Es el grupo que conserva los 4 dominios denominados de homología a Bcl-2 (BH):BH1;BH2;BH3;BH4.

Grupo II - Es el grupo que contiene solo 3 dominios: BH1; BH2; BH3.

Grupo III - Es el grupo que tiene solo el dominio BH3.

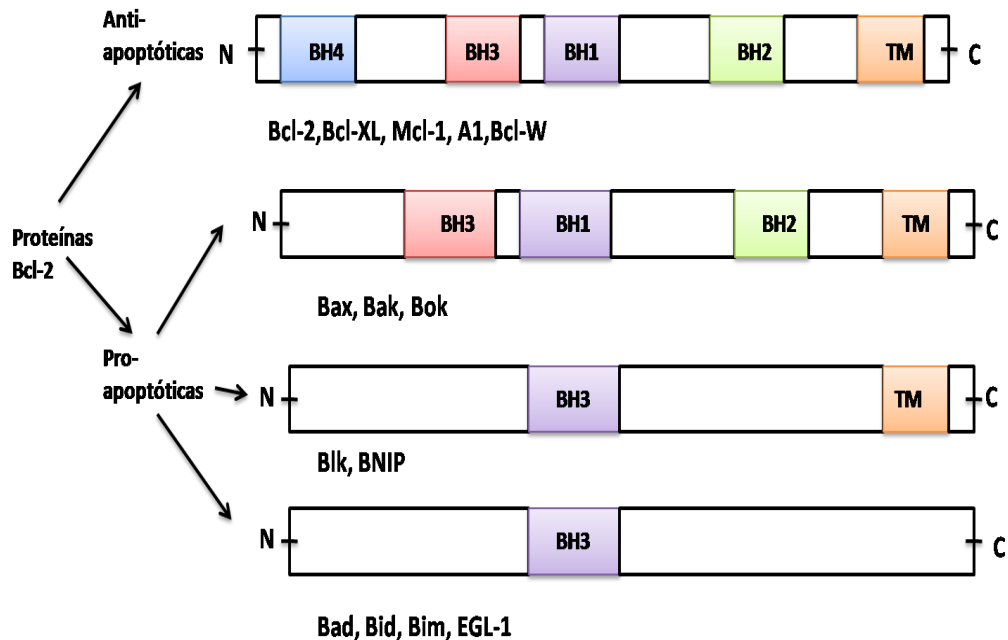


Figura 8. Familia de Bcl-2 conformada por treinta y cuatro miembros que se dividen en tres grupos de acuerdo a sus estructuras (Tomado y modificado de Rus 2005).

Parece que existe un balance entre los factores pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, que controla la liberación del citocromo c de la mitocondria. Se describen dos mecanismos: uno por el cual se altera la permeabilidad del poro, y otro independiente de la permeabilización del mismo. (30)

a) Los factores pro-apoptóticos determinan la apertura del poro de dos maneras:

- Interaccionando directamente con componentes de la transición de la permeabilidad (PT), como es el caso de Bax que se asocia a la adenina nucleótido translocasa (ANT) o al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).
- Regulando la actividad de los factores anti-apoptóticos, formando compuestos heterodiméricos de tipo Bcl2-Bax o Bcl2-Bak, tras una dimerización.

b) La vía independiente de la permeabilización del poro PT implica a los miembros de la familia Bcl-2 como: Bak, Bax, Bcl-XL e incluso el Bcl-2, por dimerización,

forman poros en la membrana mitocondrial, liberando factores mitocondriales implicados en apoptosis.

Además, los miembros anti-apoptóticos secuestran a los pro-apoptóticos, uniéndose al dominio BH3, e impiden su activación, como es el caso del Bax y Bak.

Aunados a sus efectos mitocondriales, el Bcl-2 controla de forma indirecta la activación del apoptosoma. Los representantes de la familia más importantes y mejor estudiados son: Bcl-2 y Bcl-X (30).

Proteína Bcl-2

El Bcl-2 fue el primer proto-oncogen asociado con procesos malignos de las células B. Durante la maduración de las células B puede ocurrir una translocación cromosómica 14,18 en el gen Bcl-2, que provoca un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática, que a su vez induce inhibición de la apoptosis en células B y determina la supervivencia de la célula transformada.

Debido a su localización en la cara externa de la membrana mitocondrial, la proteína Bcl-2 puede inhibir la liberación de factores apoptóticos desde la mitocondria, tales como el citocromo c; Bcl-2 es una proteína antioxidante que podría inhibir la apoptosis provocada por agentes oxidantes y por las propias especies reactivas del oxígeno (ROS). Puede bloquear la acción pro-apoptótica de otros miembros de la familia Bcl-2, formando dímeros con ellos. Puede secuestrar e inhibir la acción de algunos factores citoplasmáticos imprescindibles para la posterior activación de las caspasas efectoras. Debido a su ubicación en las membranas del retículo endoplasmático, impide la elevación del Ca^{2+} intracelular que se da durante la apoptosis. Se puede asociar al factor de activación de apoptosis (Apaf-1) impidiendo la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (31).

ANTECEDENTES

El CaCu es la segunda causa de muerte en el mundo (27). Este tipo de cáncer es un problema de salud pública muy importante en México, en el 2001 ocupó el primer lugar entre los tumores malignos en la población femenina (33). Por lo que es de gran importancia conocer las vías de señalización que utilizan las células de carcinoma de cérvix para mantener su fenotipo maligno, ya que esto nos permitirá desarrollar inhibidores específicos dirigidos hacia las cinasas que participan en la sobrevivencia celular y que sirvan como tratamiento a futuro. Se ha demostrado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix, establecidas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer a partir de biopsias de pacientes mexicanas, CALO e INBL expresan las tres subunidades del receptor de la IL-2 (38). Además, se ha analizado la activación de la vía JAK-STAT en respuesta a la unión de la IL-2 a su receptor. Se sabe que una de las primeras cinasas en activarse es la JAK3, y que ésta a su vez activa a las STATs. Las líneas celulares responden al tratamiento con 10 U/ml de la IL-2, aumentando su proliferación. También se ha demostrado que la cinasa Lck está presente en estas líneas celulares tumorales y que se asocia con la cadena beta del receptor para la IL-2 y con la STAT-5 (39). En linfocitos normales se ha demostrado que la cinasa Lck se asocia con la cadena beta del receptor para IL-2, que es un factor de proliferación de las células T, y que Lck se activa de manera independiente de las JAKs, y es capaz de activar a STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas. (Referencias) Por lo tanto, es de gran interés analizar si la cinasa Lck expresada en las líneas tumorales se comporta de manera similar a la cinasa encontrada en linfocitos normales para inducir señales anti-apoptóticas, ya que esto permitirá entender los mecanismos de señalización en las células tumorales y compararlos con las células normales para desarrollar tratamientos alternativos para el carcinoma de cérvix.

HIPÓTESIS

La cinasa Lck presente en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL formará un complejo con la cinasa PI3 (PI3K) en respuesta a la IL-2 para inducir señales anti-apoptóticas mediadas por la Bcl-2, de manera similar a lo que ocurre en linfocitos normales.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de la cinasa Lck en la inducción de procesos anti-apoptóticos (vía intrínseca) en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la interacción entre la cinasa Lck y la cinasa PI3K.
2. Determinar la colocalización de la cinasa Lck y la cinasa PI3K
3. Analizar la presencia y el estado de activación de la proteína Bcl-2.

METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL y la línea de células T leucémicas Jurkat. Estas células permanecen criopreservadas en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza UNAM.

Como fuente de la IL-2 se utilizó IL-2 recombinante (Sigma Chemical Co. USA) (10,000UI).

Las células CALO, INBL y Jurkat se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A.) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) previamente desactivado (Hyclone U.S.A.), todos los cultivos se mantuvieron en incubadora (Scientific, Division of Mallincrodt, Inc. U.S.A.) en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C y humedad saturada.

EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

Se extrajeron 20ml de sangre periférica humana con una jeringa la cual contenía heparina (anticoagulante), la sangre se agregó a un tubo cónico y se centrifugó a 1500rpm por 5 min, se retiró el plasma sin llevarse las células. Se agregó RPMI solo (la misma cantidad de plasma retirado), se llevo a centrifugar, este paso se repitió 3 veces. Posteriormente, la sangre se agregó a unos tubos con ficoll (3ml de ficoll por cada 5ml de sangre), se centrifugaron 30 min a 1500 rpm. Los linfocitos se recolectaron y se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A.) suplementado con 10% SFB previamente desactivado (Hyclone U.S.A.) y 10U de la IL-2. Todos los cultivos se mantuvieron en incubadora (Scientific, Division of Mallincrodt, Inc. U.S.A.) en un ambiente al 5% de CO₂, 37°C de temperatura y humedad saturante.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE LAS CINASAS Lck Y PI3K

Se sembraron 3×10^6 células por cada línea, se les adicionó medio RPMI al 0.5% con SFB por 48 h. Una vez pasado este tiempo las células se incubaron con medio sólo por 15'; posteriormente fueron tratadas con la IL-2 recombinante durante diferentes tiempos: 10, 20 y 30 min, se agregó 1mL de buffer de lisis, se despegaron las células con gendarme, se colocó la solución en tubos Eppendorf y se incubó por 15 min en hielo. El lisado se centrifugo a una velocidad de 12000 rpm. durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry (BioRad).

INCUBACIÓN DE LAS ESFERAS DE AGAROSA

En tubos Eppendorf se colocaron 25µL de esferas de agarosa conjugadas con proteína A (Gibco) y se lavaron 2 veces con buffer de lisis (500µL). Una vez lavadas se agregaron 1.5µL de anticuerpo (Ab) específico para la Lck o la PI3K (Santa Cruz Biotechnology, USA), o para la proteína de interés, más 40µL de buffer de lisis y se incubó por 1 hora a 4°C con agitación. Después de este tiempo, las esferas con anticuerpo unido se lavaron y se incubaron con los lisados de células expuestas a la IL-2, o células sin exponer como control negativo durante 3 h a 4°C con agitación constante. Una vez transcurrido ese tiempo, las esferas se lavaron con buffer de lisis de 3-5 veces, y se agregaron 20µL de buffer de Laemmli a cada tubo, se hirvieron por 5 min y se guardaron a -20°C.

ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

La electroforesis SDS-PAGE se realizó de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador fue de 4.5%. Las concentraciones finales en el gel separador fueron de 0.375 M Tris-HCl (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) (pH 8.9 y 0.1% p/v de SDS, y la concentración de acrilamida a usar fue de 10% p/v). Los geles se polimerizaron por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) y tetrametiletileno-diamina (TEMED), (Sigma Chemical, Co. U.S.A.) para el gel separador, ó 0.1% de cada catalizador

en el gel concentrador. El buffer de corrida (pH 8.3) contenía 0.025 M de Tris y 0.192 M de glicina.

La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 85V por 2 h en una cámara vertical (ATTO).

WESTERN-BLOT

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (según el método de Kyhse- Andersen) en un aparato de transferencia semiseca, a corriente constante de 125 mA durante 1.5 h utilizando para este fin una solución amortiguadora de transferencia (Tris 0.033M, Glicina 0.5M, SDS 0.002M, Metanol 20%). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloqueó con albúmina bovina al 3% (p/v) en buffer TBS durante toda la noche a 4°C.

Todas las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-fosfotirosina (1:1000), conjugado con peroxidasa durante 1.5 horas. Una vez transcurrido el tiempo de la incubación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween por 5 min cada una, y las proteínas se revelaron utilizando quimioluminiscencia (Pierce, USA).

ELUCIÓN DE ANTICUERPOS

Esta técnica se utiliza para probar anticuerpos diferentes sobre una misma membrana, en este caso se utilizó para determinar la identidad de las proteínas fosforiladas en tirosina. Se lavó la membrana 1 vez con TBS, se incubó con la solución ácida de elución (SDS y Glicina) durante 1 h a 70-80°C, se lavó 1 vez con TBS-Tween por 15min con agitación constante, se lavó 3 veces con TBS-Tween por 5 min y se bloqueó toda la noche con albúmina de bovino (BSA) al 3%.

Una vez hecho, la membrana se incubó con otros anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron anti-Lck y anti-PI3K, la dilución de estos anticuerpos fue de 1:1000, se incubaron por 2 h, se lavaron las membranas con TBS-Tween 5 veces por 5min cada una. Estas membranas se incubaron con un anticuerpo secundario

anti-conejo conjugado con HRP (Zymed) por 1 hora a una dilución de 1:6000 en TBS-Tween-BSA 1%. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron 5 veces con TBS-Tween por 5min. El revelado de las proteínas se hizo por quimioluminiscencia.

TÉCNICA DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células CALO e INBL se cultivaron en porta objetos con medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. U.S.A.) suplementado con 0.5% de SFB durante 72 hrs. Las células fueron estimuladas con 10U de la IL-2 a diferentes tiempos: 35 seg, 5 y 15 min. Se lavaron 2 veces con PBS-SFB al 5%, se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 min y se lavaron dos veces con PBS. Se permeabilizaron con tritón X-100 por 5 min en hielo a una concentración del 2%.

Las células se bloquearon con PBS mas SFB al 5% durante 30 min, se lavaron una vez con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario (Ab) específico para la Lck (Santa Cruz Biotechnology, USA) por 1 h en una solución de PBS-SFB al 3% en hielo, se lavaron 2 veces con PBS, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con FITC (1:300) y se incubaron 30 min a 4⁰C; se lavaron con PBS-SFB, enseguida se les agregó el segundo anticuerpo primario (Ab) específico para la PI3K (Santa Cruz Biotechnology, USA), se incubaron por 1 h a 4⁰C. Se agregó el anticuerpo secundario Texas Red conjugado con estreptavidina (ZYMED) (1:300) por 30 min a 4⁰C. Las células se lavaron dos veces con PBS, se montaron en porta objetos de vidrio en el medio de montaje bálsamo de Canadá y se sellaron con barniz.

EXTRACCIÓN MITOCONDRIAL Y CITOPLASMÁTICA.

Se sembraron 1×10^6 células por cada línea (CALO, INBL y JURKAT), se les adicionó medio al 0.5% con SFB por 48 h. Una vez pasado este tiempo las células se incubaron con medio sólo por 15 min; posteriormente, se trataron con la IL-2 recombinante durante diferentes tiempos: 10, 20 y 30 min. Se agregó 1mL de medio RPMI a las cajas con células, se cosecharon con gendarme y se pusieron en un tubo Eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se lavaron con

500µl de PBS, posteriormente se agregaron 300µl de buffer de Digitonina (Digitonina y PBS 1X), se resuspendió y se incubó 5 min a 37⁰C, se centrifugó durante 10 min a 4⁰C (5-10000rpm), el sobrenadante es el citosol. El botón se resuspendió en 100µl de buffer mitocondrial (10mM de Tris, 150mM de NaCl, 2mM de EDTA, 0.2% de Triton X100, 0.3% de NP40 y 0.3% de PMSF), se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min a 4⁰C. El sobrenadante es la fracción mitocondrial. Estas fracciones se separaron mediante SDS-PAGE y la presencia de la Bcl-2 se analizó mediante inmunoblot.

RESULTADOS

Presencia de las cinasas Lck y PI3K en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL.

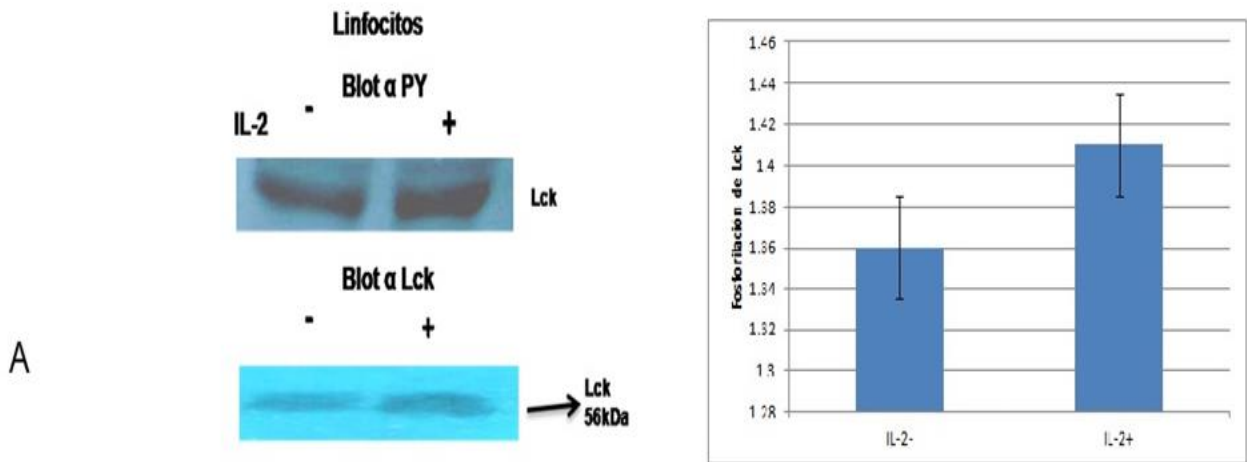
En linfocitos normales, se ha demostrado que la cinasa Lck participa en la activación de señales anti-apoptóticas, por lo que es de nuestro interés analizar si la cinasa Lck presente en las células CALO e INBL activa señales anti-apoptóticas a través de la vía de PI3K en respuesta a la IL-2. Para determinar la presencia de Lck y PI3K y analizar su activación en respuesta a la IL-2, realizamos la inmunoprecipitación de estas cinasas a partir de lisados totales, y posteriormente se analizó mediante inmunoblot. Las células CALO e INBL fueron incubadas durante 24 horas con la tirfostina AG-490 para inhibir a la cinasa JAK3, esto con la finalidad de observar si en ausencia de esta cinasa se activa la vía que involucra a la cinasa Lck para inducir señales anti-apoptóticas, tal como sucede en los linfocitos normales.

Como control positivo se realizó un inmunoblot de lisados totales de linfocitos extraídos de sangre periférica de donadores sanos, los cuales se cultivaron en ausencia o en presencia de IL-2. En la figura 1A, en los linfocitos tratados con IL-2 se observa un aumento en la fosforilación de la cinasa Lck en comparación con los linfocitos que no fueron tratados, en los que se observa una fosforilación basal de la cinasa Lck. Para corroborar la presencia de la cinasa Lck se eluyeron los anticuerpos anti-fosfotirosina y se realizó un inmunoblot anti-Lck. Se observa una banda en el peso molecular de 56 kDa que corresponde a la cinasa Lck, también se realizó un estudio densitométrico para corroborar que hay un aumento en la fosforilación cuando los linfocitos son tratados con la IL-2 (figura 1A).

Para analizar la interacción de las cinasas Lck y PI3K se realizó la co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Las células fueron incubadas en presencia de IL-2 durante diferentes tiempos y se llevó cabo la inmunoprecipitación de Lck o PI3K con anticuerpos específicos para cada una de ellas.

En la figura 1B se muestra la inmunoprecipitación de la cinasa Lck a partir de lisados totales de ambas líneas celulares. Para analizar la co-inmunoprecipitación se realizó el inmunoblot con anticuerpos específicos anti-PI3K, se observa una proteína con un peso molecular de 85 kDa que corresponde al peso de la cinasa PI3K

Posteriormente se llevó a cabo la elución de anticuerpos en medio ácido y la misma membrana se incubó con el anticuerpo anti-Lck. En la figura 1C se muestra un inmunoblot en donde se detectó la presencia de Lck, cuyo peso molecular es de 56kDa, en ambas líneas celulares CALO e INBL. Se realizaron ensayos densitométricos para corroborar los resultados en ambos experimentos.



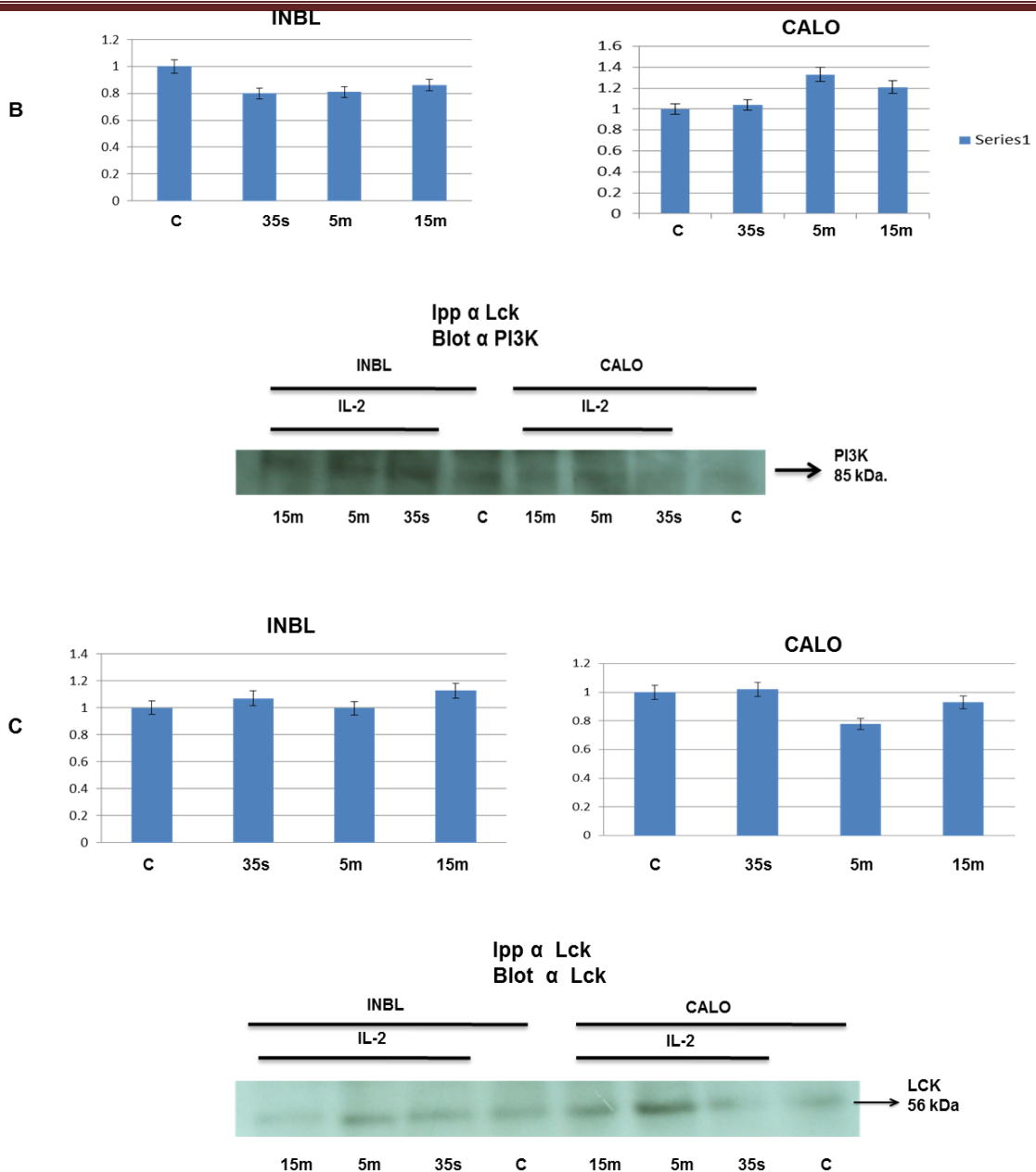
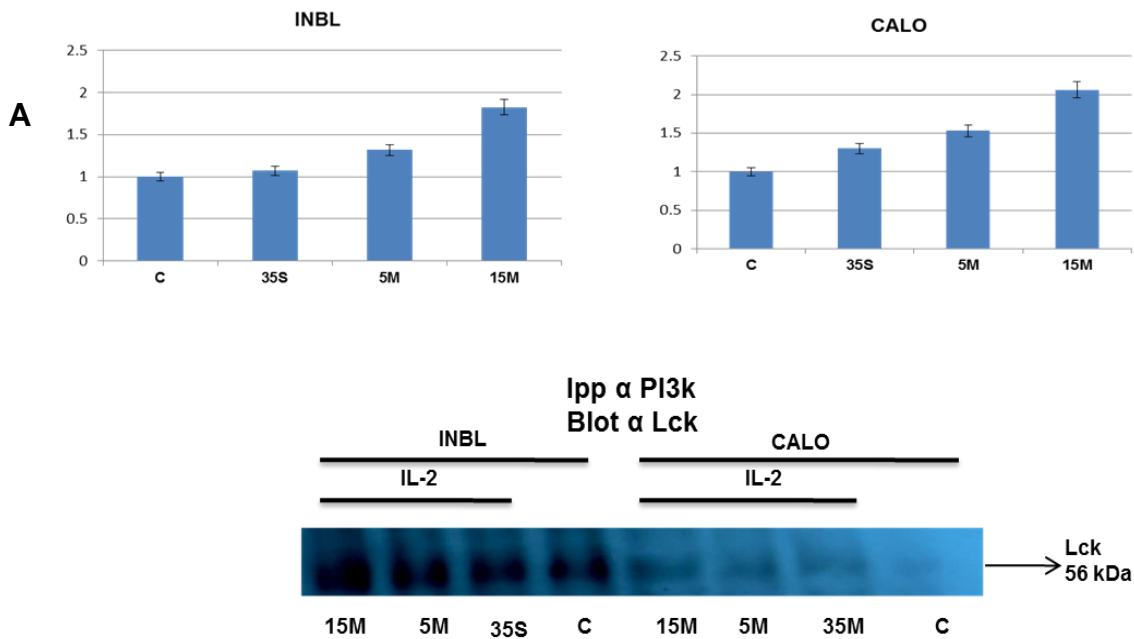


Figura 1. Interacción entre las cinasas Lck y PI3K en las líneas celulares CALO e INBL. (A) Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica, se estimularon con 100 U/mL de la IL-2 y se inmunoprecipitó la cinasa Lck. Las células CALO e INBL fueron tratadas con un inhibidor para la JAK3 (AG490) durante 24 h. Posteriormente se trataron con IL-2 (10 U/mL) durante 35 segundos, 5 y 15 minutos. Se obtuvieron los lisados celulares, se inmunoprecipitó Lck, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se llevó a cabo un inmunoblot anti-PI3K (B). Posteriormente, los anticuerpos se eluyeron en medio ácido y se incubó nuevamente la membrana con anticuerpos anti-Lck (C). Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia. Se realizaron estudios densitométricos para ambas líneas celulares.

Para corroborar la interacción de las dos cinasas se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la PI3K a partir de lisados de ambas líneas celulares estimuladas con IL-2 y el inmunoblot con anticuerpos específicos anti-Lck. En la figura 2A se observa una banda que corresponde al peso molecular de Lck (56 kDa) cuando se inmunoprecipita la PI3K. Además, se observa mayor cantidad de la cinasa Lck en la línea celular INBL en comparación con la línea celular CALO. Para determinar la presencia de PI3K, los anticuerpos se eluyeron en medio ácido y se incubó nuevamente la membrana con el anticuerpo anti-PI3K, en la figura 2B se muestra una banda en el peso molecular de 85 kDa que corresponde a la cinasa PI3K.



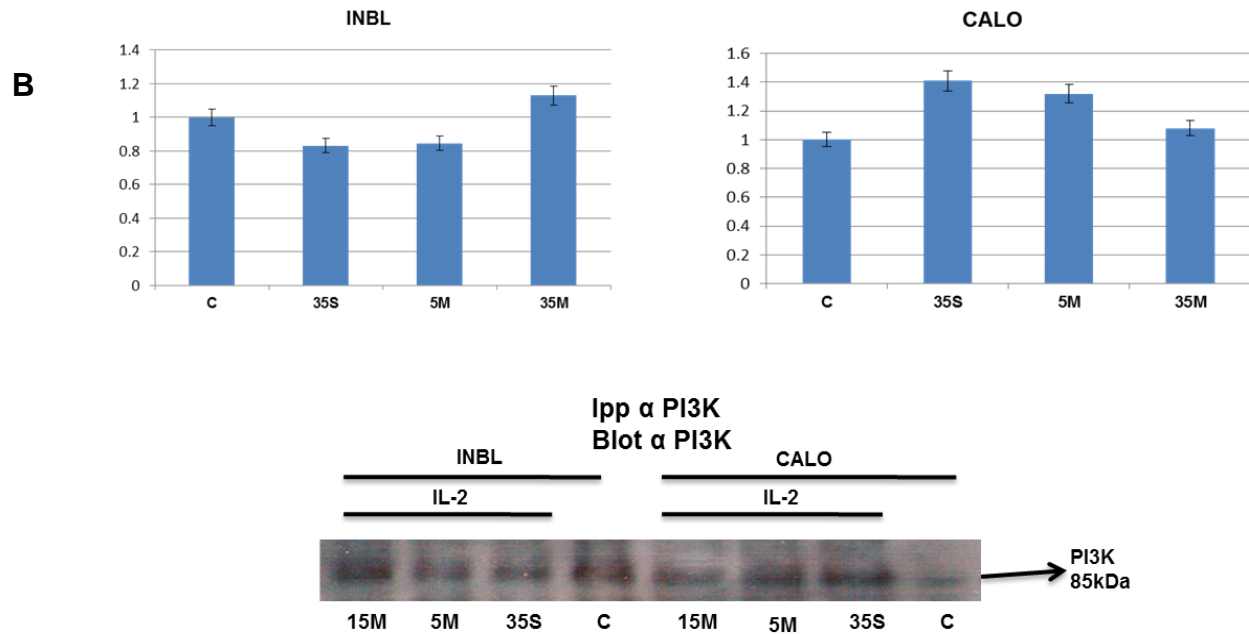


Figura 2. Interacción entre las cinasas PI3K y Lck en las líneas celulares INBL y CALO. Las células fueron tratadas con un inhibidor para la JAK3 (AG490) durante 24 h. Posteriormente se trataron con la IL-2 (10U/ml) a diferentes tiempos (35 segundos, 5 y 15 minutos). Se obtuvieron los lisados celulares, se inmunoprecipitaron con la PI3K, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se llevó a cabo un inmunoblot anti-Lck (A). Posteriormente, los anticuerpos se eluyeron en medio ácido y la membrana se incubó nuevamente con anticuerpos anti-PI3K (B). Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia. Se realizaron estudios densitometricos para ambas líneas celulares.

Co- localización de las cinasas Lck y PI3K en líneas de carcinoma de cérvix.

Con la finalidad de corroborar la interacción entre las cinasas PI3K y Lck se realizaron ensayos de co-localización por medio de microscopia confocal. En la Figura 3 se observa una micrografía de células CALO que fueron tratadas y no tratadas con la IL-2 durante 15 minutos, las imágenes 1A, 2A, 1B y 2B muestran tinción citoplasmática para Lck y para PI3K. En las imágenes 1C y 2C se muestra el contraste de fases de la población de células CALO con y sin tratamiento de la IL-2. Cuando se hace la sobreposición de imágenes para corroborar la co-localización de las cinasas Lck y PI3K se observa un aumento en la fluorescencia de ambas cinasas (1D) comparándolo con las células CALO que no recibieron tratamiento con la IL-2, figura 2D.

En la figura 4 se observa una micrografía de células INBL que fueron tratadas y no tratadas con IL-2 durante 15 minutos, se visualizó tinción citoplasmáticas de ambas cinasas en las imagenes 1A, 2A, 1B y 2B. También se muestra el contraste de fases de las células INBL (1C y 2C). En las figura 1D y 2D observamos que hay un aumento en la fluorescencia de las cinasas Lck y PI3K en células INBL que fueron tratadas con la IL-2, comparándolas con las células INBL que no fueron tratadas.

Con los datos obtenidos podemos señalar que existe co-localización de las cinasas Lck y PI3K en células CALO e INBL, también observamos que existe un aumento en la fluorescencia de las células que se trataron con IL-2.

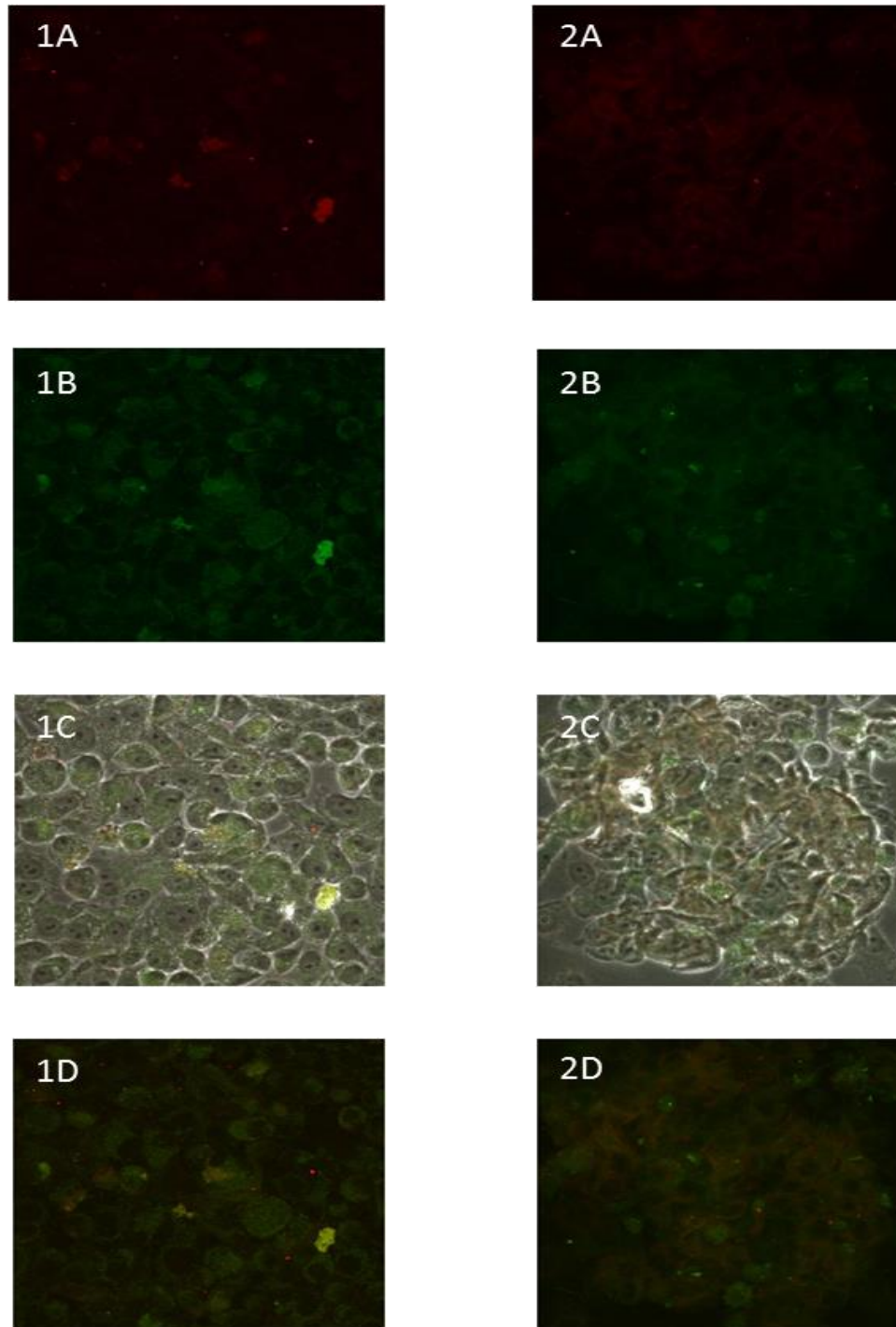


Figura 3. Co-localización de las cinasas PI3K y Lck en la línea celular CALO sin tratamiento (1A, 1B,1C y 1D) y con tratamiento (2A,2B,2C y 2D) de IL-2. (1A-2A) Tinción con el anticuerpo anti-PI3K y secundario conjugado con Texas red. (1B-2B) Tinción con el anticuerpo anti-Lck y secundario conjugado con FITC. (1C-2C) Contraste de fases. Se observa la población de células CALO sin tratamiento y con tratamiento de la IL-2. (1D-2D) Sobreposición de imágenes para determinar co-localización.

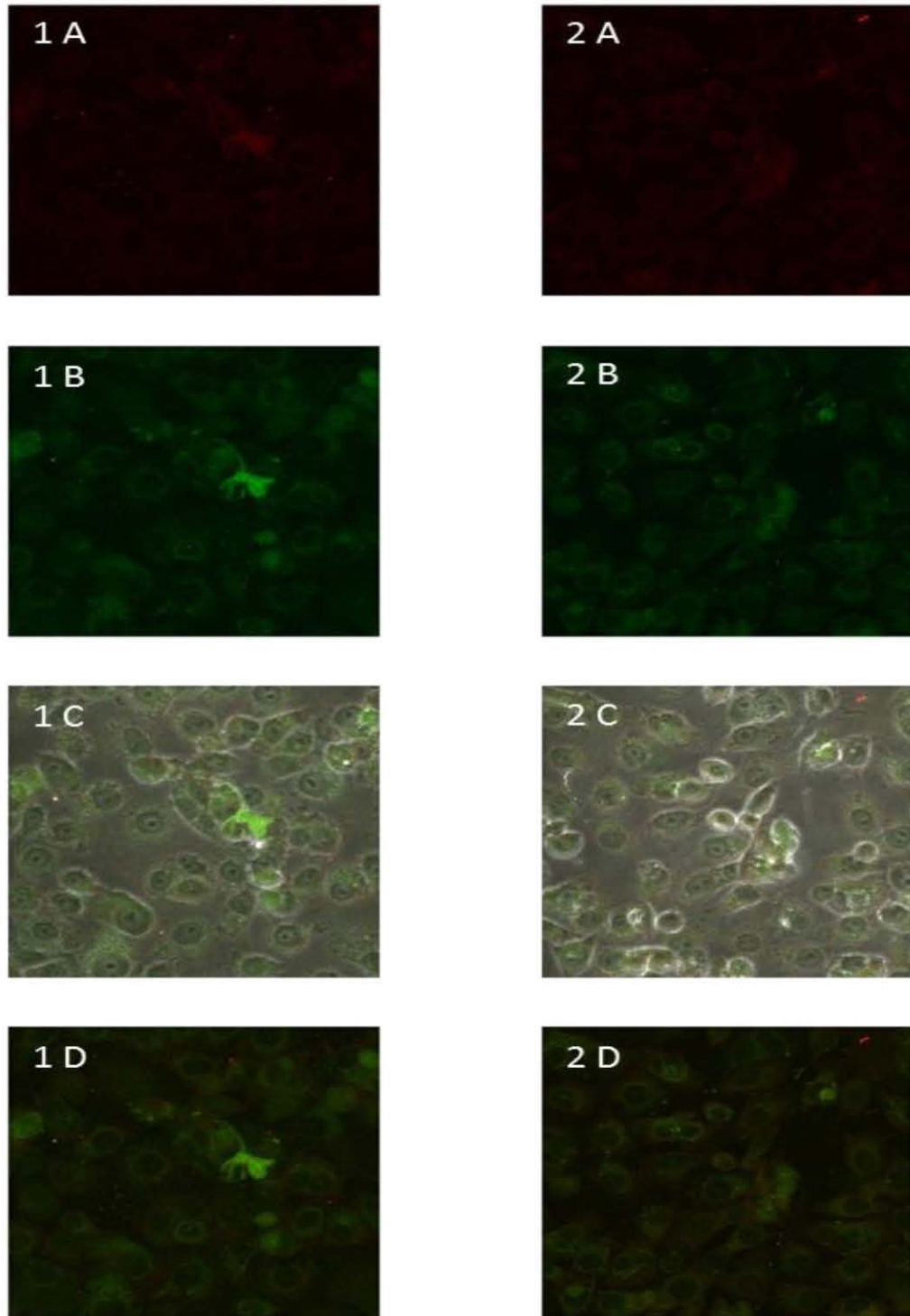


Figura 4. Colocalización de las cinasas PI3K y Lck de la línea celular INBL con tratamiento (1A,1B,1C y 1D) y sin tratamiento (2A,2B,2C y 2D) de la IL-2 (1A-2A). Objetivo 60x. Tinción con el anticuerpo anti-PI3K y secundario conjugado con Texas red. (1B-2B) Tinción con el anticuerpo anti-Lck y secundario conjugado con FITC. (1C-2C) Contraste de fases. Se observa la población de células INBL con la IL-2. (1D-2D) Sobreposición de imágenes para determinar co-localización.

Efecto de la camptotecina sobre la fosforilación de la Lck.

Para analizar el efecto de la camptotecina, un agente inductor de apoptosis, sobre la fosforilación de la Lck, las células CALO e INBL se incubaron en presencia de 5µg de camptotecina por 24 h. Se obtuvieron los lisados celulares y se separaron mediante SDS-PAGE y se analizó la presencia de la Lck fosforilada. En la figura 5A se muestra el inmunoblot anti-Lck en donde se observa la presencia de una banda con peso molecular de 56 kDa que corresponde a la Lck. En el blot anti-PY no se detectó la banda de la cinasa Lck, figura 5B.

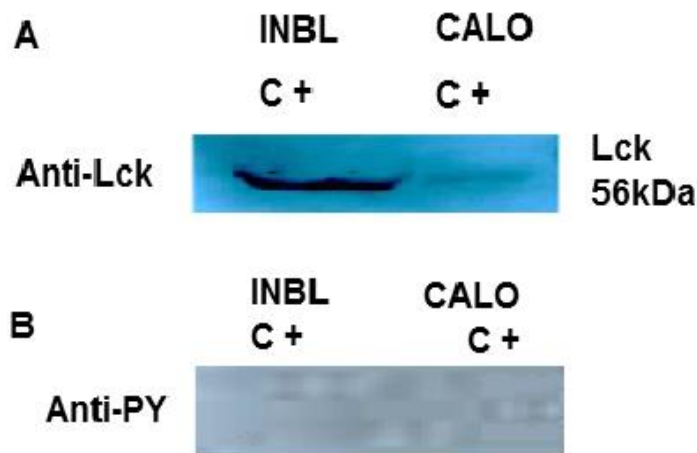


Figura 5. Efecto de un agente inductor de apoptosis sobre la fosforilación de la Lck en células CALO e INBL. Se obtuvieron lisados totales de las líneas celulares CALO e INBL tratadas durante 24 hrs con camptotecina (C+). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó un inmunoblot anti-Lck (A) y un inmunoblot anti-fosfotirosina (B); las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia.

Presencia de la Bcl-2 en las células CALO e INBL.

Se analizó la presencia de la Bcl-2 en fracciones mitocondriales de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, las cuales fueron incubadas en presencia o ausencia de 10 U/ml de la IL-2 a diferentes tiempos. También utilizamos la línea celular JURKAT que son linfocitos T extraídos de sangre periférica de un paciente con leucemia linfocítica aguda. Esta línea celular se utilizó como control positivo para Bcl-2.

En la figura 6 podemos observar la inmunodetección de la Bcl-2 de lisados celulares de las líneas CALO, INBL y JURKAT. En el inmunoblot anti-Bcl-2 se detectó una banda con peso molecular aparente de 29 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína Bcl-2. También podemos señalar que aparentemente hay un aumento de la proteína Bcl-2 cuando las células son tratadas con la IL-2 en ambas líneas celulares.

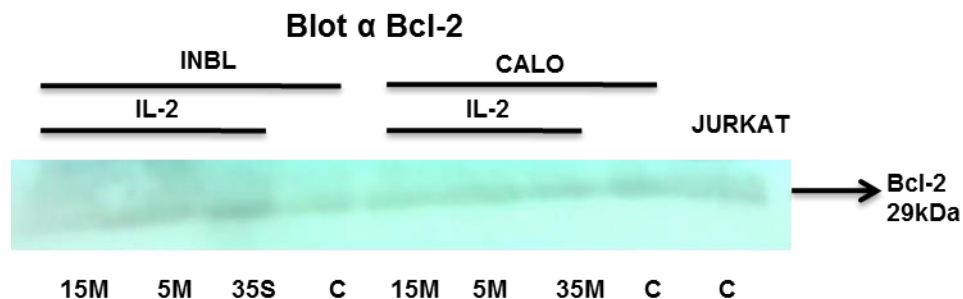


Figura 6. Inmunodetección de la Bcl-2 en fracciones mitocondriales obtenidas a partir de lisados totales de las líneas celulares CALO, INBL y JURKAT. Las células fueron tratadas con la IL-2 a diferentes tiempos: Control, 35 segundos, 5 y 15 minutos.

Determinación de la presencia de la Bcl2, en las líneas celulares CALO, INBL y JURKAT tratadas con la IL-2 a dos concentraciones 100U/ml y 10U/ml.

Debido a que en nuestro laboratorio se ha demostrado que 100 U/ml de IL-2 inducen una inhibición de la proliferación celular y que posiblemente se activan mecanismos de muerte celular, las células CALO, INBL y JURKAT fueron tratadas con 10U/ml y 100 U/ml de IL-2, para analizar si esa inhibición de la proliferación podría deberse a una inducción de apoptosis en las células tumorales. Todas las células fueron tratadas con el inhibidor AG-490 para la JAK3 durante 24 h. En la figura 7 se muestra la inmunodetección de la Bcl2 en las líneas celulares INBL y JURKAT. Las células INBL fueron estimuladas con 10U/ml y 100 U/ml de IL-2 durante 35S, 5M y 15M. Se utilizó la línea celular JURKAT como control positivo para determinar la presencia de la Bcl2. Las células JURKAT fueron tratadas durante 15 min con la IL-2 (100U/ml). En las células INBL se observa una banda que corresponde al peso molecular de la Bcl-2 (29 kDa), que disminuye después de 5 minutos en las células tratadas con 100 U/ml de IL-2 en comparación con la proteína que se mantiene constante cuando las células son tratadas con 10 U/ml de IL-2. Se realizaron ensayos densitometricos para corroborar el aumento de Bcl-2.

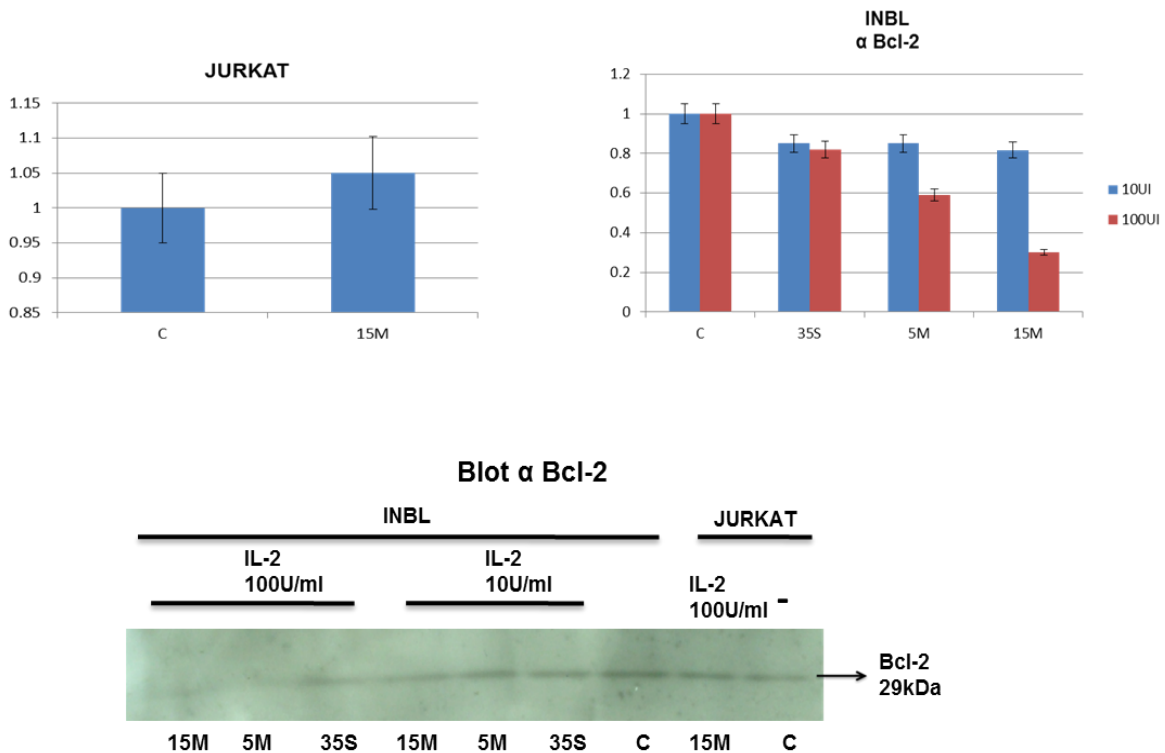


Figura 7. Presencia de la Bcl-2 en fracciones mitocondriales de las líneas celulares INBL y JURKAT. Las células INBL se trataron con la IL-2 (10y 100 U7ml) a diferentes tiempos: 35 segundos, 5 y 15 minutos. Las células JURKAT se trataron con 100 U/ml de la IL-2 durante 15 minutos. Se obtuvieron lisados celulares y se separó la fracción mitocondrial, las proteínas mitocondriales se separaron mediante SDS-PAGE al 15% y posteriormente fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa. Se realizó un Western Blot para la Bcl-2 y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia. Posteriormente se realizaron estudios densitometricos.

En la figura 8 se muestra la inmunodetección de la Bcl-2 en lisados celulares de las líneas JURKAT (control positivo) y CALO tratadas con la IL-2 por 35S, 5 M y 15 M. Se observa una banda con el peso molecular aparente de 29 kDa que corresponde al peso esperado de la proteína Bcl-2. En las células CALO se observa la presencia de la proteína que se mantiene constante cuando las células son tratadas con 10 U/ml de IL-2 y disminuye después de 5 min en las células tratadas con 100 U/ml de U/ml de IL-2.

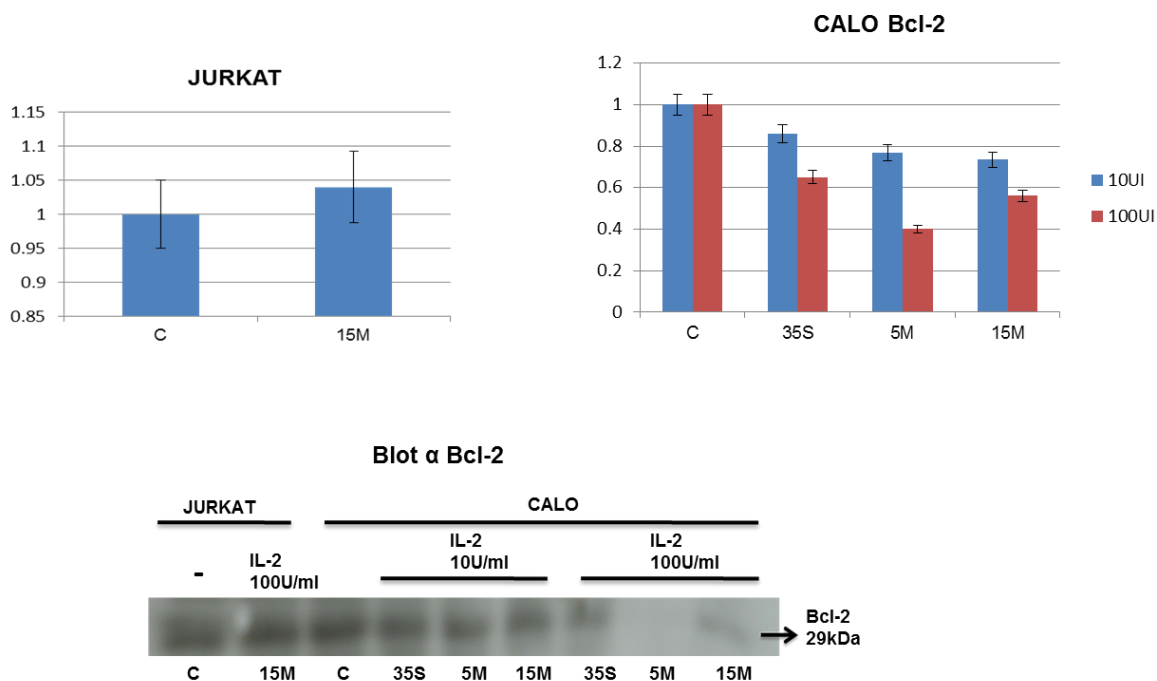


Figura 8. Presencia de la Bcl-2 en fracciones mitocondriales de las líneas celulares CALO y JURKAT. Las células CALO fueron tratadas con la IL-2 (10 y 100U/ml) a diferentes tiempos: 35 segundos, 5 y 15 minutos. Las células JURKAT fueron tratadas con 100 U/ml de la IL-2 durante 15 minutos. Se obtuvieron las fracciones mitocondriales a partir de lisados celulares, se separaron mediante SDS-PAGE al 15% y las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó un inmunoblot para la Bcl-2 y las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia. Se realizaron estudios densitométricos.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la IL-2 recombinante (IL-2r) ofrece beneficios importantes para el tratamiento del cáncer, particularmente en células de carcinoma renal, CaCu y melanoma maligno. La IL-2 lleva a cabo su efecto cuando interactúa con su receptor, el cual está formado por tres subunidades alfa (α), beta (β) y gamma (γ) (33). Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL, que son tratadas con la IL-2 expresan las tres subunidades del receptor. También se ha demostrado que la cinasa Lck está presente en estas líneas celulares tumorales y que se asocia con la cadena beta del receptor para la IL-2 y con la STAT-5. Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que la cinasa Lck, que está presente en las líneas de CaCu CALO e INBL, interacciona con la cinasa PI3K. Para ello se realizó una inmunoprecipitación de la cinasa Lck y posteriormente se reveló con anticuerpos contra la PI3K. En el blot se observó una banda con el peso molecular de 85 kDa, que corresponde a la cinasa PI3K. Posteriormente, se inmunoprecipitó la cinasa PI3K y se reveló con anticuerpos contra la Lck, detectando una banda de 56 kDa. Estos resultados nos sugieren que la cinasa Lck se asocia con la cinasa PI3K, lo cual concuerda con las investigaciones realizadas por Ellery et al (2000), en donde se ha demostrado que en linfocitos normales estimulados con la IL-2 la cinasa PI3K puede ser activada por la Lck. Esta asociación puede ser mediada a través de los dominios SH3 de la cinasa Lck y los sitios de unión ricos en prolina de la subunidad p85 de la cinasa PI3K. En estudios posteriores se ha demostrado que la cinasa Lck se asocia con la cadena beta del receptor de la IL-2 y se activa de manera independiente de las JAKs, además es capaz de activar a la STAT5 para inducir señales anti-apoptóticas (33).

Se ha propuesto que en ausencia de la actividad de la cinasa JAK3, Lck se activa parcialmente por la desfosforilación del residuo Y-505 por un factor asociado con el dominio PROX (región proximal de la membrana) de la subunidad gamma del receptor para la IL-2. Para que la cinasa Lck alcance su actividad máxima, el residuo de tirosina Y-505 debe ser desfosforilado para permitir el acceso al sitio

catalítico, y el residuo Y-394 debe ser fosforilado para mejorar la actividad de la cinasa. Otra cinasa asociada con el IL-2R, podría fosforilar el residuo Y-394 (15,39). Con la disminución de los niveles de la JAK3, la señalización por el receptor IL-2R cambia hacia la activación de la PI3K independiente de la JAK3 y mediado por Lck. Se propone que una fosfatasa asociada con el dominio PROX de la subunidad γ del IL-2R promueve la actividad cinasa de Lck mediando la desfosforilación del residuo inhibidor de tirosina en el carboxilo terminal. Una vez desfosforilada, Lck aumenta su actividad de cinasa y es capaz de fosforilar a la PI3K que se asocia con la subunidad β del IL-2R, a un nivel suficiente para inducir señales anti-apoptóticas (15). Una señal derivada del dominio PROX de la subunidad γ conduce a la activación de la Lck. Este es probablemente un mecanismo importante a largo plazo para la sobrevivencia de células inmunes en la periferia que puede proveer de “memoria” contra un nuevo desafío antigénico (39). Con base en estos antecedentes, nosotros decidimos tratar a las células CALO e INBL con un inhibidor de la JAK3, los resultados muestran que existe una interacción entre la cinasa Lck y la cinasa PI3K por ensayos de co-inmunoprecipitación y por co-localización por microscopia confocal. Estos resultados nos permiten sugerir que la interacción entre las cinasa podría inducir una vía de sobrevivencia. Es importante mencionar que las células CALO y INBL fueron tratadas con IL-2 para activar vías de señalización en donde participan las cinasas Lck y PI3K. Estas cinasas participan en las vías de señalización de sobrevivencia; en estudios anteriores se ha reportado que la IL-2 es un poderoso factor de crecimiento de células T, cuando la IL-2 se une a su receptor, desencadena muchas de las vías que participan en el crecimiento, diferenciación, proliferación y supervivencia celular (36).

Nuestro resultados también mostraron que aparentemente hay una mayor expresión de las bandas que corresponden a las cinasas PI3K y Lck en la línea celular INBL en comparación con las células CALO, lo que probablemente puede deberse a INBL se encuentra en un estadio de transformación más avanzado. En las células tratadas con la IL-2 observamos que existe un aumento en la co-localización de las cinasas Lck y PI3K que se encuentran en el citoplasma cerca

de la membrana plasmática. Los datos obtenidos de la inmunoprecipitación y co-localización de las cinasas Lck y PI3K nos indican que probablemente ambas cinasas están asociadas formando un complejo. Existen evidencias de proteínas que forman complejos con Lck, algunas de ellas son la PI3K, la ZAP-70 y la subunidad beta del receptor de la IL-2, entre otras (30). Probablemente una mayor expresión de estas proteínas podría conferirle mayor sobrevivencia a las células metastásicas, como el caso de la línea INBL.

Además, se analizó la presencia de la Bcl-2 en estas líneas celulares para entender los mecanismos anti-apoptóticos que están utilizando cuando son expuestas a la IL-2 a diferentes concentraciones 10 y 100U/ml. En linfocitos T se ha encontrado que las cinasas Lck y PI3K participan en las vías de señalización que tienen que ver con la sobrevivencia celular activando proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, (33). En los blots se observaron bandas con el peso molecular de 29 kDa que corresponden al peso de la Bcl-2.

Nuestro grupo de trabajo ha observado que las células CALO e INBL que son tratadas con una concentración de 10U/ml de la IL-2 proliferan; por el contrario, cuando las células son tratadas con 100 U/ml se detiene su crecimiento (Valle Mendiola, datos no publicados). Nosotros observamos que cuando las células CALO e INBL son tratadas con 10U/ml de la IL-2, se logra detectar un aumento en las bandas que corresponden al peso molecular de la Bcl-2, en comparación con las que son tratadas con 100U/ml, donde hay una disminución aparente de la proteína. Esto se debe probablemente a que las células que son tratadas con 100 U/ml de la IL-2 se detienen en alguna fase del ciclo celular o que entren en apoptosis.

Los miembros de la familia de la Bcl-2 son proteínas anti-apoptóticas que protegen a muchas células de la muerte celular programada (apoptosis). Wong et al (2008) han reportado que hay una sobre expresión de la Bcl-2 en enfermedades malignas tales como leucemias, linfomas, tumores pancreáticos y de mama.

También, analizamos el efecto de la camptotecina, un agente inductor de la apoptosis, sobre la fosforilación de Lck en las líneas celulares CALO e INBL; encontramos que la cinasa Lck no se fosforila y no observamos la presencia de la proteína Bcl-2 en los inmunoblots anti-Bcl-2. Estos resultados sugieren que la cinasa Lck podría estar participando en la activación de vías anti-apoptóticas.

Con base en nuestros resultados nosotros podemos suponer que en las células CALO e INBL el tratamiento con 10 U/ml de IL-2 induce la interacción entre la cinasa Lck y la cinasa PI3K, lo que trae como consecuencia que se mantenga estable la presencia de proteínas como la Bcl-2, que son mediadores involucrados en la sobrevivencia celular tal y como se ha observado en linfocitos normales. Las rutas de señalización de la IL-2 que inducen diversas respuestas celulares son sumamente complejas y no han sido totalmente aclaradas. En las células tumorales, los resultados aquí presentados contribuyen a esclarecer cómo es que las células tumorales activan mecanismos que les permiten sobrevivir manteniendo así el proceso continuo de proliferación y crecimiento de un tumor.

CONCLUSIONES

- La cinasa Lck presente en las células CALO e INBL interactúa con la cinasa PI3K.
- Bcl-2 está presente en las células CALO e INBL y se modifica en respuesta al tratamiento con IL-2.

PERSPECTIVAS

- **Realizar ensayos densitométricos para los Blots α Bcl-2**
- **Utilizar inhibidores para las cinasas LCK y PI3K.**
- **Realizar ensayos de apoptosis en las líneas celulares CALO e INBL en presencia de IL-2 a 100U/mL.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Llanes A, Torres A, Barrientos C, Lin C. El Cáncer cérvico uterino, enemigo número uno de la salud de la mujer. Revista electrónica Medicina, Salud y Sociedad. (2011) Vol. 1, No. 3.
- 2.- Zaino R, Ward S. y Delgado G. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Cáncer* 1992, 69 (7): 1750-1758.
- 3.- López A y Lizano M. Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina: *Cancerología* 1 (2006) 31-55.
- 4.- Giuliano A, Papenfuss M, Abrahamsen M, et al. Human Papillomavirus Infection at the United States-Mexico Border: Implications for Cervical Cancer Prevention and Control¹. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10:1129-1136.
- 5.- Steben E, Duarte F, Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 107 (2007) S2–S5.
- 6.- Mammas I , Sourvinos G. , Zaravinos A., Spandidos D. Vaccination against Human Papilloma Virus (HPV): Epidemiological Evidence of HPV in Non-genital Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* (2011) 17:103–119
- 7.- Bermúdez M. Peralta Z. y Madrid M. Terapia genética con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública México.* (2005) 47 (6):1-18
- 8.- Aguzzi A y Heikenwalder M. Cytokines and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity* (2005) 22: 145-54

- 9.- Lodige L., Marg A., Wiesners B., Malecova B., Oelgeschlage T. y Vinkemeier U. Nuclear Export Determines the Cytokine Sensitivity of STAT Transcription Factors. *Biological Chemistry* (2005) 280 (52): 43087-43099.
- 10.- Valle A. y Soto C. Vía JAK-STAT: Una visión general. *Vertientes* (2005) 8 (1,2):14-25.
- 11.- Mire S. y Thorpe R. *Cytokines*. Academic Press Great Britain. (1998) 19-33
- 12.- Onur B. and Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Immunology*. (2012) vol.12: 180-189.
- 13.- Romo de Vivar A, E de Vera M., et al, The biology of interleukin-2 efficacy in the treatment of patients with renal cell carcinoma. *Med Oncol* (2009) 26:S3–S12.
- 14.- Morris J., Waldmann T. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann Rheum Dis* 2000;59: 109-114.
- 15.- Ellery JM, Nicolls PJ,. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine y Growth Factor Reviews*. 2002; 13: 27-40.
- 16.- Ethan M. Shevach. Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function. *Trends in Immunology*. Elsevier (2012) 1-7
- 17.- Sarah L. Gaffen. Signaling Domains of the Interleukin 2 Receptor. *CYTOKINE*, Vol.14, No.2 (21 April), 2001: pp 63-77.
- 18.- Cacalano NA, et al, Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of JAK3: mapping of the JAK3-receptor interaction domain. *EMBOJ* 1999; 18 (6): 1549-1958.
- 19.- Lin JX, Leonard, WH, The role of STAT5a and STAT5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000; 19 (21): 2566-2577.
- 20.- Soto-Cruz I. Proteínas Cinasas de la Familia Src en el Desarrollo del Cáncer. *Vertientes* 2008, 11(1-2): 3-9.

- 21.- Marc Beyer. Interleukin-2 treatment of tumor patients can expand regulatory T cells. *Onco Immunology* 2012, 1:7, 1181-1182
- 22.- K Heynick and R Beyaert. A novel link between Lck, Bax expression and chemosensitivity. *Oncogene* 2006,25, 1693-1695
- 23.- Zamoyska R., Basson A., Filby A., Legname G., Lovatt M. and Seddon Benedict. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunological Reviews* 2003, vol 191: 107-118
- 24.- Rossy J., Williamson D. and Gaus K. how does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Frontiers in Immunology* 2012, vol.3: 1-6
- 25.- Simon J. Davis and P. Anton van der Merwe. Lck and the nature of the T cell receptor trigger. *Trends in immunology*, 2011, vol.32: 1-6
- 26.- Alice M. Nyakeriga, Himanshu Garg, Anjali Joshi. TCR-Induced T Cell Activation Leads to Simultaneous Phosphorylation at Y505 and Y394 of p56^{lck} Residues. *Cytometry Part A* 2012. 81A: 797-805
- 27.- Eun-Jung Kim, Francisco J. Monje et al. Alzheimer's disease risk factor lymphocyte-specific protein tyrosine kinase regulates long-term synaptic strengthening, spatial learning and memory. *Cell Moll. Life Sci.* 2013, 70: 743-759.
- 28.- Nanae Harashima, Koji Tanaka, et al. Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by cytotoxic T lymphocytes of cancer patients with distant metastases. *Eur. J. Immunol.* 2001. 31: 323-332.
- 29.- Aguilera A., Beltrán-Peña E., et al. Cascada de transducción de señales: vía PI3k involucrada en diferentes respuestas celulares. *Iencia Nicolaita* 2005. No.41: 155-168

- 30.- W. Wei-Lynn Wong and Hamsa Puthalakath. Bcl-2 Family Proteins: The Sentinels of the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *IUBMB Life*, 2008, 60(6): 390-397.
- 31.- Ariana Diana Rus. Papel regulador de la Enzima Xantina Oxidasa en el proceso Apoptótico. Estudio en glándula mamaria de rata. Universitat de Valencia. 2005
- 32.- Ryaz B. Chagpar and Philip H. Links, et al. Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *PNAS* 2010. Vol.107 (12):5471-5476
- 33.- Jonathan M. Ellery, Sarah J. Kempshall, Peter J. Nicholls. Activation of the interleukin 2 receptor: a possible role for tyrosine phosphatases. *Cellular Signalling* 2000, 12: 367-373
- 34.- Radosavljević GD, Jovanović IP, Kanjevac TV, Arsenijević NN. The role of regulatory T cells in the modulation of anti-tumor immune response. *Srp Arh Celok Lek.* 2013 Mar-Apr; 141(3-4):262-7.
- 35.- Lang UE, Borgwardt S. Molecular Mechanisms of Depression: Perspectives on New Treatment Strategies. *Cell Physiol Biochem.* 2013 May 31; 31(6):761-777.
- 36.- S. Alice Long, Jane H. Buckner, Carla J. Greenbaum. IL-2 therapy in type 1 diabetes: “ Trials” and tribulations. *Clinical Immunology* 2013 8; 4C:4.
- 37.- Rocha Z. et al. Interleukin-2 (IL-2) receptor- β signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling* 2004 16:1239-1247.
- 38.- Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C.F., Weiss-Steider B. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine* 2010 50:273-277.

39.- Ramírez Cervantes I. Estudio de la interacción entre la cinasa Lck y la cadena beta del receptor para IL-2 en las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis para obtener el título de Q.F.B., FES Zaragoza, UNAM. 2010

40.- Voet D. y Voet G. Bioquímica. 3^{ra} edición. Medica Panamericana. 2006, pp: 1776.

ANEXOS

Preparación de Sustancias

A) Gel Separador

- 1) 3.33 ml de acrilamida con Bis-acrilamida
- 2) 1.25ml de TRIS a pH 8.8
- 3) 100µl de SDS al 10%
- 4) 500 µl de Persulfato de Amonio a 1.5%
- 5) 4.8 ml de agua
- 6) 15 µl de TEMED

B) Gel Concentrador

- 1) 625 µl de acrilamida y Bis-acrilamida
- 2) 1.25 ml de TRIS a pH 6.8
- 3) 250 µl Persulfato de Amonio a 1.5%
- 4) 2.8 ml de agua
- 5) 7.6 µl de TEMED

C) Buffer de Transferencia

- 1) 3.02 grs. de TRIS
- 2) 14.4 grs. Glicina
- 3) 0.5 grs. de SDS
- 4) 800 ml de agua y se ajusta a pH 8.3
- 5) 200ml de Metanol

D) Buffer de Corrida para Electroforesis a 5X

- 1) 5 grs. de SDS
- 2) 72 grs. de Glicina
- 3) 15.15 grs. de Tris
- 4) 1000ml de Agua y se ajusta a pH 8.3

E) Buffer de Lisis

Preparación para 50 ml.

- 1) 500 μ l de Tritón al 1%
- 2) 500 μ l de PMSF (0.1 M)
- 3) 50 μ l de Ortovanadato de Sodio
- 4) 100 μ l de EDTA 0.5 M
- 5) 1.5 ml de Na Cl a 5M
- 6) 3 ml de Na F a 0.5M

- 7) Pirofosfato de Sodio a 1M
- 8) 500 µl de TRIS a 1M y pH 7.5

F) Buffer de Elusión

- 1) 2.5 grs. de SDS
- 2) 3.75 grs. de Glicina
- 3) 500 ml de agua
- 4) Se ajusta a pH 2.5

G) TBS-Tween

- 1) 20 ml de TRIS
- 2) 30 ml de Na Cl
- 3) 1000 ml de agua

H) Verseno

- 1) 0.2 grs. de EDTA
- 2) 3.04 grs. de TRIS
- 3) 8 grs. NaCl
- 4) 0.4 grs. KCl a pH 7.7
- 5) Para 1000 ml

I) Buffer de Mitocondria

- 1) 0.1 ml de TRIS a 10mM
- 2) 0.3 ml de NaCl a 50mM
- 3) 40 μ l de EDTA a 2mM
- 4) 20 μ l de TRITON a 0.2%
- 5) 30 μ l de de NP40 a 0.3%
- 6) 30 μ l de PMSF a 0.3mM

Para preparar 10 ml

J) Buffer de Digitonina

- 1) PBS 1X
- 2) 10 μ g/ ml de Digitonina