



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE
INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA**

T E S I S

**Dilucidación de la vía apoptótica
ejercida por IL-2 en las líneas
celulares de Carcinoma de Cérvix
CALO e INBL**

Que para obtener el Título de

B I Ó L O G O

Presenta

Aguilar Solis Eduardo Daniel

Directora: M. en C. Rosalva Rangel Corona

Asesor Interno: Dr. Benny Weiss Steider



México, D.F., Abril 2014



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**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular (Lab. 4 P.B.), perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Z) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona y asesorada por los miembros del comité encabezado por el Dr. Benny Weiss Steider.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, clave de proyecto IN215713. Asimismo, se agradece enormemente la beca otorgada del programa PAPIME de la DGAPA, clave de proyecto PE213312.

México, D.F., Abril 2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Aguilar y Micaela Solis por el amor, trabajo y sacrificio de todos estos años

A mi hermano, Miguel Aguilar, por ser mi mayor ejemplo y la única persona que se que nunca me va a faltar

A mis preceptores, Rosalva Rangel Corona, María Teresa Corona Ortega, Benny Weiss Steider, Sierra Mondragón Edith y Del Rio Ortiz Itzel por sus lecciones, experiencias y por introducirme en este fantástico mundo

Al equipo *TRAIL* de laboratorio, Arteaga Saúl y Anahí Aguilar, por su increíble actitud ante los retos que se nos presentaron. Por retroalimentarme y sobre todo tolerarme

Al técnico de laboratorio Don José por su apoyo, dedicación y compromiso

A mis compañeros de laboratorio y ahora de vida, Díaz Alondra, Guzmán Nallely, Palomares Libertad, Santiago Rubí, Tapia Omar, Erika Reus, Rojas Pablo y Hernández Karla por la suma de todos los momentos compartidos y que ahora son mis mejores historias

A las ya no tan pequeñas aprendices, Grijalva Adriana, Flores Miriam, Cuautle Ana, Herrera Marlene y Ramírez Mireya, por darle color a mi gris vida

Y a todas las personas que consciente o inconscientemente influyeron a definir lo que soy, por siempre mi cariño y agradecimiento

ABREVIATURAS

AGC: Células Glandulares Atípicas, término usado en el sistema de clasificación Bethesda

AIS: Adenocarcinoma Endocervical in Situ, término usado en el sistema de clasificación Bethesda

AP-1: Factor de transcripción genético, implicado en diversos procesos celulares como: Diferenciación, Proliferación y Apoptosis.

APO2-L: Nombre con el que también se le conoce a **TRAIL-L**

ASC: Células Escamosas Atípicas, término usado en el sistema de clasificación Bethesda

ASC-H: Células Escamosas Atípicas de Alto grado, término usado en el sistema de clasificación Bethesda

ASC-US: Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado, término usado en el sistema de clasificación Bethesda

ATF-2: Factor Activador de la Transcripción 2; Factor de Transcripción, que forma homodímeros y homotrímeros con **c-Jun**

BiDt: Proteína Pro-Apoptótica de la sub familia BH3 que favorece la activación de **BAX** y **BAK**, otros miembros Pro-Apoptóticos

BAX: Proteína citoplasmática Pro-Apoptótica que se inserta en la membrana externa mitocondrial, para formar poros y desregular la misma

BAK: Proteína que promueve la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, para la liberación de más factores Pro-Apoptóticos como Citocromo C

c-FLIP: Proteína inhibidora del proceso Apoptótico al impedir estéricamente a la proteína adaptadora **FADD**

c-Jun: Proteína cuya activación se produce a través de la ruta JNK y que junto con c-Fos conforman al factor de transcripción **AP-1**

C-kit: También conocido como CD117, es un receptor de superficie que tras su activación por su ligando, fosforila y activa moléculas de transducción de señales que propagan señales de supervivencia celular, proliferación y diferenciación.

CaCU: Carcinoma de Cérvix y de Cuello Uterino

CARD: Dominio de Reclutamiento y Activación de Caspasas

CD4+: Marcador por excelencia de Linfocitos T colaboradores, éste participa en la adhesión de los linfocitos T a sus células diana, está implicado también en la maduración de éstos en el timo al transmitir señales intracelulares para la formación de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase II

CD8+: Marcador por excelencia de Linfocitos T citolíticos o citotóxicos, participa como co-receptor en la estabilización de la adhesión a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I, Implicada también en la maduración tímica de linfocitos T y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación de los Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA)

CrmA: Citocina de Respuesta Modificadora-A. Es una Serpina viral, una toxina producida por el virus de la viruela en vacas que bloquea la apoptosis mediante la unión a proteasas en su forma activa, evitando de este modo la activación de Caspasas efectoras

DCC: Carcinoma Color Rectal

DD: Dominio de Muerte

DED: Dominio Efecto de Muerte

DISC: Complejo de Señalización Inductor de Muerte

DNA: Acido Desoxirribonucleico

DR: Receptores de Muerte

DR3: Receptor de Muerte miembro 3

DR4: Nombre con el que también se le conoce a TRAIL-R1

DR5: Nombre con el que también se le conoce a TRAIL-R2

DR6 Receptor de Muerte miembro 6

E2F: Factor de Transcripción que activa los genes necesarios para entrar en la fase S (de síntesis del DNA)

EDA-R: Receptor de Displasia Ectodérmica; Miembro de la superfamilia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (**TNF-R1**) que pueden inducir la apoptosis

EE. UU.: Estados Unidos de América

FADD: Dominio de Muerte Asociado al Receptor FAS; Es una proteína adaptadora que se asocia al **FAS-R** y otros receptores de muerte, activando a la Caspasa -8 a través de su **DD** para formar el Complejo de Señalización Inductor de Muerte (**DISC**) durante la Apoptosis

FAS-L: Ligando del **FAS-R**

FAS-R: Es un receptor de muerte (**DR**) de superficie en las células que conduce a la Apoptosis tras su activación por **FAS-L**

FitC: Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato;(Fluorescein IsoTioCyanate). Es una molécula que pertenece al grupo de los colorantes de xanteno derivados de la fluoresceína. Los fluorocromos son moléculas capaces de emitir fluorescencia al ser excitadas a ciertas longitudes de onda

G1: La G_1 o fase de crecimiento 1, es la primera de las cuatro fases del ciclo celular que tiene lugar en la división de células eucariotas. En esta parte de interfase, la célula crece en tamaño y sintetiza RNAm y proteínas para la preparación de las etapas posteriores que conducen a la mitosis. La fase G_1 termina cuando la célula se mueve en la fase S o de duplicación del material genético

G2: La G_2 o la fase Pre-Mitótica, es la segunda y última interfase en el ciclo célula, ésta precede directamente a la mitosis. Su entrada desprende la conclusión con éxito de la fase S, durante la cual el DNA de la célula se replica. La fase G_2 termina con el comienzo de la profase, la primera fase de la mitosis en la que la cromatina celular se condensa en cromosomas

Hrs/H: Horas

IAP's: Inhibidores de la Apoptosis; Son una familia de proteínas funcionales durante toda la vida de la célula, sirven como inhibidores endógenos de la Apoptosis. La familia IAP humana se compone de 8 miembros: AP, Cp-IAP, Op-IAP, XIAP, c-IAP1, C-IAP2, NAIP, Viviendo y Survivin

IKK (IKK1): Es una proteína cinasa que en los humanos se codifica por el gen *CHUK*. IKK es parte del complejo cinasa $I\kappa B$ que juega un papel importante en la regulación del factor de transcripción **NF- κB** . Sin embargo, IKK tiene muchas dianas celulares adicionales y se cree que funciona independientemente de la ruta de **NF- κB** para regulación y diferenciación epidérmica

IKK β (IKK2): Esta proteína es parte de la vía de señalización del factor de transcripción **NF- κB** . Forma el complejo $I\kappa B\alpha$, formado por **IKK1** e **IKK β** que mantienen inactivo al **NF- κB** mediante el enmascaramiento de señales de localización nuclear. **IKK1**, específicamente, fosforila la proteína inhibidora **IKK β** . Esta fosforilación resulta en la disociación de **IKK β** de **NF- κB** , que es ahora migra libremente al núcleo y activa la expresión de al menos 150 genes, algunos de los cuales son Anti-Apoptóticos

IKK γ (NEMO): Proteína conocida por ser la que activa en su totalidad a **NF- κB** resultando en la activación de genes implicados en la inflamación, la inmunidad, la supervivencia celular y otras muchas vías aun no dilucidadas

IL-2: Interleucina 2

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

JNK: Familia de proteínas con actividad cinasa activadas por mitógenos (MAPK), responden a estímulos de estrés, como citocinas, radiación **UV**, choque térmico y choque osmótico. Se encuentran implicadas en el proceso de diferenciación de los linfocitos T, como en procesos de Apoptosis, neurodegeneración, diferenciación y proliferación celular, procesos inflamatorios y producción de diversas citocinas. En su mayoría estos procesos son mediados por el factor de transcripción **AP-1**, ha demostrado estar implicada en la regulación de la proteína **c-Jun** mediante fosforilación

JNKK (JNK Quinasa): Junto con JNKK2, las JNKs modifican mediante fosforilación la actividad de numerosas proteínas que residen en la mitocondria o en el núcleo, con lo que regula diversas e importantes funciones celulares de Apoptosis, neurodegeneración, diferenciación y proliferación celular, procesos inflamatorios y producción de diversas citocinas

KDa: Kilo Dalton. Es una unidad de masa, especialmente usada en la medida de masas atómicas y moleculares. Está definida como la doceava parte (1/12) de la masa de un átomo neutro y no enlazado de Carbono-12 en su estado fundamental eléctrico y nuclear y su valor recomendado es de 73×10^{-27} kg

LAK Actividad: Nombre con el que se le conoce a las células **NK** activadas por Interleucina 2 (**IL-2**) de forma artificial en laboratorio, de exhibir una capacidad citolítica aumentada. También se les denomina Linfocitos agresores activados por Linfocina.

LPC: Lisofosfatidilcolina; Está presente como un fosfolípido menor en la membrana celular y en el plasma sanguíneo

LSIL: Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo grado

LT α : Nombre con el que también se le conoce al **TNF- β**

MAPK: (Proteína Activada por Mitógenos) En realidad es una ruta de transducción de señal en células de eucariotas, principalmente iniciada por receptores tirosin cinasa así como la mayoría de receptores de citocinas. En términos globales, la señal se transporta mediante GRB2, de Sos a Ras. Esta Ras, ya activada, estimulara a tres proteínas cinasas que actuaran de forma secuencial y que culminaran con la activación de la MAP Cinasa (también denominada como ERK), que es capaz de traslocarse al núcleo para regular las transcripciones y modulaciones de la expresión de distintos genes que modificarán la actividad de proteínas. incluyendo factores de transcripción

MCP: Muerte Celular Programada

MEKK1: Proteína Activada por Mitógeno/ERK Quinasa-1; Proteína que ejerce un papel fundamental en la red de enzimas que fosforilan integrando respuestas celulares de un cierto número de estímulos mitogénicos y metabólicos, incluyendo, por ejemplo, la insulina y factores de crecimiento. Presente en la ruta **MAPK**

MKK 1-4: Proteínas cinasa activadoras directas de las **MAPK** en respuesta a diversas situaciones de estrés ambientales o estímulos mitogénicos

mL: Mililitro; El mililitro es una unidad de volumen equivalente a la milésima parte de un litro. También equivale a 1 centímetro cúbico (1 cm³)

MORT-1: Adaptador citoplasmático de la proteína adaptadora **FADD**, juntas forman el complejo **FADD/MORT1**, capaz de iniciar con el reclutamiento de Caspasa -8 y la formación del **DISC**

mTNF- α : Nombre con el que también se le conoce al **TNF- α**

NCCD: Comité de Nomenclatura en Muerte Celular

NF- $\kappa\beta$: Es un complejo proteico que controla la transcripción del **DNA**. NF- $\kappa\beta$ se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como estrés, citocinas, radiación **UV** y antígenos bacterianos o

virales. La regulación defectuosa del NF- κ B está relacionada con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes

NGF-R: Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso; Es una proteína transmembrana miembro de los **DR** y de la subfamilia del **TNF-R**. Es de los miembros menos estudiados de la familia con potencial inductor de Apoptosis

NIC: Neoplasia Intraepitelial Cervical, puede existir de tres niveles I, II y III

NIK: Proteína Cinasa de NF- κ B; Es la primera Proteína Cinasa involucrada en la ruta de activación del factor de transcripción **NF- κ B**, ésta se cree fosforila a una proteína IKK citoplasmática, la cual fosforilara al complejo I κ B α

NK Célula: Natural Killer Cell; Son un tipo de célula citolítica linfocitaria perteneciente al sistema inmunitario. También se las conoce como células nulas. Morfológicamente son prácticamente indistinguibles a los linfocitos grandes excepto por los gránulos que contienen. También se les llama tercera población, ya que cuando se conocieron bien los linfocitos T y B por marcadores, las células NK no acoplaban estos marcadores (ni **CD4+** ni **CD8+**)

OMS: Organización Mundial de la Salud

P53: Proteína esencial para inducir una respuesta de la célula ante el daño del DNA, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular. Un p53 defectuoso podría permitir que las células anormales proliferen dando por resultado cáncer (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53)

P55: Nombre con el que se le conoce a la cadena α del receptor de **IL-2 (RIL-2)**

P64: Nombre con el que se le conoce a la cadena γ del receptor de **IL-2 (RIL-2)**

P70: Nombre con el que se le conoce a la cadena β del receptor de **IL-2 (RIL-2)**

PBS: Solución Buffer de Fosfatos

pH: Potencial de Hidrogeno; Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidronio [H₃O⁺] presentes en determinadas sustancias

PLAD: Dominio de Ensamblaje Pre-Ligando; Fenómeno de auto asociación que implican la formación de un dominio funcional por separado y distinto al montaje del receptor de unión al ligando

PS: Fosfatidilserina; Fosfolípido que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, en el lado citoplasmático, de las membranas celulares gracias a una enzima llamada flipasa. Cuando una célula sufre Apoptosis, la Fosfatidilserina ya no se limita a la parte citoplasmática de la membrana, sino también queda expuesta a la superficie de la célula

RAIDD: **RIP** asociada por ICH-1 a proteína CED-3 homóloga con Dominio de Muerte

Rb: Retinoblastoma

RIL-2: Receptor de Interleucina 2

RIP: Proteína de Interacción con el Receptor

RNAm: Ácido Ribonucleico mensajero

SFB: Suero Fetal Bovino

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute Medium var. 1640. Contiene 2mM de L-glutamina, HEPES 10mM, piruvato de sodio 1 mM, 4,500 mg de glucosa / L y 1500 mg bicarbonato / L

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SODD: Silenciadora de Dominios de Muerte; Proteína reclutada en la parte citoplasmática del **TNF-R1** capaz de evitar el reclutamiento de **TRADD** y así evitar el proceso de muerte

sTNF- α : Forma soluble del **TNF- α**

TACE: Enzima metaloproteasa convertidora de **TNF- α** a **sTNF- α**

TH1: Sub-Población linfocitaria altamente efectiva en la eliminación de patógenos intracelulares. La IL-12 promueve la transformación desde linfocitos quiescentes a este tipo de Sub-Población

TNF-R1: Es un receptor de muerte (**DR**) de superficie en las células que conduce a la Apoptosis tras su activación por **TNF- α**

TNF- α : Ligando del Receptor TNF-R1, unidad inmersa en la membrana celular

TNF- β : Forma soluble del ligando de **TNF-R** derivada de células linfocitarias usado como citocina, para señalización autocrina o paracrina

TRADD: Dominio de muerte asociado a **TNF-R1**; Proteína que interactúa con **TNF-R1** o **TNF-R2** y media la Apoptosis o la señalización y activación de **NF- κ B**. Esta proteína se une a la proteína **TRAF-2** y reduce el reclutamiento de los inhibidores de la apoptosis, las proteínas **IAP's**, por lo tanto suprime a **TRAF-2**. Esta proteína también puede interactuar con los receptores **TRAIL-R2**, **FAS-R** o con el complejo proteico adaptador **FADD/MORT** y está implicado en la vía de la muerte celular inducida por **FAS-R**

TRAF-2: Factor 2 de Asociación a **TNF-R1**; Proteína miembro de la familia (TRAF). TRAF-2 se asocia y media la transducción de señales de los miembros de la superfamilia de receptores de TNF, específicamente con **TNF-R1** y **TNF-R2**, donde forma complejos con otras proteínas TRAF. Se requiere TRAF-2 para la activación de TNF MAPK8/JNK y **NF- κ B**. El complejo de proteína formado por TRAF-2 y TRAF-1 interactúa con las **IAP's** cIAP1 y cIAP2 y funciona como un mediador de las señales Anti-Apoptóticas de receptores de TNF

TRAIL-L: Ligando de los Receptores TRAIL -R1, -R2, -R3 y -R4

TRAIL-R2: Es un receptor de muerte (**DR**) de superficie en las células que conduce a la Apoptosis tras su activación por **TRAIL-L**

TRizol: Tiocianato de guanidinio fenol-cloroformo; Es una solución química utilizada en la extracción de DNA/RNA/ Proteína

UI: Unidad Internacional; Es una medida de la actividad enzimática y catalítica.

Enzimáticamente se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de producto por minuto. Catalíticamente es la cantidad de enzima que puede transformar 1 mol de sustrato por segundo

UNC5A-D: Proteína transmembranal miembro de los Receptores de Netrina-1, según reportes este receptor, sin ser parte de la subfamilia del TNF, es capaz de inducir Apoptosis en **DCC**

VPH: Virus del Papiloma Humano

RNAsas: Ribonucleasas; Son enzimas que cortan las secuencias de RNA para su posterior degradación

UV Radiación: Radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm (4×10^{-7} m) y los 15 nm ($1,5 \times 10^{-8}$ m). Su nombre proviene de que su rango empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que los humanos identificamos, como el color violeta

Rx: Reacción

RT: Retrotranscripción

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

dNTP's: (Desoxirribonucleótidos Trifosfato); Son cuatro dATP, dTTP, dCTP y dGTP, llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de **DNA** emparejando los Desoxirribonucleótidos Trifosfato con los Desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del DNA molde

cDNA: DNA complementario; Es una hebra de **ADN** que se constituye en secuencia totalmente complementaria a la de una cadena a (se sintetiza a partir de una hebra simple de un RNA mensajero (**RNA_m**))

TBE: Tris borato y EDTA; Solución buffer alta en electrolitos que facilitan la conducción eléctrica

ÍNDICE

- I. Portada
- II. Sitio de elaboración
- III. Abreviaturas
- IV. Resumen

1. Marco Teórico

1.1 Interleucina 2 (IL-2)

1.2 Carcinoma de cérvix

1.3 Clasificación del CaCU

1.4 Muerte celular

1.5 Apoptosis

1.6 Vía extrínseca de la Apoptosis

1.7 Caspasas

1.8 Activación de Caspasas

1.9 Funciones principales de las Caspasas Efectoras en la Apoptosis

2. Justificación

3. Hipótesis

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

4.2 Objetivos Particulares

5. Materiales y Métodos

5.1 Material Biológico

5.2 Condiciones de Cultivo Celular

5.3 Tratamiento Celular con IL-2 exógena en líneas celulares de CaCU

5.4 Extracción de RNA Total

5.5 Cuantificación de Ácidos Nucleicos

5.6 Retrotranscripción (RT)

5.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.8 Electroforesis en gel de Agarosa Nativa

5.9 Densitometría

6. Resultados

6.1 Integridad de RNA total

6.2 RT-PCR

6.3 Electroforesis de los productos de PCR para β -Actina

6.4 Electroforesis de los productos de PCR para FAS-R

6.5 Electroforesis de los productos de PCR para TNF-R1

6.6 Electroforesis de los productos de PCR para TRAIL-R2

6.7 Electroforesis de los productos de PCR para FADD

6.8 Densitometría

6.9. Histogramas de actividad

6.10 Densitometría de los productos de amplificación para β -Actina

6.11 Histograma de actividad del gen β -Actina

6.12 Densitometría de los productos de amplificación para FAS-R

6.13 Histograma de actividad del gen FAS-R

6.14 Densitometría de los productos de amplificación para TNF-R1

6.15 Histograma de actividad del gen TNF-R1

6.16 Densitometría de los productos de amplificación para TRAIL-R2

6.17 Histograma de actividad del gen TRAIL-R2

6.18 Densitometría de los productos de amplificación para FADD

6.19 Histograma de actividad del gen FADD

7. Discusión de Resultados

8. Conclusiones

9. Reactivos y Soluciones

Apéndice I. Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR

Apéndice II. Reactivos y soluciones usadas

Apéndice III. Preparación de reactivos y soluciones usadas

10. Referencias

RESUMEN

El cáncer de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) se caracteriza por ser un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células, que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. En el año 2011, en México, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), las 3 principales causas de muerte fueron por: Enfermedades del corazón, diabetes mellitus y tumores malignos. En este último rubro INEGI reportó que en el 2010 los tumores malignos que más afectaron a la población femenina adulta de 20 años o más y que fueron hospitalizadas por este diagnóstico fueron: Cáncer de mama (24.3%), Cáncer cervicouterino (9.7%) y Cáncer de colon (3.2%); en los varones las estadísticas se concentran en torno al cáncer de próstata (7.9%), cáncer bronquio-pulmonar (4.9%) y cáncer de colon (4.6%).

Al respecto, nuestro grupo de trabajo ha centrado esfuerzos en el entendimiento y en el desarrollo de terapias en torno al tratamiento del Carcinoma de Cérvix y de Cuello Uterino (CaCU), estudiando el papel de la Interleucina 2 (IL-2) y su efecto sobre líneas celulares de este tipo de Carcinoma, prestando especial atención en dos líneas provenientes de pacientes mexicanas llamadas, CALO e INBL. Actualmente sabemos que estas últimas responden de manera diferencial ante estímulos de IL-2, dependiendo de la concentración utilizada, donde se ha visto que ante el uso de 100 UI/mL de IL-2 se inhibe la proliferación y se provocan cambios en la morfología celular, tomando cierta similitud a la de células apoptóticas (Ayala, 2005) y que a 10 UI/mL de IL-2 se observa una inducción a proliferación. También se han identificado la presencia de dos de las tres cadenas que conforman al receptor de IL-2 (RIL-2) (Alvarado, 1997). Estos resultados fueron reproducibles en cortes histológicos de modelos animales inoculados con estas líneas (Rangel-Corona et al., 1998).

Basados en estas observaciones previas, desde hace años se dio a la tarea de esclarecer los mecanismos moleculares que participan en la inhibición de la proliferación de las líneas de CaCU; CALO e INBL, a las cuales se les debe recalcar el hecho de que ambas son líneas celulares provenientes de pacientes mexicanas y por lo tanto poseedoras de un genotipo latinoamericano (Weiss-Steider et al., 1992).

Parte de los resultados obtenidos durante estos años de investigación fueron las mediciones en el incremento de la transcripción de genes reflejado en el Ácido Ribonucleico mensajero (RNAm) de múltiples moléculas claves intermediarias en el proceso de muerte celular tipo apoptótica como: Procaspasa -8 (Sierra, 2011), Procaspasa -3 (Torres, 2012) y BiDt (Masse, 2013).

Lo relevante de este estudio es que sugiere el modo por el cual la IL-2 inhibe la proliferación, al regular la síntesis de RNAm de una serie de proteínas transmembranales, ubicadas en la superficie celular, dicha regulación sensibilizaría a las células a detonar de forma extrínseca la muerte celular de tipo apoptótica, ocasionando que en la parte citoplasmática del receptor se recluten diversas proteínas adaptadoras o cople, que en consecuencia provocan la activación de los cambios bioquímicos, enzimológicos y morfológicos propios de la Apoptosis.

Por lo antes mencionado, en el presente estudio se evaluó la participación de IL-2 en la regulación de la expresión de RNAm de las proteínas iniciadoras de la muerte celular tipo apoptótica FAS-R (CD95, TNFRSF6, APO-1), TRAIL-R2 (CD262, TNFRSF10B, DR5) y TNF-R1 (CD120a, TNFR1-d2). Así como del Dominio de Muerte Asociado a FAS-R (FADD) en las líneas CALO e INBL.

Nuestros resultados indican que existen cambios significativos en la expresión del RNAm para los diferentes receptores de superficie celular, en ambas líneas celulares ante la presencia de 100 UI/mL de IL-2.

Dicha regulación positiva de RNAm denota su mayor expresión en ambas líneas celulares a las 48 Hrs de estímulo con IL-2 en FAS-R y TRAIL-R2; caso totalmente contrario para TNF-R, el cuál muestra su mínima expresión al mismo tiempo de 48 Hrs. Así bien, los resultados para la síntesis de RNAm de la proteína adaptadora con Dominio de Muerte Asociado al receptor FAS (FADD) nos muestra el mismo patrón de regulación positiva mostrado en los receptores FAS-R y TRAIL-R2. Este aumento en la expresión de FADD nos indicaría una aparente funcionalidad y la correcta actividad biológica de los receptores transmembranales de muerte FAS-R y TRAIL-R2, ya que FADD es de las primeras moléculas que interviene en la cascada de señalización que induce a muerte a las células.

De forma igual y repetitiva durante los años de este grupo de investigación se han detectado regulaciones de distintas moléculas y aspectos apoptóticos; como el aumento en la proteína Citocromo C detectado mediante microscopia confocal, la detección del fosfolípido Fosfatidilserina (PS) en la capa lipídica externa de la membrana celular, mediante la utilización del anticuerpo contra la molécula Anexina V/conjugado con el fluorocromo FitC por citometría de flujo y la fragmentación oligonucleosomal del Acido Desoxirribonucleico (DNA) por la técnica de escalera de muerte (Del Rio-Ortiz, 2013).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTERLEUCINA 2 (IL-2)

La IL-2 es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. Se describió inicialmente como un factor de crecimiento en células T y fue hasta el Segundo Taller Internacional de Linfoquinas en Suiza en el año de 1979 que se le nombra como IL-2, nombre con el que actualmente se le conoce (Morgan et al., 1976). Es producida principalmente por una sub-población de linfocitos T conocida como células TH1 (Smith, 1988). Tras la activación de los linfocitos T, se puede detectar secreción de IL-2 durante las primeras 4-8 horas, alcanzando niveles máximos a 24 - 48 horas. La secreción produce respuestas proliferativas de otros linfocitos y de más células del sistema inmune, pasados estos tiempos, disminuye la concentración de la citocina por consumo de la misma y por inhibición de su producción. Estudios muestran que IL-2 regula y produce distintos efectos en sus células blanco solo en los tiempos de transcripción genética de G1 y G2 del ciclo celular (Ullman et al., 1990).

Su gen fue transferido y clonado en 1984, lo que permitió obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante (Rosenberg et al., 1984). A partir de entonces se han desarrollado múltiples ensayos clínicos que han demostrado el efecto antitumoral de la IL-2.

La IL-2 humana es una proteína monomérica de 15 kDa, con 153 aa. (Taniguchi, et. al., 1983). Una vez traducida puede ser blanco de N y O Glicosilaciones que le ocasionan incrementos en su peso molecular que pueden variar desde los 33-55 kDa (Leonard et al., 1985). No se conocen motivos de estas glicosilaciones, ya que no afecta su actividad biológica (Rosenberg et al., 1984), pero sí provoca modificaciones en el rango de su punto isoeléctrico, que va de entre 6.6 a 8.2 (Robb & Smith, 1981). Es catalogada como una molécula hidrofóbica la cual es más estable en pH bajo; compuesta principalmente por una unión de seis hélices alfa acomodadas en una aparente conformación esférica (Brandhuber et al., 1987). El gen que codifica para la IL-2 humana se encuentra localizado en el cromosoma 4 brazo q región 26-27, contiene 4 exones y 3 intrones (Seigel et al., 1984). El primer exón codifica para el péptido señal y el comienzo de la proteína, mientras que los tres restantes para el resto de la secuencia proteica. Para su correcta actividad biológica necesita tener cuatro motivos altamente conservados a lo largo de la cadena peptídica; Ácido aspártico en la posición 20, lisina en la 35 y fenilalanina en el 42 y 124, así mismo necesita poseer un puente disulfuro entre los residuos de

cisteína 58 y 105 para estabilizar toda la estructura. Alteraciones en alguno de estos motivos inhibe la interacción con su receptor, el cual se expresa conspicuamente en células T CD4+ y células B activadas. Tras estimulación antigénica, el receptor de IL-2 (RIL-2) presentado en estos tipos celulares tiene una isoforma de alta afinidad (Takeshita et al., 1992), es decir presenta las tres cadenas proteicas α (p55) β (p70) y γ (p64) (Rebollo & Silva, 1994).

Los efectos fundamentales y mejor caracterizados de la IL-2 son los que produce sobre las células *Natural Killer* (NK) y sobre los linfocitos T CD8+. Estas poblaciones, tras incubarse *in vitro* con IL-2, en ausencia de antígenos o mitógenos, se hacen más citotóxicas contra células tumorales, lo que se define como actividad LAK (Grimm et al., 1982a; Grimm et al., 1982b). La actividad LAK es un fenómeno *in vitro* único que se diferencia claramente de otras actividades citotóxicas linfocitarias. Fisiológicamente, las células NK son las que responden más rápidamente, pero si existe suficiente IL-2 pueden responder linfocitos T e incluso otro tipo de células como los monocitos o neutrófilos (Damle et al., 1986). La destrucción de células neoplásicas o anormales por la actividad LAK forma parte del sistema de inmunidad innata independiente de antígeno.

Investigaciones más recientes señalan que en algunas clonas de linfocitos B y algunas líneas celulares de carcinomas humanos e hibridomas, también existe secreción de IL-2 y presencia del RIL-2 para señalización autocrina y paracrina (Ciacci et al., 1993; Rebollo & Silva, 1994; McMillan et al., 1995; Coventry et al., 1996; Mire & Thorpe, 1998; Rangel-Corona et al., 2010).

Como ya se vio la IL-2 por si misma posee múltiples efectos biológicos e inmunoreguladores al unirse a su receptor RIL-2, éstos son reproducibles y están bien documentados, por esta razón se ha usado como inmunoterapia para tratamiento de algunos tipos de cáncer, como metástasis pulmonares provenientes de sarcoma (Rosenberg, et. al., 1985a; Rosenberg, et. al., 1985b; Rosenberg, et. al., 1987; Rosenberg, et. al., 1989a; Rosenberg, et. al., 1989b), cáncer renal, aunque con aplicaciones limitadas (Abrams et al., 1990), neoplasias linfoides (Barca, 1997) y en modelos animales para tratar leucemias (Thompson et al., 1986), sin embargo no existe reporte alguno sobre el uso de IL-2 para el tratamiento de CaCU.

Tomando estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo demostró la presencia de las cadenas γ (p64) y β (p70) del RIL-2, que de acuerdo a la literatura conforman un receptor de afinidad media (Rebollo & Silva, 1994) y que éste es activado tanto por IL-2 exógena, así como por C-Kit ligando en células de cuello uterino asociadas al Virus del Papiloma Humano (VPH) (Rocha et al., 2004). El reporte de nuestro equipo de trabajo, fue en las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL, las cuales además de tener una

expresión diferencial de acuerdo al estadio del tumor, muestran un patrón de fosforilación de proteínas cinasas diferente al del RIL-2 de linfocitos T de donadores sanos (Rangel-Corona 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 se dio origen a la idea de que la IL-2 podría ser utilizada como una alternativa terapéutica para las pacientes con CaCU (Rangel-Corona et al., 1998; Ayala, 2005).

1.2 CARCINOMA DE CÉRVIX

El Carcinoma de Cérvix y de Cuello Uterino (CaCU) es solo uno de los más de 100 tipos distintos de cáncer y de los pocos en el cual se es capaz de identificar una lesión precursora que permita la oportuna intervención médica para prevenir que esta lesión, también llamada Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), progrese hacia cáncer invasivo. Se cree que la progresión del cáncer *in situ* hacia cáncer invasivo ocurre después de un periodo de 10 a 15 años; citológicamente es resultado de mutaciones en las células basales del epitelio escamoso en su unión con el epitelio escamocolumnar del cuello uterino; clínicamente, como ya se mencionó, se manifiesta de forma inicial a través de pequeñas lesiones precursoras, de lenta a progresiva evolución producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa; éstas primariamente evolucionan a cáncer *in situ* en grados variables, pero cuando éste se circunscribe a la superficie epitelial se considera micro-invasor y posteriormente invasor cuando se traspasa la membrana basal (Clarke-Pearson & Soper 2011).

Según el INEGI en el año del 2010 en México, las principales causas de muerte por tumores malignos en la población femenina mayor a 20 años fueron el Cáncer de Mama con 13.8% de las defunciones totales y el CaCU con 10.8%. De esta forma el CaCU se coloca como el segundo cáncer más letal entre las mujeres mexicanas. Estadísticas en este mismo año mencionan que son tres los grupos de edad más afectados. Mujeres de entre 40 a 49 años, donde mueren 10 de cada 100 mil, esta tasa incrementa a 30 de cada 100 mil en mujeres pertenecientes al grupo de edad de entre 65 a 74 años, hasta alcanzar la máxima tasa de mortalidad en mujeres mayores de 80 años en donde 55 de cada 100 mil mueren por este mal.

Es importante resaltar el hecho de que en general todas las mujeres son propensas al desarrollo de esta enfermedad sin importar el grupo de edad, pero su probabilidad aumenta considerablemente al iniciar su vida sexual, ya que se hacen más propensas al contagio por el Virus del Papiloma

Humano (VPH), principal factor implicado al desarrollo del CaCU, aunque no el único.

Hoy en día es bien sabido que la presencia de algún serotipo de VPH y el surgimiento de neoplasias intraepiteliales cervicales está presente en el 99% de los nuevos reportes de CaCU (Clarke-Pearson & Soper, 2011).

El VPH es un DNA virus de doble cadena que induce la proliferación de células epiteliales. Existen más de 100 tipos diferentes de VPH, de los cuales alrededor de 40 son los capaces de infectar al tracto genital. Cada tipo varía en cuanto a una porción de su genoma y esto ha permitido que se dividan en dos grupos. Los tipos VPH de bajo riesgo, los cuales se asocian a cambios benignos tales como condilomas y los tipos de alto riesgo o también conocidos como oncogénicos de los cuales se han reportado en alrededor del 99% de las NIC y los cánceres cervicales. El VPH tipo 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; Nazzari et al., 2006).

Los tipos oncogénicos incorporan su propio DNA dentro del genoma de las células humanas y bloquean la capacidad celular para repararse o destruirse. Todos los VPH son poseedores de distintas combinaciones de 7 genes denominados (E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7) y dos genes codificantes para unas llamadas proteínas tardías (L1-L2) que se expresan sólo después de la infección y están implicadas en la formación de la cápside de los viriones. Los genes E6 y E7 son oncogenes conocidos de los tipos de VPH de alto riesgo, ellos producen proteínas que inhiben a los genes supresores de tumores humanos; notoriamente a p53 y Rb. La proteína E6 se enlaza e inactiva a p53, la cual es responsable de la reparación del DNA dañado o de la apoptosis en las células humanas dañadas. La proteína E7 se enlaza primariamente a la proteína Rb, lo que permite la liberación del factor de transcripción E2F que es responsable del paso de G1 hacia la fase de síntesis de DNA o fase S. Estas oncoproteínas alteran la regulación de la proliferación celular, promoviendo el crecimiento tumoral y la transformación maligna. Sin embargo, E6 y E7 tienen propiedades de Trans-Regulación de genes celulares independientes de su asociación con p53 y Rb que también contribuyen al avance del proceso neoplásico (Alonso et al., 2000).

1.3 CLASIFICACIONES DEL CaCU

Las alteraciones del epitelio maduro anormal han sido motivo de numerosas clasificaciones. La primera nomenclatura se realizó en 1930 y contempla como criterio de clasificación a las displasias, dividiendo entre leves, moderadas y severas, refiriéndose a las lesiones precancerosas que culminan con el carcinoma *in situ*. En 1968 se acuña el concepto de

Neoplasia Cervical Intraepitelial (NIC) y se le tipifica a diferentes grados: NIC I, NIC II y NIC III, este último denominado carcinoma in situ. Una tercera clasificación es la desarrollada en 1988 y se conoce como el Sistema Bethesda, ésta hoy en día es la más usada en laboratorios de análisis clínicos en México y el mundo, ya que es sobre la que se basa el informe de resultados de la prueba de Papanicolaou, única prueba de tamizaje y prevención frente al CaCU. Según este sistema, las muestras sin anomalías celulares se reportan como “negativas de lesión o negativas de cáncer Intraepitelial”. En un informe negativo de la prueba de Papanicolaou se puede incluir además, algunos resultados benignos o no cancerosos, como infecciones comunes o inflamaciones (Barbara & Zoschnick, 2001).

El Sistema Bethesda clasifica por separado las anomalías de las células escamosas y el de células glandulares. En el caso de células escamosas los criterios son separados por morfologías de células individuales o por el de lesiones visibles, las cuales en ambos casos varían de las más leves a las más graves. Las células escamosas atípicas, (*Atypical Squamous Cells, ASC*), son el resultado anormal más común de las pruebas de Papanicolaou.

Las anomalías de las células y lesiones del tipo escamosas se dividen en las siguientes categorías

- **ASC-US**, células escamosas atípicas de significado indeterminado, (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US*). Las células escamosas no parecen completamente normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares. Para las mujeres con ASC-US, se puede analizar una muestra de células en busca de tipos de VPH de los tipos oncogénico. Si hay algún serotipo de VPH presente, por lo general, se hará una prueba de seguimiento. Por otro lado, un análisis negativo de VPH puede ofrecer certeza de que no hay cáncer o un estado precanceroso presente.
- **ASC-H**, las células escamosas atípicas de alto grado, (*Atypical Squamous Cells High, ASC-H*) no pueden excluir una lesión Intraepitelial escamosa de alto grado. Las células no parecen normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares. Es posible que exista un riesgo mayor de que las lesiones ASC-H sean precancerosas en comparación con lesiones ASC-US.
- **LSIL**, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado, (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions, LSIL*), se consideran anomalías leves causadas por una infección por VPH de bajo grado, que significa que se han observado los primeros cambios en el tamaño y en la forma de las células. Intraepitelial se refiere a la capa de células que forma la superficie del cérvix. Las LSIL a veces se clasifican como displasias leves. Éstas también se pueden clasificar como NIC.

- **HSIL**, lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado, (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions, HSIL*), son anomalías más graves que tienen una probabilidad mayor de que se conviertan en cáncer si no son tratadas. De alto grado significa que hay cambios más marcados en el tamaño y en la forma de las células anormales (precancerosas) y que las células se ven muy diferentes de las células normales. Las HSIL comprenden lesiones con displasia moderada o grave y carcinoma in situ. A veces las lesiones HSIL se clasifican como NIC-2, NIC-3, o NIC-2/3 en donde las células escamosas anormales han invadido más profundamente el cérvix, así como otros tejidos u órganos.

Las anomalías de las células glandulares se dividen en las siguientes categorías:

- **AGC**, células glandulares atípicas, (*Atypical Glandular Cells, AGC*), significan que las células no parecen normales, pero los médicos no están seguros del significado de los cambios celulares y se clasifican en Adenocarcinomas.

- **AIS**, adenocarcinoma endocervical in situ, (*Endocervical Adenocarcinoma In situ, AIS*), significa que las células precancerosas se encuentran solamente en el tejido glandular del cérvix. El adenocarcinoma incluye no solamente el cáncer del canal endocervical mismo, sino también, en algunos casos, el cáncer endometrial, el cáncer extrauterino y otros cánceres (Barbara & Zoschnick, 2001).

Cualquier resultado atípico en la clasificación de la muestra, como morfología anormal, lesiones visibles o cualquier otro aspecto inusual, es probable que desencadene un crecimiento y una proliferación incontrolada de estas células, a las cuales se les deberá eliminar; como ya se ha mencionado hoy en día existen distintas formas de hacerlo, desafortunadamente son invasivas o tóxicas. Lo ideal sería encontrar métodos que induzcan a las células a morir por sus propias rutas naturales.

1.4 MUERTE CELULAR

La vida y la muerte son temas que nadie se toma a la ligera. En las células la muerte es tan importante como la supervivencia y la proliferación, esto para regular un complejo proceso conocido como homeostasis de tejido; desequilibrios de éste, puede conducir al organismo a severos problemas en el desarrollo fisiológico normal, enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes y quizá en el peor de los casos a cáncer.

La muerte de las células es un proceso reconocido desde hace más de un siglo, pero su importancia y los mecanismos moleculares que la desencadenan y modulan, apenas están siendo aclarados (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

En las últimas dos décadas hemos sido testigos del rápido y sustancial avance en torno a la investigación en muchos campos de la ciencia. La Biología Molecular y la Bioquímica no han sido la excepción, al desarrollar técnicas y ensayos cada día más sensibles y específicos que actualmente son piezas medulares y de rutina en los laboratorios dedicados al estudio de la biología de las células. Como resultado ha habido una explosión en la información que por un lado nos ha ampliado drásticamente la comprensión más profunda de las distintas vías moleculares celulares y por otro ha ocasionado confusión. El fenómeno de la muerte celular no ha sido la excepción y para infortunio la comunidad científica no se ha adoptado alguna clasificación que ayude a la tipificación sistemática de las distintas modalidades de muerte celular que existen y a la correcta nomenclatura en el tema (Galluzzi et al., 2012).

Teniendo conciencia de este enorme problema, nuestro grupo de trabajo se apegó en este estudio de muerte celular, de acuerdo a las definiciones y recomendaciones del *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD), el cual principalmente basa sus tipificaciones en características bioquímicas mensurables (Galluzzi et al., 2012).

1.5 APOPTOSIS

La apoptosis es solo uno de los nueve morfotipos de muerte celular evaluados y tipificados por el NCDD (**Tabla 1**) (Galluzzi et al., 2012). El término fue acuñado por Kerr JF en 1972 (Kerr et al., 1972), pero se tienen reportes de algunos años más atrás, en donde se describen morfologías celulares muy parecidas a las descritas y aceptadas por el grueso de la comunidad científica hoy en día. Es el tipo de muerte celular más tipificado en la literatura y al cual se le ha englobado como la única Muerte Celular Programada (MCP) incorrectamente (Kroemer et al., 2009).

Tabla 1. Clasificación funcional de la regulación de los modos de muerte celular según la NCDD (Galluzzi et al., 2012)

Morfotipo	Características Bioquímicas principales	Dependencia de Caspasas	Acciones de Inhibición
Anoikis	Desregulación de EGFR, Inhibición de ERK1, baja o ausencia de señalización o participación de β 1-Integrina, sobreexpresión de Bim y activación de Caspasa -3 ó (-6 y -7)	++	Sobreexpresión de BCL-2 e inhibición por Z-VAD-fmk
Autofagia	Prenilación por lípidos de MAP1LC3 y degradación de SQSTM1	--	Inhibidores de VPS34 e inhibición genética de AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 o BCN1
Apoptosis Intrínseca Caspasa-Dependiente	MOMP y disipación irreversible del $\Delta\psi_m$	++	Sobreexpresión de BCL-2 e inhibición por Z-VAD-fmk
Apoptosis Intrínseca Caspasa-Independiente	Liberación de proteínas al espacio intermembrana mitocondrial e inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial	--	Sobreexpresión de BCL-2
Cornificación	Activación de Transglutaminasas y activación de Caspasa -14	+	Inhibición genética de TG1, TG3, TG5 y Caspasa -14

Entosis	Activación de RHO y ROCK-1	--	Inhibición genética de inhibidores lisosomales o Metalotioneínas 2A
Apoptosis Extrínseca por Receptores de Muerte	Señalización de los receptores de muerte, Activación de Caspasa -8 (-10), Escisión de BiD, MOMP y activación de Caspasa -3 (-6 y -7)	++	Expresión de CrmA, inhibición genética de Caspasa -8 y -3 e inhibición por Z-VAD-fmk
Apoptosis Extrínseca por Receptores de Dependencia	Señalización del receptor de dependencia, activación de PP2A, activación de DAPK-1, activación de Caspasa -9, activación de Caspasa -3 (-6,-7)	++	Inhibición genética de Caspasa -9 y -3, inhibición genética de PP2A e inhibición por Z-VAD-fmk
Catástrofe Mitótica	Activación de Caspasa -2 (en algunos casos), activación de P53 o P73 (en algunos casos) y arresto mitótico	--	Inhibición genética de P53 (en algunos casos) e Inhibición farmacológica o genética de Caspasa -2 (en algunos casos)
Necroptosis	Señalización de receptores de muerte, inhibición de caspasas y activación de RIP-1 y/o RIP-3	--	Inhibición genética de RIP-1/RIP-3 por administración de necrostatina-1
Netosis	Inhibición de Caspasas, oxidación de NADPH y liberación de NET (en algunos casos)	--	Inhibición de Autofagia, inhibición de la oxidación de NADPH e inhibición genética de PAD-4
Partanatos	Acumulación de PAR mediada por PARP-1, disipación irreversible del $\Delta\psi_m$, agotamiento de ATP y NADH, unión de PAR a AIF y	--	Inhibición genética de AIF e inhibición farmacológica o genética de PARP-1

	translocación al núcleo de AIF		
Piroptosis	Secreción de IL-1 β e IL-18 y activación de Caspasa -1 y -7	++	Inhibición genética de Caspasa -1 e inhibición por Z-YVAD-fmk

Abreviaturas por sus siglas en ingles: $\Delta\psi_m$, Potencial Transmembranal de la Mitocondria; **AIF**, Factor Inductor de la Apoptosis; **CrmA**, Modificador de la Respuesta de Citocinas A; **DAPK1**, Proteína Cinasa 1 Asociada a Muerte; **EGFR**, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; **ERK1**, Cinasa 1 Regulada por señales Extracelulares; IL, Interleucina; **MAP1LC3**, Proteína Asociada a los Microtúbulos de la Luz en la Cadena 1; **MOMP**, Permeabilización de la Membrana Mitocondrial Externa; **NET**, Trampa Extracelular de Neutrófilos; **PAD4**, Peptidil-arginina deiminasa 4; **PAR**, Poli ADP-Ribosa; **PARP1**, Poli ADP-Ribosa Polimerasa ; **PP2A** , Proteína Fosfatasa 2A; **ROCK1**, Proteína Cinasa 1 asociada a una Hélice por R-OH; **SQSTM1**, Sequestosoma 1; **TG**, Transglutaminasa; **Z-VAD-fmk**, N-Benciloxycarbonil - Val - Ala - Asp - Fluorometilcetona; **Z-YVAD-fmk**, N-benciloxycarbonil - Tyr - Val - Ala - DL - Asp - Fluorometilcetona (Galluzzi, 2012). Tabla tomada de artículo “Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee of Cell Deth 2012”.

La Apoptosis posee una gama de características morfológicas muy conspicuas como redondeamiento y reducción del volumen celular o “Picnosis” de hasta de un 30%, esto provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula debido a la inhibición de los sistemas de transporté de los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (Kurosaka et al., 2003), condensación de la cromatina en la periferia del núcleo (Savill & Fadok, 2000), nulas modificaciones ultraestructurales en orgánulos citoplasmáticos, formación de cicatrices en la membrana celular, mantenimiento de integridad intracelular hasta etapas finales del proceso y presencia de fagocitos residentes en inducciones *in vivo* (Kroemer et al., 2009). Es importante recalcar que hoy en día la manifestación de estos rasgos morfológicos no son criterios suficientes para poder clasificar esta muerte celular y solo deben de ser tomados como rasgos adjuntos de la heterogeneidad bioquímica (Galluzzi et al., 2012). Entre estos rasgos bioquímicos adjuntos, podemos mencionar la fragmentación oligonucleosomal también denominada, Cariorrexis, esto debido a endonucleasas que escinden el DNA en regiones ricas en Adenina/Timina (A/T) dando fragmentos de entre 80-200pb. Esto produce el característico patrón de DNA en escalera cuando se analiza en una electroforesis (Guimaraes & Linden, 2004); otro rasgo bioquímico notable es que el fosfolípido Fosfatidilserina (PS), presente en la cara interna de la membrana plasmática se transloca al exterior de la misma, además se ha propuesto que una Lisolectina derivada de la Fosfatidilcolina de nombre Lisofosfatidilcolina (LPC) hace el mismo movimiento y actúa como atrayente químico de reconocimiento para

células fagocíticas (Leyton & Quest, 2004), así mismo se ha visto la activación de una intrincada red de moléculas y proteínas que participan en el proceso como adaptadoras o segundos mensajeros, para lograr la escisión y consecuente activación de una a una familia de cisteína proteasas llamadas, Caspasas, que se consideran los efectores centrales del proceso apoptótico (Vogelstein & Kinzler, 2004), aunque no los únicos (Galluzzi et al., 2012). Fisiológicamente la Apoptosis se encarga de eliminar a las células genéticamente dañadas, viejas, infectadas por virus o que se encuentran inmersas en alguna fase de eliminación del desarrollo embrionario natural (Mazumder et al., 2004).

Actualmente se conocen dos rutas por las cuales se puede desencadenar la apoptosis, éstas se clasifican por el lugar de origen de donde provenga el estímulo inductor, clásicamente estas vías son conocidas como “Extrínseca” e “Intrínseca”. Hoy en día sabemos que estas dos rutas no son homogéneas bioquímicamente y pueden subdividirse de acuerdo a algunos criterios enzimológicos. La vía intrínseca de la Apoptosis suele separarse en dependiente e independiente de Caspasas (Galluzzi et al., 2012), mientras que la vía extrínseca puede ser clasificada dependiendo de la familia de receptores que de origen a la vía de señalización molecular. Existen clasificadas dos familias detonadoras de señal. La primera y mayormente estudiada es la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (**Fig. 1**) a la que pertenecen los receptores FAS-R, TNF-R1, DR-3, DR-6, EDA-R, NGF-R, TRAIL-R1 y -R2 (Xiao-Ming & Zheng, 2003). La segunda familia es la de los receptores de Netrina-1 a la que pertenece la proteína UNC5A-D, a la cual se le atribuye un nuevo mecanismo regulador de la apoptosis en Carcinoma Colorrectal (DCC) (Mehlen & Bredesen, 2011).

La muerte celular en Biomedicina es esencial para evitar la formación de masas tumorales, evitar enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas y su desregulación se cree está involucrada en la patogénesis de muchas otras enfermedades humanas mas. En el Cáncer el proceso de muerte se vuelve imperfecto por defectos en la expresión de oncogenes o genes supresores de tumores, así como por la incorrecta función de proteínas Anti-Apoptóticas y Pro-Apoptóticas contribuyendo a la supervivencia y dispersión del tumor (Shirley et al., 2013).

Así mismo durante años, la tendencia en la investigación en torno al cáncer ha sido las de generar agentes que actúen o ataquen las vías de supervivencia y proliferación implicadas en la formación y progresión de

las masas tumorales, por otro lado de algunos años a la fecha ha iniciado un interés creciente en encontrar maneras de restablecer las rutas naturales de muerte celular (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

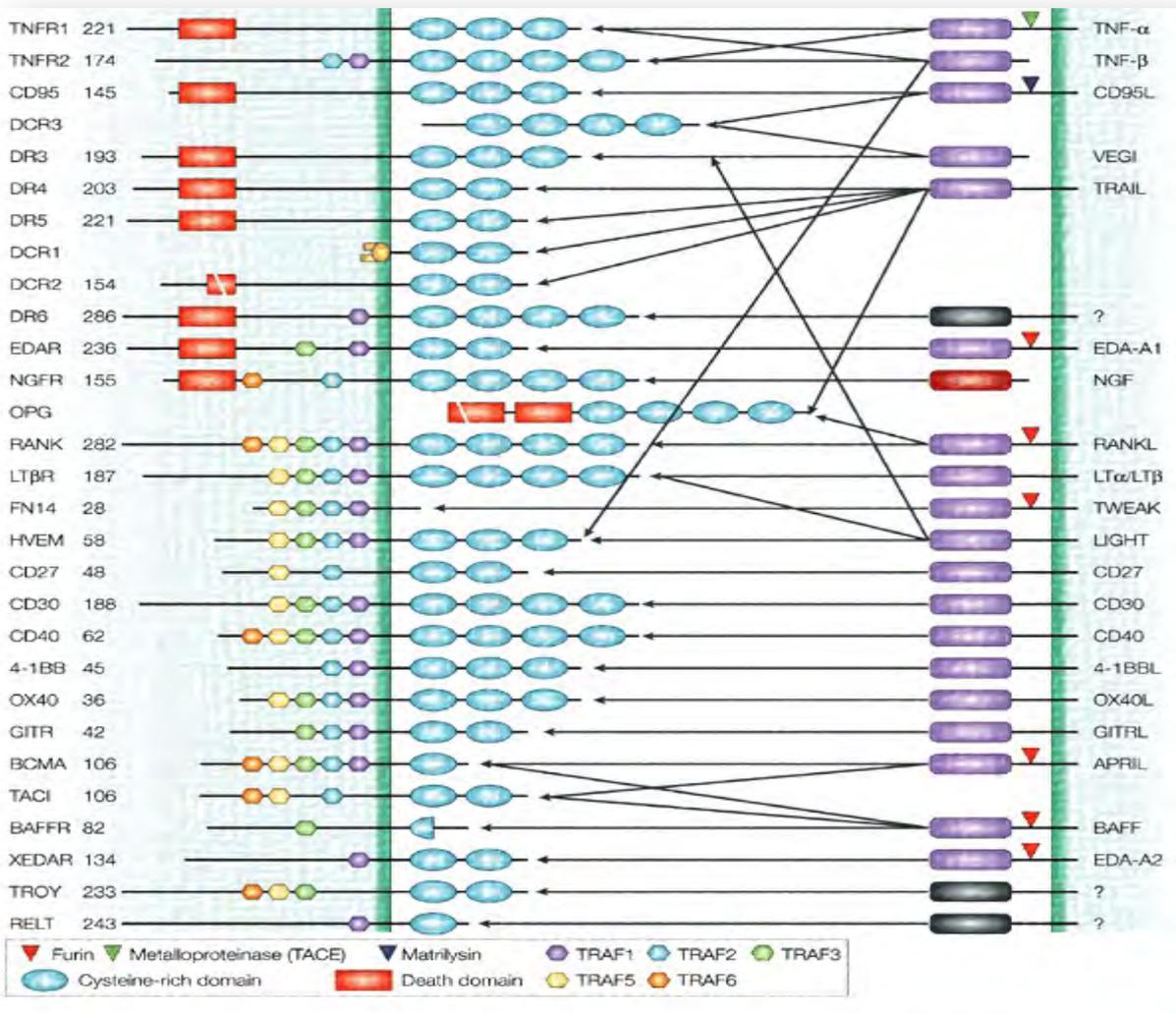


Figura 1. Representación esquemática de los receptores y ligandos de la superfamilia de proteínas TNF (Aggarwal, 2003). Todos los miembros pertenecientes a esta superfamilia son clasificados debido a homologías de identidad en un 20-30% de aminoácidos en la región C-terminal con el ligando del TNF, estos residuos que comparte entre todos los integrantes son los responsables de la unión con el receptor. Los ligandos relacionados al TNF, son inductores de apoptosis por excelencia y presentan un dominio de muerte en la parte intracelular del receptor. La mayoría de los miembros de la superfamilia de TNF se liberan de la superficie celular por proteólisis a través de proteasas distintas, todos los ligandos escindidos a excepción de la Linfotoxina-alfa ($LT\alpha$) y el inhibidor del crecimiento celular endotelial vascular (VEGI), son proteínas multipaso o de tipo II. A diferencia de los ligandos, los receptores de la superfamilia TNF (TNF-R's) se caracterizan por ser proteínas transmembrana de tipo I. Hasta ahora, ocho receptores han sido clasificados como de muerte, por contener un dominio de muerte (DD) que ha sido identificado induce Apoptosis a las células, estos son el receptor DR1 (también conocido como TNF-R1), DR2 (CD95 o FAS-R), DR3, DR4 (también conocido como TRAIL-R1), DR5 (también conocido como TRAIL-R2), DR6, EDA-R y el factor de crecimiento del nervio receptor (NGF-R).

1.6 VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

El término de Apoptosis extrínseca se ha utilizado ampliamente para indicar los casos de muerte celular apoptótica que son inducidos por señales de estrés extracelulares, que son detectadas y propagadas por receptores transmembranales (Thome et al., 1997; Schulze-Osthoff et al., 1998; Wajant, 2002; Schutze et al., 2008; Mehlen & Bredesen, 2011). Éstos tienen la característica de ser de tipo 1 o unipaso, esto significa que sólo atraviesan a la membrana celular en una sola ocasión. Todos los Receptores de Muerte (DR) presentan una característica que los homologa, ésta es la presencia de un dominio de muerte (DD) en la cola carboxilo terminal de la región citoplasmática, que tiene una longitud de aproximadamente 60-80 aminoácidos y contiene islas ricas en cisteína (Boldin et al., 1995; Schulze-Osthoff et al., 1998).

La apoptosis extrínseca es iniciada tras la unión de ligandos específicos, tales como FAS ligando (FASL), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) o el miembro 10 de la subfamilia del TNF (TNFSF10/APO2L), también conocido como TRAIL-L a los receptores de muerte FAS-R/CD95-R, TNF-R1 y TRAIL-R, -R2, respectivamente. Por otra parte, se tienen registro de que estos receptores pueden ser activados mediante la unión de anticuerpos monoclonales específicos, citocinas (Xiao-Ming & Zheng, 2003) o moléculas afines capaces de ocasionar el estrés extracelular (Elumali et al., 2012). Es importante mencionar que hoy en día se conocen prototipos de señalización que conducen a la apoptosis extrínseca en ausencia de ligando mediante el montado espontaneo del Dominio de Ensamblaje Pre-Ligando (PLAD) o también conocido como triplete de activación, el cual es parte esencial de los cambios conformacionales, esta ordenación trimerica que deberán adoptar los receptores, detonara la señalización inductora de muerte aunque de forma muy débil (Siegel et al., 2000). Cualquiera que sea la forma de activación de alguna de estas proteínas, se sabe que yuxtaponen sus dominios de muerte citoplasmáticos para mediar la oligomerización del receptor, esto implica el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras que proporcionan el enlace entre el receptor y los efectores de la muerte celular.

Proteínas reclutadas por los DD incluyen; al Receptor de Interacción Proteína- Cinasa 1 (RIPK1) Dominio de Muerte Asociado a FAS-R (FADD), Dominio de Muerte Asociado a TNF-R1 (TRADD), entre otras. La adopción de estas proteínas requiere la eliminación o ubiquitinización de proteínas

inhibidoras de la apoptosis como, múltiples isoformas de c-FLIP (Thome et al., 1997; Budd et al., 2006), proteínas Inhibidores de Apoptosis (IAP's), ubiquitinización de ligasas E3 (Deveraux et al., 1998), entre otras. El blanco principal de estas proteínas anti-apoptóticas es interferir con la activación de Caspasas o con la síntesis de Procaspasas iniciadoras -8 ó -10 (Boldin et al., 1996; Wang et al., 2001).

El complejo supramolecular resultante de esta eliminación y subsecuente reclutamiento se ha denominado, complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC, por sus siglas en ingles), el cual constituye la plataforma que regula la activación de las Caspasas iniciadoras -8 ó -10 (Kischkel et al., 1995; Muzio et al., 1996).

Es de destacar que cada receptor descrito a la fecha posee su propia vía canónica de señalización, pero las proteínas mencionadas anteriormente son homologas (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

FAS RECEPTOR (CD95/APO-1)

Es una proteína de superficie celular glicosilada, que consta de entre 325-335 aminoácidos, posee un peso molecular de 45-52 kDa. El gen que codifica para este receptor se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10. Se expresa de forma ubicua en diversos tejidos, pero es particularmente abundante en el timo, hígado, corazón, riñón, y en los linfocitos T maduros activados. Existe una estrecha regulación de la apoptosis mediada por FAS-R/FAS-L, la cual de forma fisiológica es esencial para el adecuado equilibrio de las células. FAS-R se localiza en la membrana plasmática, así como en el citoplasma y en el complejo de Golgi y la red Trans-Golgi (Bennet et al., 1998; Sodeman et al., 2000). La translocación de FAS-R es mediada por vesículas hacia la superficie de la célula y se ha observado que tras cierta estimulación de células para aumentar la síntesis de FAS-R, también se regula la densidad del ligando en el plasma sanguíneo, pero evitando las activaciones espontáneas (Sodeman et al., 2000; Feng & Kaplowitz, 2000). Se tienen reportes en linfocitos de que la expresión o la activación de la apoptosis por FAS-R es modulada por la glicosilación del mismo receptor, así como por el nivel transcripcional mediante la regulación de la expresión del mismo (Peter et al., 1995). Esta regulación podría estar ocasionada por la aparente presencia de sitios de unión en las posiciones 286 a 295 del gen promotor

de FAS-R a factores de transcripción como NF- κ B, esto regularía la expresión de FAS-R, sin necesidad de pasar por un proceso de maduración (Chan et al., 1999). La proteína p53 también es importante en la regulación de FAS-R/FASL, ya que se encuentra dentro del primer intrón del gen que modula al receptor y coopera con tres secuencias en el promotor del ligando, esto regula el alza tanto del receptor de FAS y la expresión de FAS ligando durante la apoptosis inducida por fármacos en las líneas celulares de carcinoma hepatocelular y leucémicas (Friesen et al., 1996; Muller et al., 1997; Muller et al., 1998).

FAS LIGANDO (CD95-L/Fas-L)

FAS-L (CD95-L) es una proteína que se puede presentar de forma soluble y transmembranal, esta última tiene un peso aproximado a los 40 kDa y tiene una estructura tipo II o multipaso con una distribución parecida a un homotrímeros (Suda et al., 1993). Se expresa en la superficie celular de las células T activadas y, junto con su receptor, juega un papel importante en el mantenimiento de los linfocitos T periféricos y en la homeostasis de linfocitos B, así como en la muerte de las células dañinas, tales como células infectadas por virus o células de cáncer (Kagi et al., 1994; Lowin et al., 1994; Berke, 1995). FAS-L puede ser escindida proteolíticamente entre sus residuos de Serina 126 y Leucina 127 por una metaloproteasa en su región extracelular, lo que genera una forma recortada soluble cuya actividad biológica sigue siendo controvertida (Schneider et al., 1998), aunque se le ha descrito capacidad de inducción de Apoptosis. Sin embargo, se tienen reportes de altos niveles séricos de FAS-L soluble en Hepatitis, SIDA y varios tipos de tumor sin consecuencias aparentes (Tanaka et al., 1996). Otros estudios han demostrado que la capacidad de inducir apoptosis con la forma proteica soluble es aproximadamente 1,000 veces menos efectiva en comparación con el FAS-L unido a membrana, proporcionando una explicación para la ausencia de daño tisular en enfermedades asociadas con los elevados niveles circulantes de FAS-L (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998; Shudo et al., 2001).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR FAS

Tras la activación de FAS-R por cualquiera de sus distintas maneras, la proteína se auto conduce hacia la formación de microagregados triméricos de receptor, posteriormente se da el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD junto con MORT-1 (Mediadora 1 de la Toxicidad Inducida por el Receptor) (Wallach et al., 1999). La proteína MORT-1 es bastante ubicua en el citoplasma de muchos tipos celulares y posee un peso aproximado a los 28kDa, en su extremo C - terminal posee un Dominio de Muerte (DD) y en el extremo N - terminal presenta un Dominio Efecto de Muerte (DED). FADD se une al DD del receptor a través de su DD análogo, mientras que su DED es intermediario para la auto asociación con MORT-1 y la unión a Procaspasa -8. El reclutamiento y la acumulación de Procaspasa -8 da como resultado al Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC, por sus siglas en inglés) y con él, la activación hacia Caspasa -8 a través de escisiones auto proteolíticas, y así mismo el inicio de la señal de Apoptosis. Procaspasa -10 también ha demostrado participación para ser reclutada y activada en el DISC de FAS-R. Estudios recientes han demostrado que ambas Procaspasas -8 y -10 se activan con una cinética similar y ambos pueden iniciar la apoptosis independientemente una de otra (Kischkel et al., 2001; Wang et al., 2001).

Algunas proteínas codificadas por genes virales son capaces de prevenir la Apoptosis mediante la inhibición de Caspasas. Uno de los inhibidores más potentes de la Caspasa -8, es la Serpina viral CrmA (Citocina de Respuesta Modificadora-A), una toxina producida por el virus de la viruela en vacas, que bloquea la apoptosis mediante la unión a la proteasa en su forma activa, evitando de este modo la activación de Caspasas efectoras.

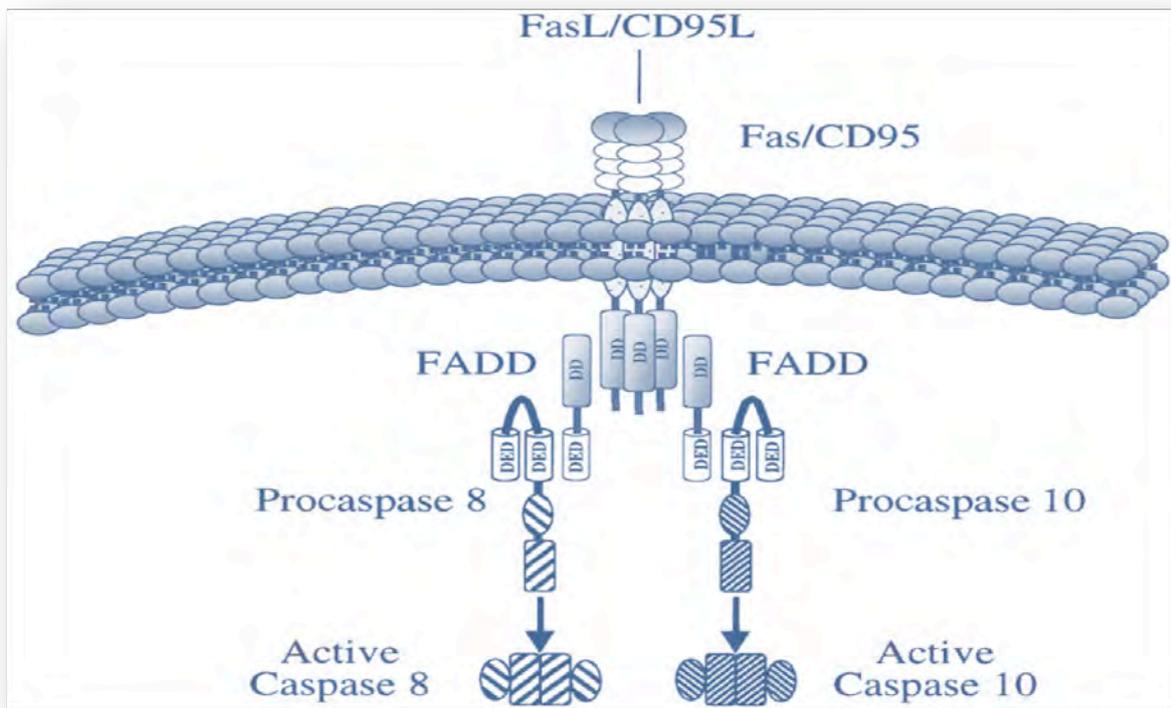


Figura 2. Representación esquemática de la vía de señalización canónica de FAS-R, provocada tras el acoplamiento de FAS-L al receptor (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

RECEPTORES TNF

El sistema de señalización de los receptores TNF, se compone de dos receptores distintos, el TNF-R1, también llamado p55 o CD120a y el TNF-R2, también llamado p75 o CD120b, así como de tres ligandos, la primera, una unidad inmersa en la membrana celular, llamada de TNF- α o mTNF- α , el segundo es el TNF- α soluble o sTNF- α y el tercero, un derivado soluble de linfocitos, usado como citocina, para señalización autocrina o paracrina, conocido como LT α o también llamado TNF- β (Wallach et al., 1999). Tanto TNF-R1 y TNF-R2 son proteínas transmembranales de tipo I que contienen en su región extracelular, dominios ricos en aminoácidos sulfurados, que reconocen al TNF ligando, además de una región citoplasmática, solo presente en el TNF-R1, que posee el DD y por lo tanto, se describe como el único mediador de la señal apoptótica. Ambos receptores se expresan de forma generalizada en las células, sin embargo, la expresión de TNF-R1 parece ser constitutivamente alta, mientras que la expresión de TNF-R2 está regulada de manera inducible por una serie de estímulos extracelulares. TNF-R1 y TNF-R2 interactúan con las dos isoformas de TNF- α , así como con LT α , sin embargo TNF-R1 parece ser el

único responsable de la señalización activada por TNF- α , en cualquiera de sus distintas formas para la mayoría de tipos de células. Estudios *in vivo* en modelos de ratón knock-out para TNF-R2 mostraron que éste es esencial para la apoptosis inducida por el TNF, pero sólo en células infectadas por patógenos bacterianos (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

TNF- α

El Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) fue originalmente llamado así por su capacidad de provocar necrosis hemorrágica en tumores de ratón trasplantados y por su citotoxicidad selectiva para las células transformadas. En años posteriores, al TNF- α se le describieron papeles claves en la modulación de la inflamación y la inmunidad. Por otra parte, el TNF- α es capaz de inducir la proliferación y la diferenciación de muchos otros tipos celulares. Se produce principalmente por macrófagos, monocitos, linfocitos B, fibroblastos, hepatocitos y linfocitos T, en respuesta a infecciones o condiciones inflamatorias. Como ya se mencionó, TNF- α se expresa como una proteína transmembranal e integral de 26 kDa de tipo II con estructura homotrimérica. De este precursor, una forma soluble de 17 kDa que se libera después de la escisión por una enzima metaloproteasa convertidora de TNF- α denominada TACE (Black et al., 1997). Tanto soluble o unida a membrana TNF- α es biológicamente activo, y mientras la forma soluble actúa como una molécula efectora a distancia de la célula productora, la forma unida a membrana probablemente tiene un papel específico en las respuestas de TNF- α localizadas (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

SEÑALIZACIÓN DE TNF - R1

Las señales intracelulares procedentes de la activación de TNF-R1 son extremadamente complejas y pueden conducir a múltiples respuestas en las células, tan opuestas como que ocasione proliferación celular, inflamación o la muerte celular. Sin embargo, la mayoría de las células tratadas con TNF- α , no se someten a Apoptosis, lo que sugiere el predominio de señales de supervivencia sobre las señales de muerte en circunstancias normales y el constante requerimiento de proteínas supresoras de estímulos apoptóticos. La expresión de estas proteínas anti apoptóticas es probable que sea controlada por la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$, ya que la inhibición de ésta sensibiliza a las células a una inducción de apoptosis con TNF- α .

Una vez comprometido el receptor TNF-R1 a una señalización apoptótica, éste sufre cambios conformacionales en su dominio intracelular, que ocasiona el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras citoplasmáticas, éstas poseen un DD homólogo a través del cual interactúan con el receptor. Una de las peculiaridades que tiene TNF-R1 es que es el único receptor capaz de reclutar a una molécula con DD homólogo capaz de detener el estímulo apoptótico. Esta es la proteína Silenciadora de Dominios de Muerte (SODD, por sus siglas en inglés, que de una manera muy efectiva evita la auto agregación de otras proteínas con DD apoptóticas y el inicio de la señalización (Jiang et al., 1999). De no ser reclutada SODD, TNF-R1, permite que la proteína adaptadora TRADD (Dominio de Muerte Asociado a TNF-R) se una al DD del receptor. TRADD funciona como una proteína de acoplamiento que recluta a varias moléculas de señalización para el receptor activado, tales como FADD, TRAF-2 (Factor 2 de asociación a TNF-R), RIP (Proteína de Interacción con el Receptor) y RAIDD (RIP asociada por ICH-1 a proteína CED-3 homóloga con Dominio de Muerte). Estas proteínas no tienen actividad enzimática, a excepción de RIP, que posee actividad cinasa de Serina- Treonina, aunque el papel de ésta aun falta por esclarecerse.

RIP si se une a RAIDD activa una muerte mediada por el reclutamiento de Caspasa -2 (Duan & Dixit, 1997). RIP también puede asociarse con TRAF-2 y estimular vías de supervivencia (Wajant & Scheurich, 2001). La primera es mediada por señales a través de la activación de la proteína cinasa NIK (Cinasa de $\text{NF-}\kappa\beta$), que activa el complejo IKK que consta de las proteínas IKK (IKK1), IKK β (IKK2) e IKK γ o (NEMO), esto conduce a la fosforilación del inhibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, lo que permite a $\text{NF-}\kappa\beta$ trasladarse al núcleo e iniciar la transcripción de sus genes diana. La segunda ruta implica la Proteína Activada por Mitógenos (MAPK) que activa a JNK y esto consecuente a MEKK-1 (Proteína Activada por Mitógeno/ERK Cinasa-1) y JNKK (JNK Cinasa). Estas activan varios factores de transcripción, incluyendo c-Jun, ATF-2 (Factor Activador de la Transcripción 2) y AP-1. Además se ha demostrado que TRAF-2 se unen a las proteínas anti apoptóticas IAP's -1 y -2, para formar un complejo receptor de señalización que inhibe la vía apoptótica, posiblemente facilitando la ubiquitinización y la degradación de la Caspasa -8 (Huang et al., 2000; Wang et al., 1998).

La única vía conocida de inducción de muerte celular Apoptótica es la reclutación de FADD para la subsecuente activación de Caspasa -8, a través

de una vía similar, aunque probablemente no idéntica, a la desencadenada por FAS-R (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

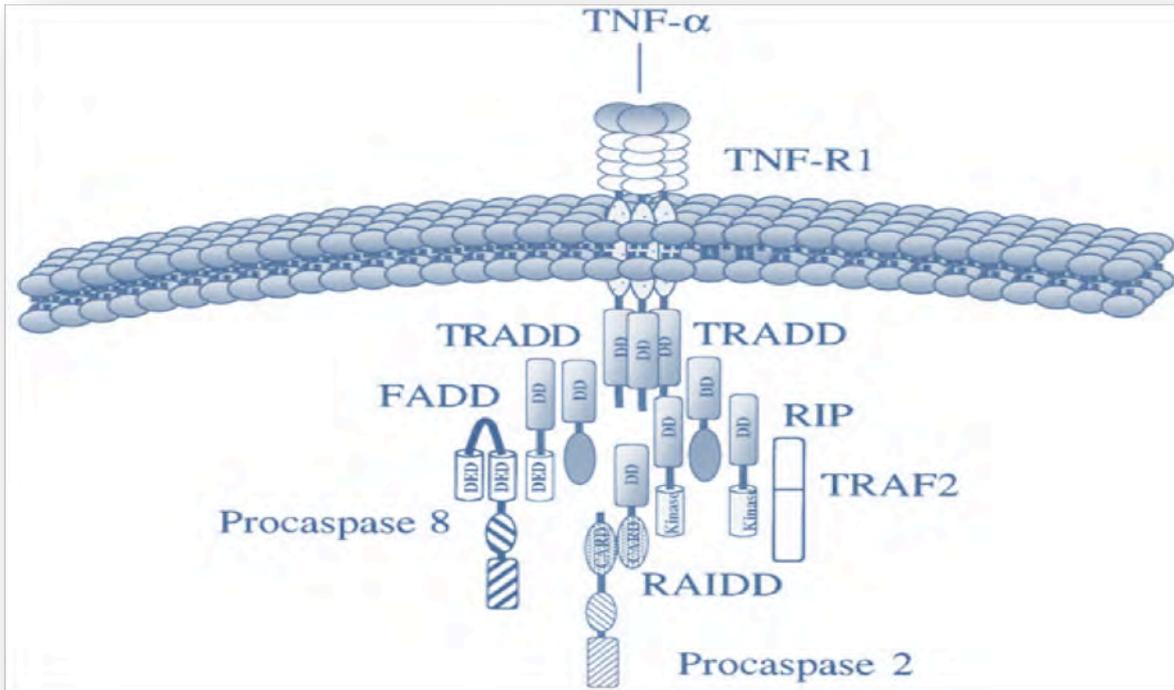


Figura 3. Representación esquemática de la vía de señalización canónica de TNF-R1/CD120a, provocada tras el acoplamiento de TNF-α al receptor (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

RECEPTORES TRAIL

Los receptores TRAIL también llamados, afines por APO-2-L o TRAIL-L, son un conjunto de cinco isoformas proteicas afines al mismo ligando. Dos de ellos, TRAIL-R1, también llamado DR4 y TRAIL-R2, o DR5, *Killer* o TRICK2, se consideran receptores de muerte reales, esto debido a que presentan dos dominios ricos en cisteína en su región citoplasmática, mejor conocidos como dominios de muerte o DD, que permiten transducir la señal apoptótica. TRAIL-R1 se expresa en la mayoría de los tejidos humanos, incluyendo el bazo, timo, hígado, leucocitos de sangre periférica, linfocitos T activados, intestino delgado y algunas líneas de células tumorales (Golstein, 1997). La expresión de TRAIL-R2 tiene una distribución ubicua tanto en tejidos normales y líneas celulares tumorales, pero es particularmente alta en el bazo, leucocitos de sangre periférica, y linfocitos activados. Otros dos receptores TRAIL-R3 y TRAIL-R4 conocido,

son los llamados receptores señuelo. Aunque son bastante similares a TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en sus regiones extracelulares y transmembrana, TRAIL-R3 y TRAIL-R4 carecen de un dominio de muerte, o poseen un dominio de muerte no funcional, por lo tanto, la unión de TRAIL ligando a estos receptores no provoca inducción a Apoptosis. De igual forma la transcripción de TRAIL-R3 y TRAIL-R4 se expresan en tejidos humanos sanos, pero no en la mayoría de líneas celulares de cáncer (Golstein, 1997). La distribución preferencial de los receptores señuelo en los tejidos normales, junto con su capacidad para competir con los inductores a muerte tras la unión de TRAIL ligando, se cree es para otorgar mayor resistencia de las células normales ante señales de apoptosis vagas (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

El quinto receptor identificado con afinidad hacia TRAIL ligando, es el receptor de la Osteoprotegerina (OPG-R), que interactúa también con el Factor de Diferenciación de los Osteoclastos (ODF), otro miembro de la familia de TNF. OPG-R también puede actuar como un receptor señuelo, porque se une de manera eficiente a TRAIL-L, pero no induce Apoptosis (Truneh et al., 2000).

TRAIL LIGANDO (APO-2L)

TRAIL-L/APO-2L se identificó en 1995 mediante el tamizado de bases de datos de DNA, que tomaron como referencia las homologías de secuencia de otros miembros, tanto ligandos como receptores de la familia TNF (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996). Particularmente se encontró una homología de secuencia muy alta con FAS-L, pero tras estudios, no se encontró unión a FAS-R o cualquiera de los otros receptores previamente conocidos de los receptores de TNF (TNF-R).

El gen que transcribe para TRAIL-L se encuentra ubicado en el cromosoma 3 y su RNAm, se expresa constitutivamente en muchos tejidos, es una proteína transmembrana de tipo II de 281 aminoácidos que puede ser escindida por metaloproteasas para generar una forma soluble (Wiley et al., 1995; Ashkenazi & Dixit, 1999). La forma íntegra y biológicamente activa de TRAIL-L es un homotrímero con un residuo de cisteína en la posición 230, que cuenta con la presencia de un ion Zn^{2+} , el cual es esencial para el correcto plegamiento y actividad. TRAIL-L parece desencadenar Apoptosis más específicamente en líneas celulares tumorales y xenoinjertos de tumor

que en células normales, aunque la razón de esta sensibilidad diferencial aún no se ha explicado (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

SEÑALIZACIÓN DE TRAIL- R1 y TRAIL -R2

Así como FAS-R, en TRAIL- R1 y TRAIL -R2 tras su correspondiente activación, se reclutan a la proteína adaptadora FADD y posteriormente esta por medio de su DED interactúa con Caspasa -8 o Caspasa -10, para la formación de los DISC (Kuang et al., 2000). FADD y las Caspasas -8 ó -10 no sólo son componentes integrales del DISC en el receptor TRAIL, también son esenciales para la apoptosis inducida por el mismo. Ambiguamente, TRAIL- R1 y TRAIL-R2 parecen desencadenar Apoptosis a través de una vía similar a la activada por FAS-R (Peter, 2000).

Varios informes también muestran que TRAIL, además de inducir la muerte celular, promueve la activación de NF- κ B y JNK a través de vías, independientes. En particular, TRAIL-R1, TRAIL-R2, y TRAIL-R4 se ha demostrado que activan a NF- κ B a través de una cascada de señalización TRAF2-NIK-IKK α/β , mientras que TRAIL-R1 induce la activación de JNK mediante un TRAF2-MKK1-MKK4. Esto sugiere una bifurcación en la vía de señalización para activar TRAF2 similar a la descrita para TNF-R1. TRAF-2 no se asocia directamente con alguno de los receptores de TRAIL, es concebible que esta vía requiera de un adaptador de proteínas aún no identificado que no sea TRADD o FADD (Hu et al., 1999). Curiosamente, la activación de NF- κ B no es suficiente para bloquear la apoptosis inducida por TRAIL, lo que sugiere que esto podría ser simplemente un epifenómeno (Walczak & Krammer, 2000).

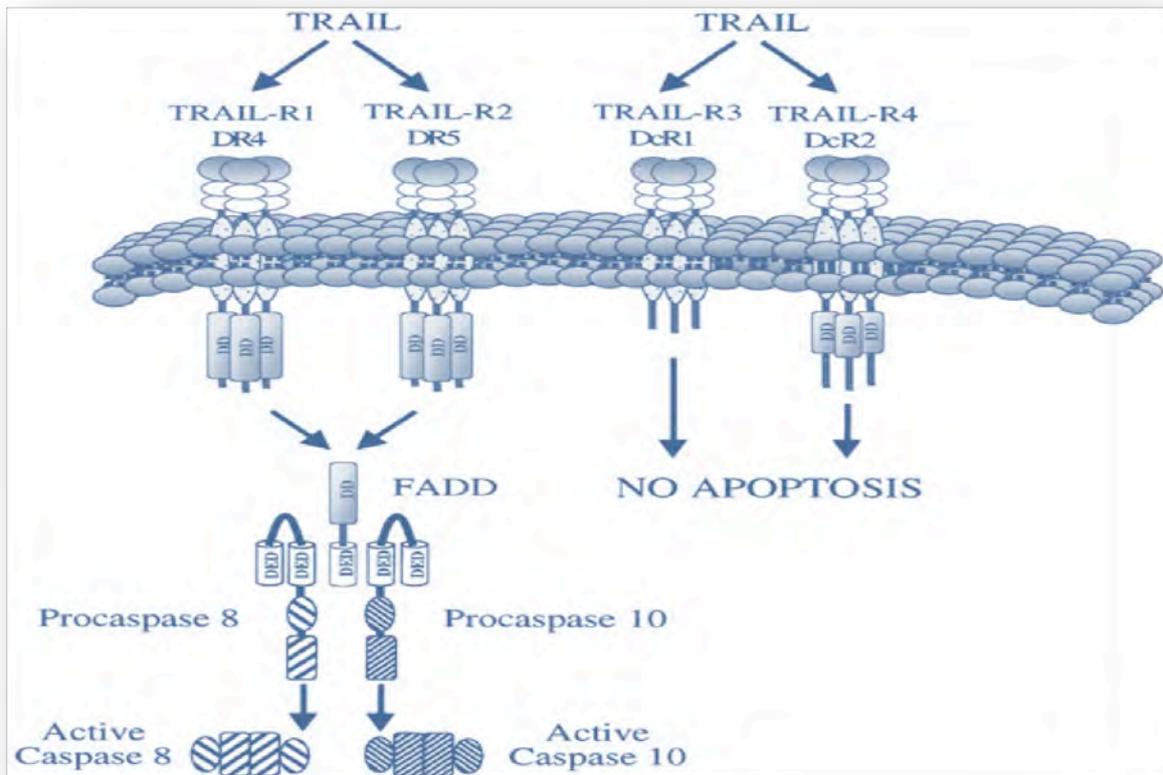


Figura 4. Representación esquemática de la vía de señalización canónica de los receptores TRAIL. Solo en TRAIL-R1 y TRAIL-R2, se observa la formación del DISC tras el acoplamiento de TRAIL-L (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

1.7 CASPASAS

Las Caspasas pertenecen a la familia de cisteín proteasas (Cisteín Aspartato Específico Protease), que cortan las cadenas proteicas 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). 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, 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 5**).

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.

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 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 (Pistritto et al., 2002; Rai et al., 2005).

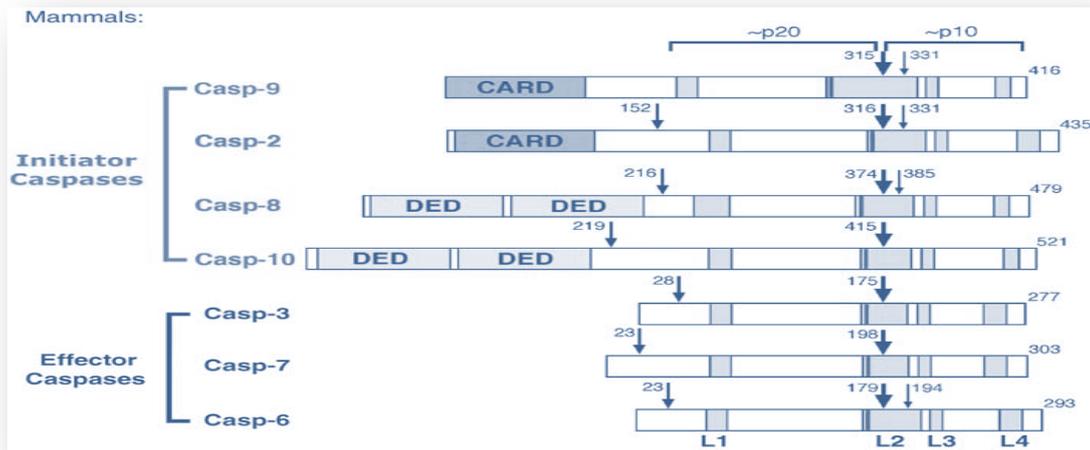


Figura 5. Representación esquemática de la familia génica de las Caspasas en mamíferos, de las cuales Caspasa -9, -2, -8 y -10 son iniciadoras al poseer un dominio CARD o DED, mientras las Caspasas -3, -7 y -6 son efectoras y llevan a cabo los cambios morfológicos principales en la célula durante la Apoptosis (Riedl & Shi, 2004).

Se conocen más de una docena de Caspasas las cuales 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 & Tschopp, 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.
- 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, provocando 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.

1.8 ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

Las Caspasas como ya se había mencionado, son cimógenos 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 Caspasa o por auto activación (Caballero & 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 & Lazebnik, 1998). La presencia de residuos de aspártico en el sitio DED 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 6**).

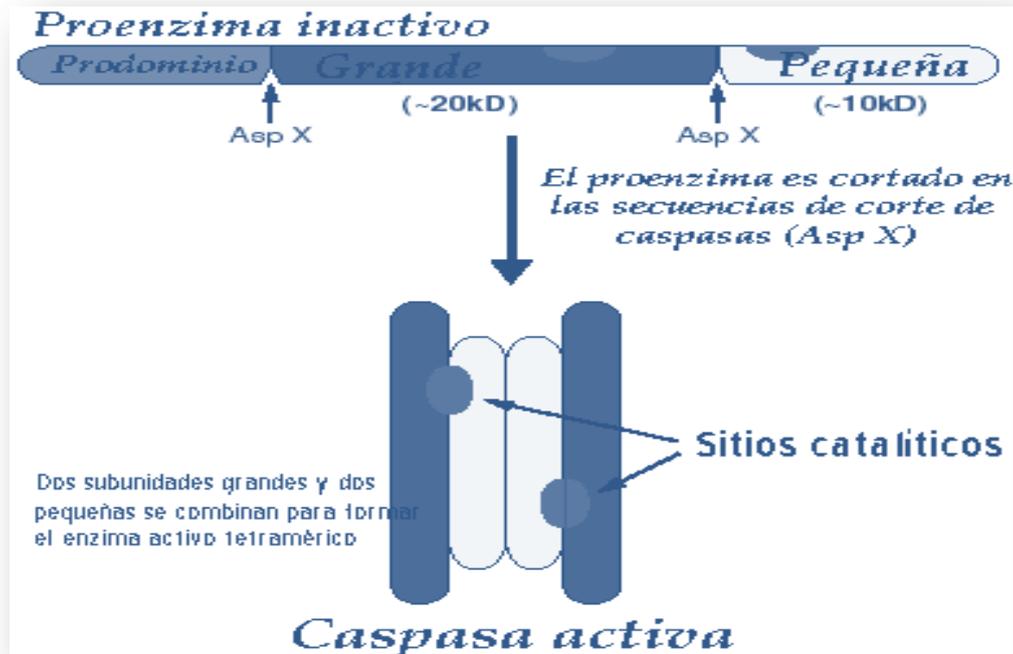


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de las Caspasas donde se muestran las dos subunidades: Grande (p20) y Pequeña (p10), así como un prodominio, en donde se lleva a cabo el corte de residuos de Ácido Aspártico (Asp), para ocasionar la activación (Oocities.org)

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 & 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 & 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 CARs (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 and Yigong 2004).

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

1.9 FUNCIONES PRINCIPALES DE LAS CASPASAS EFECTORAS EN LA APOPTOSIS

Las Caspasa 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 DNA, 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: Elimina a PARP (Poli ADP ribosa), molécula implicada en la maquinaria celular para reparar el daño en el DNA. 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. (Buendia et al., 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los programas de detección oportuna implementados por las instituciones de salud pública, el CaCU continúa siendo la segunda causa importante de muerte por cáncer en mujeres de nuestro país.

Por esta razón, desde hace décadas se han movido innumerables recursos humanos, técnicos y económicos a instituciones de investigación que trabajan en esclarecer y comprender los mecanismos moleculares que utilizan las células tumorales para su sobrevivencia.

Sumados a estos esfuerzos y con el fin de intentar establecer nuevas alternativas terapéuticas, se ha empleado la administración sistémica de IL-2 para activar la respuesta inmunológica antitumoral e inducir regulación en proteínas claves mediadoras del fenómeno de la apoptosis.

En particular, en el Laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, se han obtenido resultados positivos con las líneas de CaCU CALO e INBL que han sido cultivadas en presencia de 100 UI/mL de esta citocina, obteniéndose una inhibición de la proliferación *in vitro* e *in vivo*. Por esta razón es preciso seguir en la línea de investigación y tratar de dilucidar aspectos que nos ayuden a comprender más la biología de las células de CaCu.

El CaCU 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 de regulación de la proliferación de las células de este tipo de cáncer. Hasta el momento se ha demostrado la presencia del receptor para IL-2 (RIL-2) en células de CaCU, tanto en cortes histológicos, como en cultivos celulares observando que existe una expresión diferencial de dos de las tres subunidades, que conforman el receptor, dependiendo del estadio del tumor.

Por otro lado, experimentos realizados con las líneas de CaCU; 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. Sin embargo, poco se sabe de los procesos moleculares 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 implicados en el inicio de la cascada de señalización de la muerte celular tipo apoptótica en CALO e INBL.

3. HIPÓTESIS

Se ha comprobado que 100 UI/mL de IL-2 recombinante humana exógena, inhibe la proliferación de células de las líneas de CaCU CALO e INBL, esto debido a que regula la expresión de la proteína caspasa -3 y del RNAm de caspasa -8, esta última necesaria en la Apoptosis vía extrínseca mediada por receptores de muerte. Por lo tanto, si cultivamos a estas mismas líneas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, induciremos una regulación positiva en la transcripción de RNAm para los receptores de muerte FAS-R, TRAIL-R2 y TNF-R1, así como para el RNAm de la proteína adaptadora FADD.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de la IL-2 en la regulación de la expresión de genes implicados en la muerte celular tipo apoptótica vía extrínseca (FAS-R, TRAIL-R2, TNF-R1 y FADD) de las líneas de CaCU CALO e INBL.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cultivar las líneas celulares CALO e INBL y estimularlas ante 100 UI/mL de IL-2.
2. Extraer y purificar el RNAm de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, así como la de sus controles.
3. Retrotranscribir las muestras de RNAm y amplificar el cDNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los oligonucleótidos: FAS-R, TRAIL-R2, TNF-R1 y FADD.
4. Analizar los amplificadores por la técnica *in sílice* de densitometría para comprobar la expresión total en nano gramos (ng) del amplificado por PCR.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico consistió en líneas celulares derivadas de CaCU: CALO e INBL (Tabla 2), las cuales fueron obtenidas del material crio preservado de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea Celular	Estadio clínico	HPV	Características
CALO	IIB	18	Carcinoma de origen epidermoide de células grandes no queratinizadas. No metastásico.
INBL	IVB	18	Carcinoma de origen epidermoide de células grandes no queratinizadas. Metastásico.

Tabla 2. Características de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL. (Caceres et al, 2001; Rangel-Corona et al, 1998)

5.2 CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares CALO e INBL se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640^(MICROLAB), suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino)^(GIBCO), previamente desactivado a baño maría por 30 minutos a 57°C, en botellas de cultivo de 75cm³^(CORNING) tratadas para cultivo de células adherentes en monocapa. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones constantes a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂ en una incubadora^(FORM SCIENTIFIC EE.UU.).

Las células tumorales CALO e INBL en fase de confluencia fueron separadas del sustrato con la solución Verseno, transferidas a tubos cónicos^(CORNING) de 15mL, centrifugadas en una centrifuga clínica^(BIOHAZARD) a 1500 rpm y reingresadas a botellas de cultivo de 25cm³^(CORNING) tratadas para cultivo de células adherentes en monocapa, para comenzar el protocolo de ensayo experimental. A estos cultivos celulares, se les realizó una sincronización celular para que partieran del mismo punto en su ciclo celular (G1), esto se logró cultivándolas por 24h en ausencia del SFB.

La densidad y viabilidad de las células tumorales en el cultivo fueron expresadas en cámara de Neubauer^(AMERICAN OPTICAL, U.S.A) y evaluadas por técnica de exclusión con azul de tripano^(SIGMA). Estableciendo como valor mínimo de viabilidad 95%.

5.3 TRATAMIENTO CELULAR CON IL-2 EXÓGENA EN CALO E INBL

Los ensayos experimentales partieron de 1×10^6 células en ambas líneas celulares CALO e INBL, las cuales fueron cultivadas en presencia de IL-2 recombinante humana^(R&D systems) (IL-2) a 100 UI/mL. Los cultivos fueron mantenidos en incubadora^(FORM SCIENTIFIC, EE. UU.) a 37°C, con un pH de 7.0-7.2 y con una atmosfera húmeda saturante al 5% de CO₂. Durante los diferentes tiempos de 24h, 48h y 72h, para posteriormente realizar una extracción de RNA total.

Se realizaron cultivos celulares en ausencia de IL-2 a 100UI/mL, empleando las mismas condiciones antes mencionadas, los cuales fueron utilizados como controles en el presente estudio.

Los tiempos de estudios establecidos para medir la expresión del RNAm de los receptores de muerte FAS-R, TNF-R1, TRAIL-R2 y de FADD, en células estimuladas y no estimuladas con IL-2 se establecieron para ambas líneas celulares CALO e INBL, a los lapsos de 24, 48 y 72 horas. La razón se fundamenta en trabajos previos, donde se observa que en ambas líneas celulares, tras el estímulo con 100 UI/mL de IL-2, se potencializa la expresión del RIL-2 de una forma funcional a tiempos largos (48 Hrs) y que son capaces de desencadenar señalización, por ejemplo; Patrones de fosforilación de tirosina - cinasa de diferentes proteínas, como la cinasa JAK-3, STAT-3 y STAT-5 (Rocha et al, 2004).

5.4 EXTRCCIÓN DE RNA TOTAL

Transcurridos los tiempos de interacción con IL-2^(R&D systems), las células fueron lavadas con 5mL de solución PBS^(Ver Apéndice III) y posteriormente despegadas de su sustrato con la solución Verseno^(Ver Apéndice III) para transferirlas a tubos cónicos estériles^(CORNING) de 15mL, se centrifugaron en una centrifuga clínica^(BIOHAZARD) a 1500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrante de la solución Verseno^(Ver Apéndice III) para después agregar la solución TRIzol^{™(INVITROGEN)} de isotiocianato de guanidinio.

El botón celular se homogenizó en 1mL de la solución de TRIzol^{™(INVITROGEN)} en tubos de micro centrífuga^(EPPENDORF) de 2mL, donde se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, para favorecer la lisis y disociación de los complejos de nucleoproteínas. Transcurrido el tiempo, se añadieron 200 µL de cloroformo en grado para biología molecular^(SIGMA) logrando así una emulsión, la cual se agitó vigorosamente en un Vortex^(GENIUS II) por 2 minutos, para incubarlos por 5 minutos a 4°C. Una vez finalizada la incubación, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, con esto conseguimos la separación de la mezcla en 3 fases (orgánica, acuosa y

lipídica/proteica), nuestras distintas formas de RNA se encuentran en la fase acuosa la cual se aísla y se transfiere a tubos para microcentrífuga^(EPPENDORF) de 1.5mL en donde se mezclan con 500 µL de isopropanol en grado para biología molecular^(SIGMA), con el fin de bajar el coeficiente de floculación y precipitar el RNA. Este proceso puede ser algo lento, por lo tanto se incubaron las muestras durante 24h a -4°C para promover dicho efecto, pasada la incubación de toda la noche, las muestras se centrifugan a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, la finalidad es obtener un pequeño *pellet* al cual se le retira el sobrenadante y se le lava y purifica con 1mL de etanol en grado para biología molecular^(J.T BAKER) frío al 70%, asegurándose de que se mezcle bien el *pellet*. Se centrifuga una última ocasión a 7500 rpm durante 10 minutos a 4°C, para posteriormente quitar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol durante 90 minutos, para conseguir el mayor grado de sequedad en las paredes laterales del micro tubo de centrifuga. El precipitado obtenido se re suspende en 20µL de agua libre de RNAsas^(FERMENTAS) conservando el *stock* a -72°C.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La concentración de RNAm se determinó y normalizó en un biofotómetro^(BIOPHOTOMETER, EPPENDORF), para igualar las concentraciones. Se realizó por muestra una dilución 1:50 tomando 4µL del stock de la extracción total de RNA y resuspendiendo en 196 µL de agua inyectable estéril^(PISA), las muestras se colocaron en una celdilla^(EPPENDORF) permeable a la luz UV. Posteriormente se realizó la lectura en el biofotómetro^(BIOPHOTOMETER, EPPENDORF) para determinar las concentraciones de RNAm (µg/mL), se tomaron las absorbancias de 260nm y se relaciona con la absorbancia 280nm para obtener un valor que nos indica su estado de pureza. Para un grado de pureza óptimo e indicativo de no degradación de RNA se tomó el valor de 260/280nm superior a 1.5 e inferior a 2.0. Se aplicó la relación existente en el Apéndice I para el cálculo de la cuantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos, en este caso el RNA, de 1 unidad de densidad óptica (1OD) equivale a 40µg/mL.

Para mayor seguridad sobre la integridad y pureza de la muestra, se realizó un gel de integridad del RNA total en agarosa nativa al 1.5%, con la finalidad de observar dos bandas muy conspicuas que corresponden a la unidad 28S y a la unidad 18S del RNA ribosomal, este par de bandas serian indicativo del correcto manejo y de la no degradación de las muestras.

5.6 RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Esta técnica permite la generación de una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de la extracción del ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple, mediante la utilización de retrotranscriptasas de retrovirus.

La concentración de RNA utilizado para la técnica fue de 2µg para cada una de las muestras, para lo cual se utilizó un kit de RT-PCR^(PROMEGA) en el que para el caso de la RT se establecieron las condiciones proporcionadas en la **Tabla 9** del Apéndice I para cada reacción (Rx).

Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en frío y resuspendiendo a la incorporación de cada uno de los reactivos.

Las Rx se colocaron en un termociclador^(EPPENDORF ESTANDAR) el cual fue programado a 42° C durante 1 hora. El cDNA obtenido se conservó a -4°C.

5.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Con los cDNA obtenidos, producto de la RT, se llevó a cabo la PCR utilizando una concentración inicial de 4µg/µL, las condiciones establecidas por Rx puede verse en la **Tabla 10** del Apéndice I, se utilizó el kit *Go taq Polimerasa*^(PROMEGA), se multiplicaron por el número de muestras (Controles y tratamientos con IL-2). Toda la manipulación de reactivos y muestras se realizó en hielo y resuspendiendo tras la incorporación de cada uno de los reactivos.

El programa usado en termociclador^(EPPENDORF ESTANDAR) consistió en los siguientes pasos:

- Paso 1: 94°C por 6 minutos - Fase de desnaturalización del DNA
- Paso 2: 55.9°C (FAS-R), 56.6°C (TNF-R1), 57.5°C (TRAIL-R2), 52.7°C (FADD) y 52.6°C (β Actina) durante 2 minutos - Fase de alineamiento del DNA. (Temperaturas optimas recomendadas para cada Primer (hoja técnica del proveedor^(PROMEGA))
- Paso 3: 72°C por 2 minutos - Fase de extensión de DNA.
- Paso 4: 94°C 45 segundos - Fase de disociación.
- Paso 5: Se repite 30 veces del paso 2 al 4
- Paso 6: 20°C por 30 minutos. -Fase de Estabilización

Cada Rx y condición de RT-PCR fue reproducida para los siguientes primers:

Gen	Secuencia del primer sentido (5´ - 3´) y anti sentido (3´ - 5´)	Pares de Bases (pb)	TM (°C)	%G-C
FAS-R	5´ - TCA GTA CGG AGT TGG GGA AG - 3´ 3´ - CAG GCC TTC CAA GTT CTG AG - 5´	207	55.9	55%
TNF-R1	5´ - GAG AGG CCA TAG CTG TCT GG - 3´ 3´ - GTT CCT TTG TGG CAC TTG GT - 5´	218	56.6	55%
TRAIL-R2	5´ - AGA GAG AAG TCC CTG CAC CA - 3´ 3´ - GTC ACT CCA GGG CGT ACA AT - 5´	184	57.5	55%
FADD	5´ - CTC CAA GGA AAT GGG ACA AA - 3´ 5´ - GAG GTT CCT TTA CCC TGT TT - 3´	289	52.7	45%
β ACTINA	5´ - GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG - 3´ 3´ - GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG - 5´	234	52.6	50%

Tabla 3. Secuencias de los primers. Se muestran las pares de bases de cada uno de los primers utilizados para la detección de los distintos genes de interés involucrados en el trabajo (FAS-R, TNF-R1, TRAIL-R2 y FADD), así como β-Actina usada como un control interno de la técnica. Éstos fueron diseñados con ayuda del *software* Primer 3® y probados *in silice* antes de su sintetización en el *software* Electronic-PCR™

5.8 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA NATIVA

Para visualizar la expresión del producto obtenido de la PCR semicuantitativa de cada una de las muestras se realizó una electroforesis con 4µl del producto amplificado en un gel de agarosa nativa al 1.5%.

Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1.5g de agarosa nativa la cual se diluyó con 100 mL de TBE 1X^(Ver Apéndice III). Para tener un mejor homogeneizado la dilución se calentó a 50°C durante 4 minutos aproximadamente. Después se montó y calibró la cámara de electroforesis^(Owl, EE. UU.) para verter la dilución de agarosa nativa más 15µl de bromuro de etidio en grado de biología molecular^(PROMEGA), inmediatamente se colocó un peine con el número de pozos deseados de una capacidad de 15µl cada uno.

Terminado el tiempo de polimerización de la agarosa (20 minutos aproximadamente) se procede a retirar el peine, con el fin de dejar libre cada uno de los pozos en donde irá la muestra, después se inunda la cámara con aproximadamente 600mL de buffer de corrida (TBE 0.5X)^{(Ver}

Apéndice III)

Posteriormente se colocaron 4µl de muestra por pozo y en uno extra se coloca la escalera de pares de bases^(GENERULER 25-700PB, THERMO SCIENTIFIC). El tiempo de corrida es aproximadamente de 1 hora a 80-90 volts.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraran hacia el cátodo. De tal manera la electroforesis de ácidos nucleídos es el método habitual para

separar, identificar y purificar moléculas o fragmentos de DNA y RNA en función de su tamaño y movilidad.

La utilización del químico bromuro de etidio en grado de biología molecular^(PROMEGA) es para la visualización de los ácidos nucleicos. Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas, específicamente con las purinas adenina y guanina, y hacer visible la doble hebra en un tono naranja-rojizo, al ser excitado por radiación ultravioleta (100 - 400nm). En el caso específico de este reactivo, su excitación inicia a los 365nm y su pico de excitación es a los 510nm. Este efecto luminiscente fue logrado mediante un Transluminador^(UVP, EE. UU.).

De este modo logramos la visualización del DNA y la identificación de los productos de interés por sus tamaños de amplificado en pares de bases, comparándolos en relación al recorrido de cada banda con el marcador o escalera de pares de bases, así como la identificación del RNAr en sus subunidades 28S y 18S.

La metodología mencionada se realizó en tres ocasiones de manera independiente para confirmar que los resultados fueran confiables y reproducibles.

5.9 DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Como ya se ha mencionado, la electroforesis de forma habitual es usada con el único propósito de separar los componentes moleculares individuales del DNA, RNA o proteínas en un gel plano. Pero de una forma más cuantitativa y exacta, este procedimiento también nos permite determinar la cantidad de moléculas de un cierto tipo que se encuentren presentes en cada carril de muestra por medio de un equipo denominado Sistema de oscuridad controlada para la adquisición, documentación y análisis de bioimágenes usadas en investigación proteómica y genómica, también conocido como Fotodocumentador, que como indica, fotografía el gel que contiene las moléculas que han migrado y las cuantifica con ayuda de un *software* con el fin de proporcionar en valores numéricos la intensidad de lumiscencia y concentración, esto es tabulado y comparado contra la escalera de pares de amplificado^(GENERULER 25-700PB, THERMO SCIENTIFIC), que aparte de ofrecer los marcadores específicos de los tamaños de amplificado, también ofrece concentraciones en microgramos (μg) (Ver Apéndice 1, **Figura 19**) y finalmente el resultado es arrojado en nano gramos (ng) de cada producto amplificado.

En el caso de nuestro grupo de investigación, utilizamos un Fotodocumentador^(UVP, EE. UU.) Modelo DigiDoc-it® 120 *Imaging System* aunado al *software* Doc-ItLS *Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54, el cual alimentamos y calibramos en función de los protocolos de las técnicas de RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa nativa y los datos de la escalera de amplificado antes mencionados. Es importante mencionar que este

software cumple con la norma 21CFR Parte 11 de los requisitos y reglamentos de los módulos de imágenes opcionales por software para laboratorios de investigación (170-9691).

Para el análisis de los resultados, tomamos como valor aceptable de variación entre lectura y lectura la cantidad de 0.50 ng, esto en función de lo recomendado por el manual de operación del equipo de fotodocumentación.

6. RESULTADOS

6.1 INTEGRIDAD DE RNA TOTAL

El Ácido Ribonucleico (RNA), es la molécula que dirige las etapas intermedias en la síntesis proteica mediante tres formas principales (RNAr, RNAm y RNAt), la molécula de RNAm está formada por una cadena de nucleótidos enlazados mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente. Cada nucleótido a su vez está ligado a un monosacárido de cinco carbonos llamado ribosa. Este RNAm lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos para formar las proteínas, desde el DNA, lugar en que está inscrita, hasta los ribosomas en el citoplasma, lugar en donde se traduce y sintetiza la proteína. Es por tanto, una molécula intermediaria entre el DNA y la proteína, de ahí que se le conozca como "mensajero".

Por su parte, los ribosomas son una combinación de proteínas y RNA ribosomal (RNAr), que da como resultado un agregado en varias sub-unidades; la subunidad mayor contiene tres moléculas de RNAr y la menor, una. Las proteínas adjuntas a los ribosomas se encuentran sobre el armazón constituido por los RNAr, este último es muy abundante y representa el 80% del RNA hallado en el citoplasma de las células humanas (Kampers et al., 1996). Los RNA ribosómicos son el componente catalítico de los ribosomas que se encargan de crear los enlaces peptídicos entre los aminoácidos de la proteína en formación, los ribosomas a su vez son asistidos por un tercer tipo de RNA; Los RNA de transferencia o RNAt que se encargan de transportar y transferir aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento.

Con el propósito de demostrar la integridad del RNA total (RNAr, RNAm y RNAt) extraído de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL, se corrió un gel de agarosa, en el cual se colocaron cada una de las muestras de RNA total extraído de cada línea celular cultivada a 24, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2. En el gel de integridad se observan las bandas correspondientes a la sub-unidad grande ribosomal (28S) y sub-unidad pequeña ribosomal (18S), para las 12 muestras obtenidas. Es de notar en la parte inferior del gel, en los carriles de las muestras cultivadas en presencia de IL-2, se obtuvieron bandas de mayor densidad que corresponden al RNAt y RNAm (**Figura 7**).

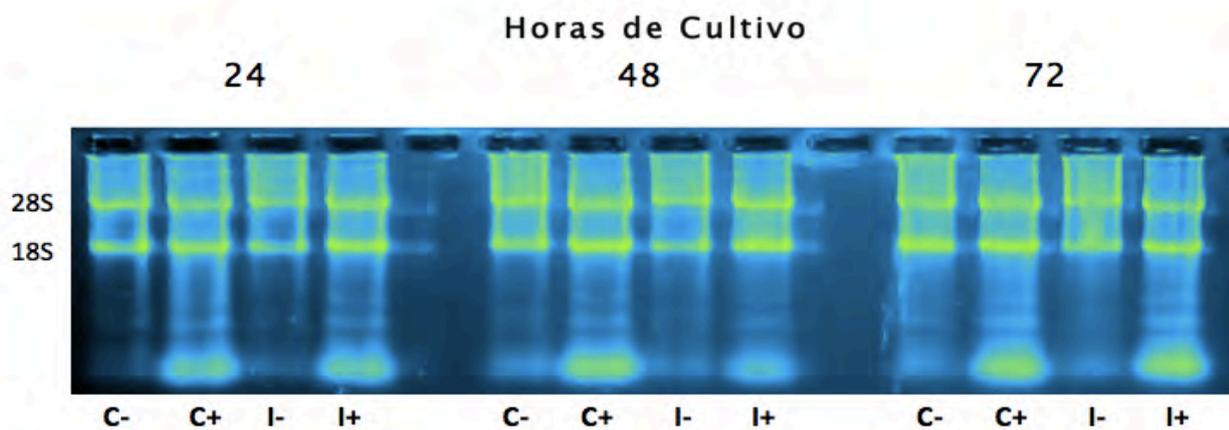


Figura 7. Integridad de RNA total de las muestras de las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/ml de IL-2. Se observa para las muestras de ambas líneas celulares la Integridad de las subunidades ribosomales 18S y 28S, así como un aumento en la densidad del mensajero total, de las muestras cultivadas en presencia de IL-2.

6.2 RT-PCR DE β -ACTINA

La RT-PCR, es una de las técnicas fundamentales en los laboratorios de biología molecular, es usada para evaluar la regulación de la expresión génica debido a su alta sensibilidad. Esta última, se consigue al retrotranscribir unas cuantas copias de RNAm y obtener su cDNA, el cual mediante el uso de primers específicos se unen por complementariedad de bases a secuencias diana altamente conservadas de los genes a analizar, esto permite amplificar millones de veces la región de un gen específico y así medir su expresión. Por lo antes mencionado, en este trabajo se usó la técnica de RT-PCR para evaluar la regulación en la expresión del RNA mensajero, para los genes promotores de los receptores de muerte FAS-R, TNF-R1 y TRAIL-R2, así como del dominio de muerte FADD.

En primer lugar se evaluaron las condiciones de la técnica de RT-PCR, para ello se amplificó el gen para β -Actina, una proteína constitutiva del citoesqueleto celular. Los datos obtenidos para β -Actina muestran un producto de amplificación homogéneo de 234pb para todos los tiempos, sin cambios en los amplificados de las muestras cultivadas en presencia de las 100 UI/mL de IL-2 (**Figura 8**).

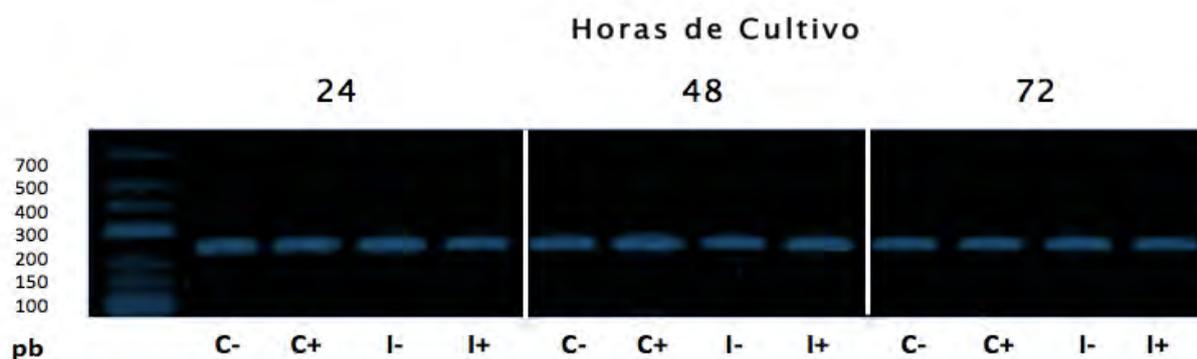


Figura 8. Productos de amplificación para β -Actina de las muestras de las líneas de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2. Se observa un producto de amplificación homogéneo de 234 pares de bases para las 12 muestras; **pb**: Tamaño de amplificado en pares de bases.

En ocasiones la evaluación de la expresión genética, producto de la RT-PCR en geles de agarosa, se vuelve una tarea bastante compleja. Esto atribuido al hecho de que los cambios de expresión en la transcripción de los ácidos nucleicos se reportan en el orden de micro gramos (mg) o nano gramos (ng). La detección de estos cambios de expresión con un ojo experimentado y bien entrenado, es relativamente fácil. Sin embargo, actualmente existen protocolos de evaluación de la expresión génica los cuales utilizan software especializados. Por esta razón, en este trabajo los productos obtenidos de la RT-PCR para todos los genes evaluados fueron valorados usando la técnica de Densitometría por luminiscencia. Dicha técnica cuantifica la proporción de luz retenida en los ácidos nucleicos del amplificado, permitiendo determinar su masa de manera automatizada minimizando el rango de error. Además, nos permite proporcionar datos numéricos exactos de la concentración de cada amplificado genético, con los cuales podemos comparar y extrapolar los resultados de una forma cuantitativa sin importar si son originadas por pequeños cambios de la expresión génica. Para el análisis de los resultados, tomamos como valor aceptable de variación entre lectura y lectura la cantidad de 0.50 ng, esto en función de lo recomendado por el manual de operación del equipo de fotodocumentación modelo DigiDoc-it[®] 120 *Imaging System* y el *software Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54.

Para el caso de la evaluación densitométrica de los productos de amplificación del gen β -Actina, no se observan cambios considerables para los productos de amplificación a lo largo de los tiempos, ni de las muestras cultivadas tanto en presencia como en ausencia de IL-2 (**Tabla 4**).

DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PARA β -ACTINA

Etiqueta	RF	I-Max	I-Vol	Masa(ng)	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C-24	0.67	255	238061	11.71	0	- 0.16
C+24	0.67	255	230505	11.55	0	
C-48	0.64	255	243973	11.03	0	- 0.08
C+48	0.67	255	234532	10.95	0	
C-72	0.66	255	234630	11.82	0	- 0.05
C+72	0.64	255	242607	11.77	0	
I-24	0.65	255	230505	11.03	0	+ 0.09
I+24	0.65	255	239522	11.12	0	
I-48	0.63	255	245844	11.28	0	- 0.11
I+48	0.65	255	248240	11.17	0	
I-72	0.63	255	245793	11.86	0	+ 0.17
I+72	0.66	255	241874	12.03	0	

Tabla 4. Análisis densitométrico, tomados de los productos de amplificación para el gen de β -Actina. (RF: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens [lm], I-Vol: Correlación con los valores de volumen de todas las variables, Masa (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de Fondo: Retoque de la fotografía, Ratio (ng): Es el diferencial entre los productos de amplificación de las muestras cultivadas con IL-2 y muestras cultivadas en ausencia de IL-2. Por lo que es la cantidad en nano gramos que aumenta [+] o decrementa [-] la masa del amplificado en comparación con su control. Es de notar que para el gen de β -Actina no se observan variaciones considerables en la concentración de las muestras al interaccionar con las 100 UI/mL de IL-2.

La obtención de los datos numéricos además de proporcionarnos información cuantitativa sobre los cambios de expresión génica, nos dan la oportunidad de simplificar la información y representarla gráficamente en forma de histogramas, para obtener una vista general de la actividad del gen en las muestras, con respecto al tiempo y ante la ausencia o presencia del estímulo de 100 UI/mL de IL-2. En los histogramas producto del análisis del software *Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54, se tabula y compara la intensidad de fluorescencia y la cantidad de píxeles de cada ancho de banda de las muestras, contra un patrón ya conocido. Este patrón es la escalera de tamaños de amplificado (GENERULER 25-700PB, THERMO SCIENTIFIC), la cual además de darnos referencia sobre el tamaño de los productos de amplificación, ofrece datos sobre la concentración de cada una de sus bandas de amplificado.

Para el caso del gen β -Actina, la representación grafica permite apreciar la nula modificación en la expresión del gen al interaccionar con IL-2 a los distintos tiempos de estudio (**Figura 9**).

HISTOGRAMA DE ACTIVIDAD DEL GEN β -ACTINA

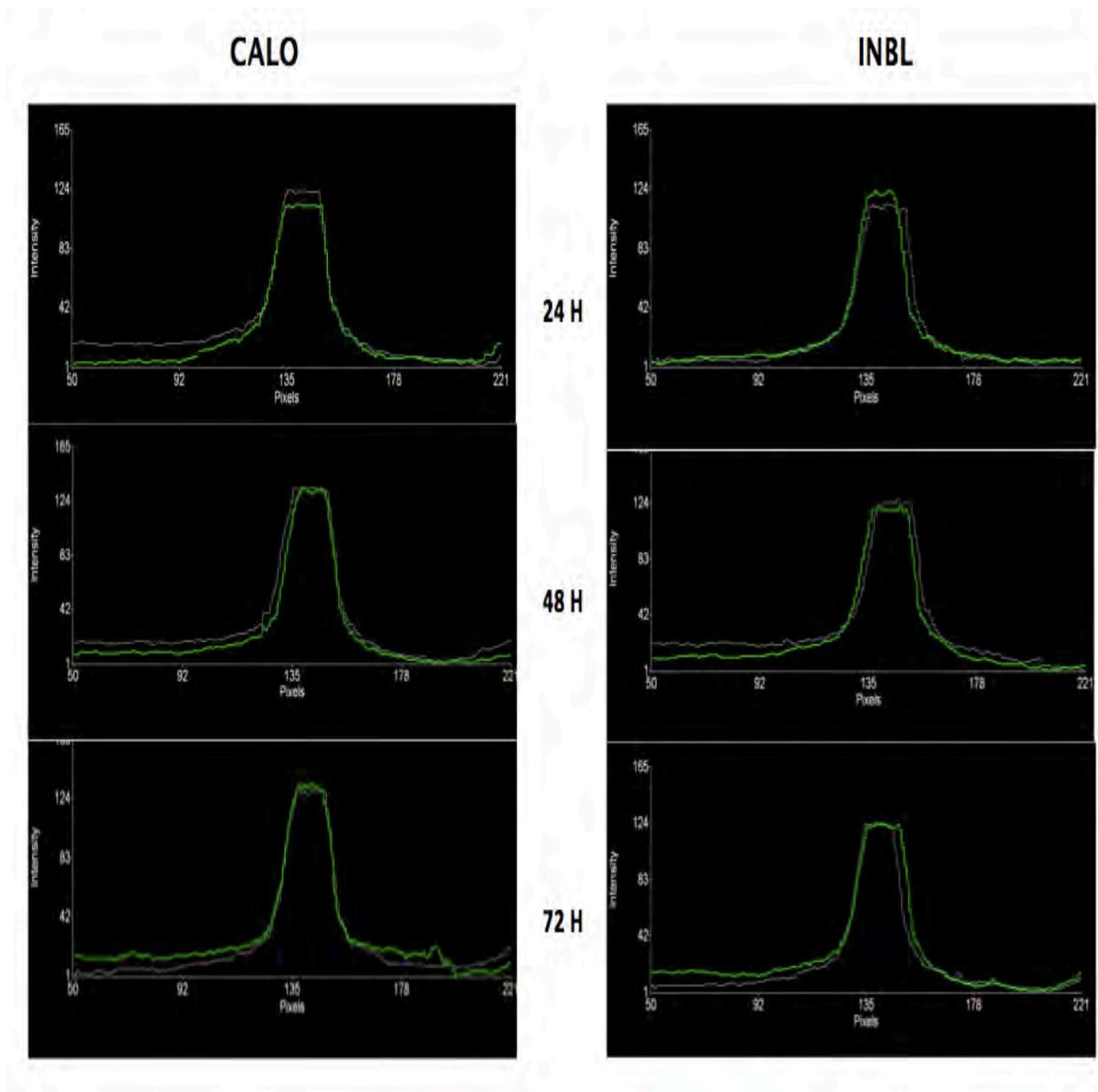


Figura 9. Representaciones en área bajo la curva de los valores arrojados por la densitometría, basada en la intensidad lumínica y pixelaje de cada una de las bandas amplificadas del gen β -Actina. Esta imagen nos permite apreciar de una forma más clara la condición de la expresión a los distintos tiempos de estímulo con 100 UI/mL de IL-2, los cuales se muestran en color verde y compararlos con sus respectivos controles, mostrados en color blanco. Se nota que en ambas líneas celulares la expresión de este gen no tiene ningún cambio significativo a ningún tiempo (24, 48 y 72 horas).

Una vez establecidas las condiciones de la técnica RT-PCR y verificado el estado de las muestras biológicas se procedió a realizar la amplificación y análisis densitométrico de los productos de amplificación para los genes FAS-R (207pb), TNF-R1(218pb), TRAIL-R2 (184pb) y FADD (289pb).

6.3 RT-PCR PARA FAS-R

Al igual que con el gen de β -Actina, el material biológico de las líneas CALO e INBL se cultivó en presencia y ausencia de 100 UI/ml de IL-2 por 24, 48 y 72 horas. Al analizar el gel de agarosa con los productos de amplificación para el receptor de muerte FAS-R, observamos una banda de 207 pares de bases (**Figura 10**). Se aprecia que los amplificados provenientes de la línea celular CALO cultivados en ausencia de IL-2, no muestran variaciones en la concentración del producto de amplificación con respecto al tiempo. Sin embargo, cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 hay una disminución de la concentración del producto de amplificación a las 24 horas y posteriormente un aumento a las 48 horas. En el caso de la línea celular INBL, las muestras negativas a IL-2, muestran un comportamiento heterogéneo con respecto al tiempo, debido a que a las 48 horas existe una baja en la expresión del gen FAS-R. No obstante, al ser cultivadas en presencia de IL-2, se observa un incremento considerable a las mismas 48 horas (**Figura 10**).

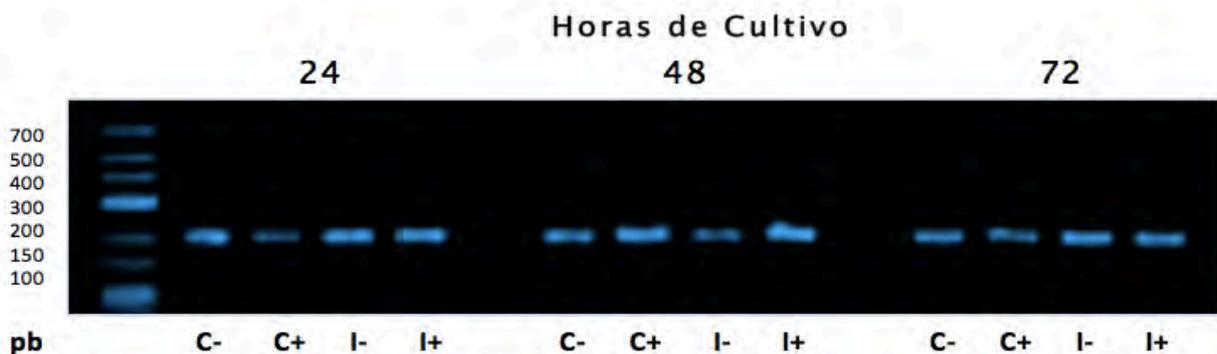


Figura 10. Productos de amplificación para FAS-R de las muestras de las líneas de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 207 pares de bases, con una concentración heterogénea para las muestras cultivadas en presencia de IL-2, especialmente a las 48 horas donde se observa un incremento notable para ambas líneas celulares; **pb**: Tamaño de amplificado en pares de bases.

La tendencia antes descrita, para la regulación de la expresión del gen FAS-R fue confirmada por el análisis densitométrico, en donde efectivamente se observó un alza en la transcripción del gen FAS-R con el estímulo de 100 UI/mL de IL-2. Para el caso de CALO es de +1.58 ng y para INBL de +2.30 ng (**Tabla 5**).

DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PARA FAS-R

Etiqueta	RF	I-Max	I-Vol	Masa(ng)	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C-24	0.52	216	169843	9.26	0	- 0.75
C+24	0.52	201	155385	8.51	0	
C-48	0.52	214	161244	9.15	0	+ 1.58
C+48	0.49	234	200283	10.73	0	
C-72	0.51	220	171072	9.39	0	- 0.16
C+72	0.51	226	181342	9.55	0	
I-24	0.51	224	161426	9.78	0	- 0.05
I+24	0.51	227	166518	9.83	0	
I-48	0.51	205	149914	9	0	+ 2.30
I+48	0.50	242	219090	11.3	0	
I-72	0.51	236	196022	10.04	0	- 0.59
I+72	0.52	219	178198	9.45	0	

Tabla 5. Análisis densitométrico, tomados de los productos de amplificación para el gen de FAS-R. (RF: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens [lm], I-Vol: Correlación con los valores de volumen de todas las variables, Masa (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de Fondo: Retoque de la fotografía, Ratio (ng): Es el diferencial entre los productos de amplificación de las muestras cultivadas con IL-2 y muestras cultivadas en ausencia de IL-2. Por lo que es la cantidad en nano gramos que aumenta [+] o decrementa [-] la masa del amplificado en comparación con su control. En el gen FAS-R, se nota un incremento considerable en la transcripción del gen en ambas líneas celulares a las 48 horas de estímulo con IL-2.

Estos valores numéricos fueron usados para la elaboración de un histograma de área bajo la curva utilizando el software *Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54, en el cual nos permite apreciar más fácilmente la regulación de IL-2 sobre la expresión del gen FAS-R con respecto al tiempo. Es de notar, como ya se mencionó, el considerable aumento de expresión del gen a las 48 horas de estímulo con IL-2 (**Figura 11**).

HISTOGRAMA DE ACTIVIDAD DEL GEN FAS-R

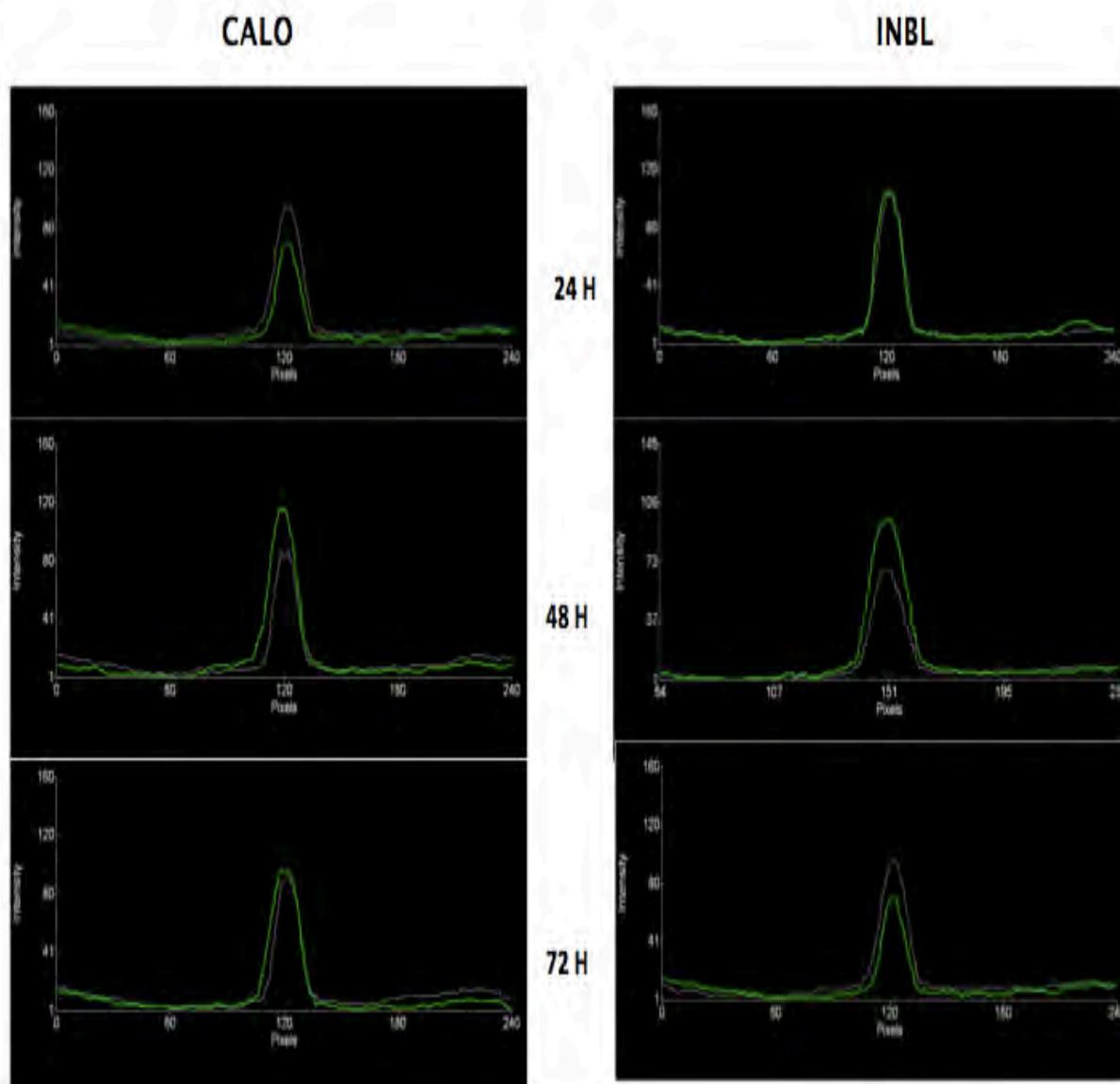


Figura 11. Representaciones en área bajo la curva de los valores arrojados por la densitometría, basada en la intensidad lumínica y pixelaje de cada una de las bandas amplificadas. Esta imagen nos permite apreciar de una forma más clara la condición de la expresión del gen FAS-R a los distintos tiempos de estímulo con 100 UI/mL de IL-2, los cuales se muestran en color verde y compararlos con sus respectivos controles, mostrados en color blanco. Se nota que en ambas líneas celulares la expresión de este receptor aumenta considerablemente al tiempo de 48 horas.

6.4 RT-PCR PARA TNF-R1

En el caso del receptor para el Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R1), al analizar el gel de agarosa con los productos de amplificación observamos un tamaño de amplificado de 218 pares de bases el esperado para este gen (**Figura 12**). Es de notar que los amplificados obtenidos de la línea celular CALO cultivada en ausencia de IL-2, no muestran variaciones en el producto de amplificación con respecto al tiempo. Sin embargo, cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2, se observa, una disminución considerable a las 48 horas. En el caso de la línea celular INBL, los productos de amplificación de las células cultivadas en ausencia de IL-2, muestran una disminución gradual del producto de amplificación con respecto al tiempo. Cabe destacar que en presencia de IL-2 la disminución es mayor (**Figura 12**).

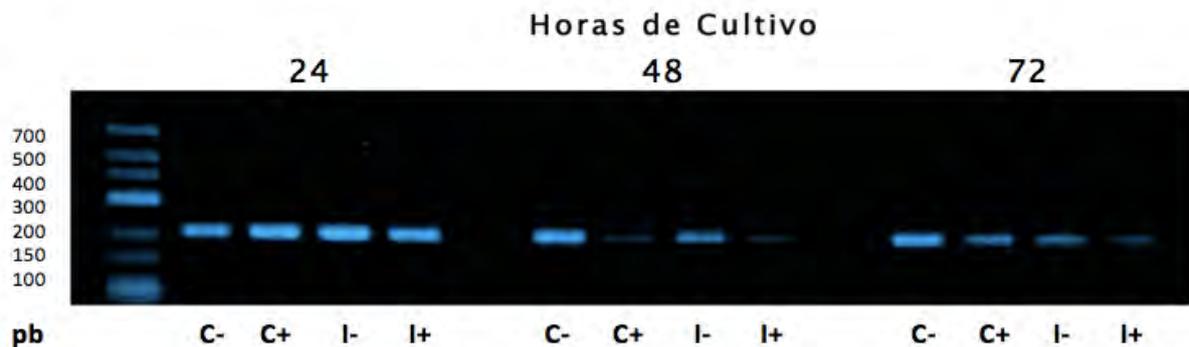


Figura 12. Productos de amplificación para TNF-R1 de las muestras de las líneas de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 218 pares de bases con notables disminuciones a los tiempos de estímulo de 48 horas en ambas líneas celulares; **pb**: Tamaño de amplificado en pares de bases.

Los productos de amplificación para el TNF-R1, en ambas líneas celulares, fueron analizados por densitometría proporcionando valores cuantitativos de la disminución en la concentración del amplificado que IL-2 produce a las 48 horas. Cabe mencionar que para la línea celular CALO se observa un decremento de -1.93 ng en el producto de amplificación en comparación con el control, mientras que para la línea celular INBL la disminución fue de -1.55 ng. Asimismo, se sigue observando una disminución de dicho producto de amplificación en células de ambas líneas celulares cultivadas en presencia de IL-2 (**Tabla 6**).

DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PARA TNF-R1

Etiqueta	RF	I-Max	I-Vol	Masa(ng)	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C-24	0.49	231	233124	9.89	0	+ 0.59
C+24	0.49	242	252198	10.48	0	
C-48	0.51	233	245579	10.17	0	- 1.93
C+48	0.51	176	188605	8.24	0	
C-72	0.52	230	232226	9.88	0	- 0.65
C+72	0.52	212	202408	9.23	0	
I-24	0.49	242	274317	10.6	0	- 0.22
I+24	0.50	236	245624	10.38	0	
I-48	0.50	229	220386	9.76	0	- 1.55
I+48	0.52	175	184419	8.21	0	
I-72	0.51	200	214127	9.02	0	- 0.62
I+72	0.52	183	201510	8.4	0	

Tabla 6. Análisis densitométrico de los productos de amplificación para el gen de TNF-R1. **RF:** Línea de referencia, **I-Max:** Intensidad máxima proporcionada en lumens [lm], **I-Vol:** Correlación con los valores de volumen de todas las variables, **Masa (ng):** Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, **Corrección de Fondo:** Retoque de la fotografía, **Ratio (ng):** Diferencia entre positivos con estímulo de IL-2 y negativos o controles. Es la cantidad en nano gramos que aumenta [+] o decrementa [-] en comparación con su control. Se aprecia una disminución considerable de este receptor ante el estímulo de IL-2 al tiempo de 48 horas en ambas líneas celulares, así como a las 72 horas de estímulo con la citocina.

Asimismo, se presenta el histograma de la regulación de la expresión del gen de TNF-R1 en donde se puede visualizar gráficamente los datos numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación efectuados en el software *Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54 que confirman la disminución en la concentración del producto de amplificación cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 (**Figura 13**).

HISTOGRAMA DE ACTIVIDAD DEL GEN TNF-R1

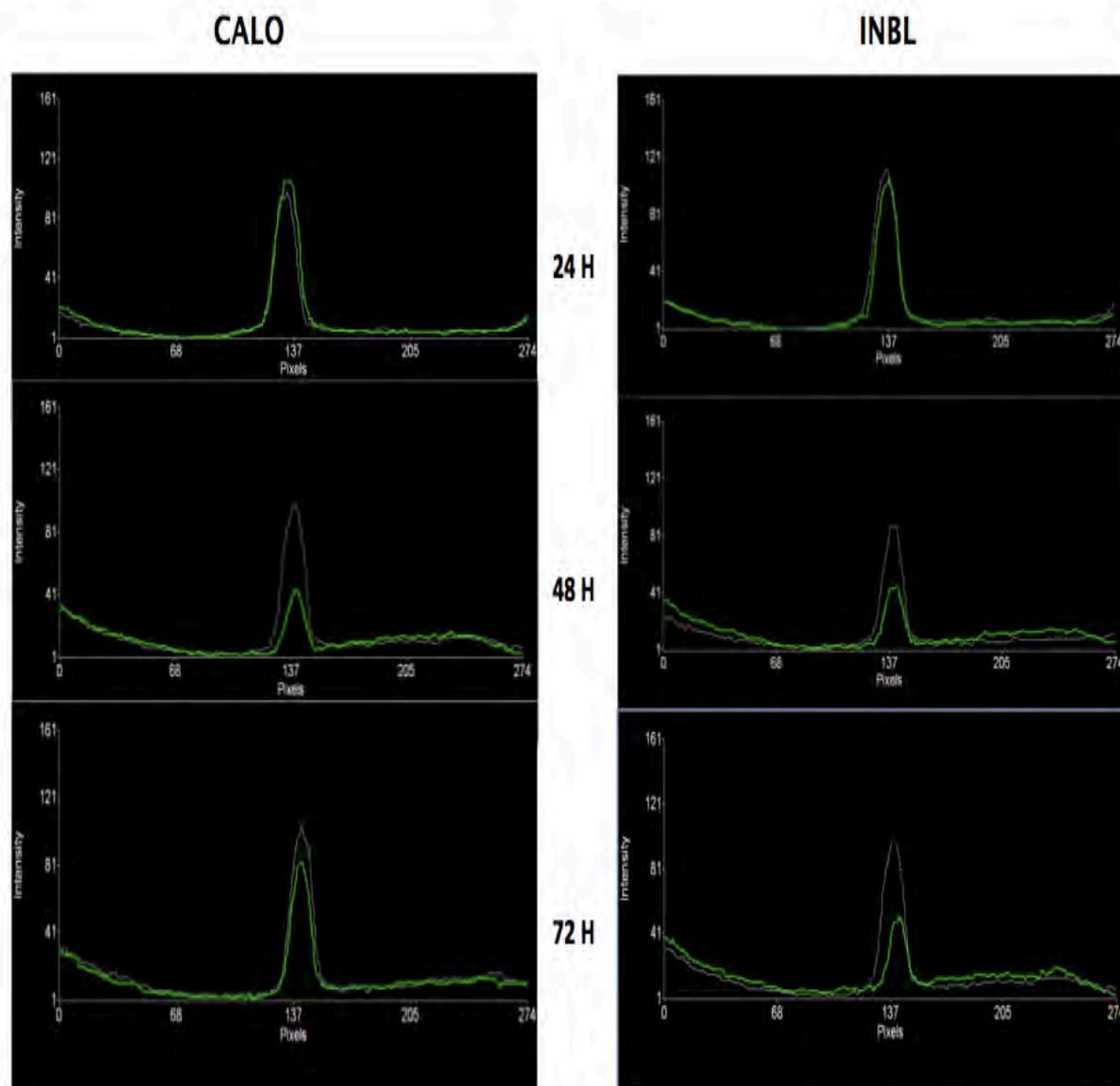


Figura 13. Representaciones en área bajo la curva de los valores arrojados por la densitometría, basada en la intensidad lumínica y pixelaje de cada una de las bandas amplificadas. Esta imagen nos permite apreciar de una forma más clara la condición de la expresión del gen TNF-R1 a los distintos tiempos de estímulo con 100 UI/mL de IL-2, los cuales se muestran en color verde y compararlos con sus respectivos controles, mostrados en color blanco. Se nota que en ambas líneas celulares la expresión de este receptor decremanta considerablemente al tiempo de 48 horas.

6.5 RT-PCR PARA TRAIL-R2

En este caso se analizó la expresión del gen para el receptor TRAIL-R2. Al analizar el gel de agarosa con los productos de su amplificación, se observa un amplificado de 184 pares de bases (**Figura 14**). Es de notar que los amplificados provenientes de la línea celular CALO cultivados en ausencia de IL-2, muestran una disminución gradual con respecto al tiempo del producto de amplificación. Sin embargo, cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2, se observa desde las 48 horas un aumento considerable del producto de amplificación. En el caso de la línea celular INBL, las muestras cultivadas en ausencia de IL-2, muestran una expresión heterogénea, ya que conforme el tiempo transcurre se observa una disminución de la expresión del gen notablemente, las 100 UI/mL de IL-2, parecen inducir una regulación positiva en este receptor desde las 24 hasta las 48 horas (**Figura 14**).

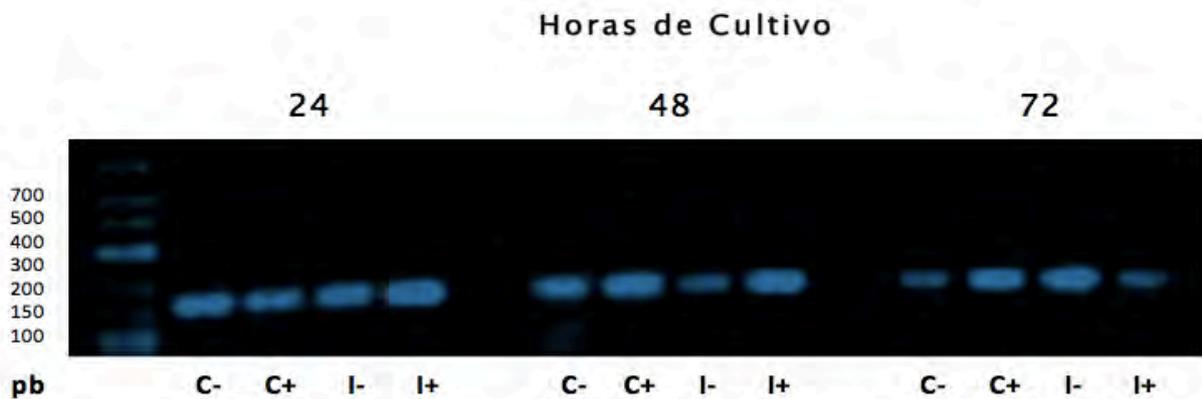


Figura 14. . Productos de amplificación para TRAIL-R2 de las muestras de las líneas de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 184 pares de bases. Se observa que para la línea celular CALO se notan incrementos a las 48 horas y 72 horas. Por otro lado, en INBL sólo a las 48 horas de estímulo con IL-2; **pb**: Tamaño de amplificado en pares de bases.

Los productos de amplificación para el TRAIL-R2 fueron analizados por densitometría y así se verificó el aumento en la transcripción para este gen y por lo tanto de la concentración del amplificado genético, que la IL-2 ejerce sobre este receptor en las líneas celulares de CaCU. Para el caso de la línea celular CALO se observa un incremento de +0.50 ng a las 24 horas y de +0.78 ng a las 72 horas, mientras que para la línea celular INBL hay un aumento de +0.96 ng a las 48 horas (**Tabla 7**).

DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PARA TRAIL-R2

Etiqueta	RF	I-Max	I-Vol	Masa(ng)	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C-24	0.64	224	236427	8.26	0	- 0.27
C+24	0.62	217	229011	7.99	0	
C-48	0.57	219	217796	7.52	0	+ 0.50
C+48	0.56	219	207796	8.03	0	
C-72	0.53	206	193510	7.10	0	+ 0.78
C+72	0.53	216	226120	7.88	0	
I-24	0.60	213	218660	7.60	0	+ 0.41
I+24	0.59	219	232375	8.01	0	
I-48	0.55	205	206149	7.10	0	+ 0.96
I+48	0.55	220	225188	8.06	0	
I-72	0.53	219	223701	8.01	0	- 0.58
I+72	0.54	210	202995	7.43	0	

Tabla 7. Valores numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación para el gen de TRAIL-R2. (RF: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens [lm], I-Vol: Correlación con los valores de volumen de todas las variables, Masa (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de Fondo: Retoque de la fotografía, Ratio (ng): Diferencia entre positivos con estímulo de IL-2 y negativos o controles. Es la cantidad en nano gramos que aumenta [+] o decrementa [-] en comparación con su control. Se aprecia un aumento considerable de este receptor ante el estímulo de IL-2 al tiempo de 48 y 72 horas para la línea celular CALO y a las 48 horas para INBL.

De igual forma se presenta el histograma de regulación de la expresión del gen para TRAIL-R2 en donde se puede visualizar gráficamente los datos numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación efectuados en el software *Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54, donde se destaca el aumento en la concentración del producto de amplificación cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 (**Figura 15**).

HISTOGRAMA DE ACTIVIDAD DEL GEN TRAIL-R2

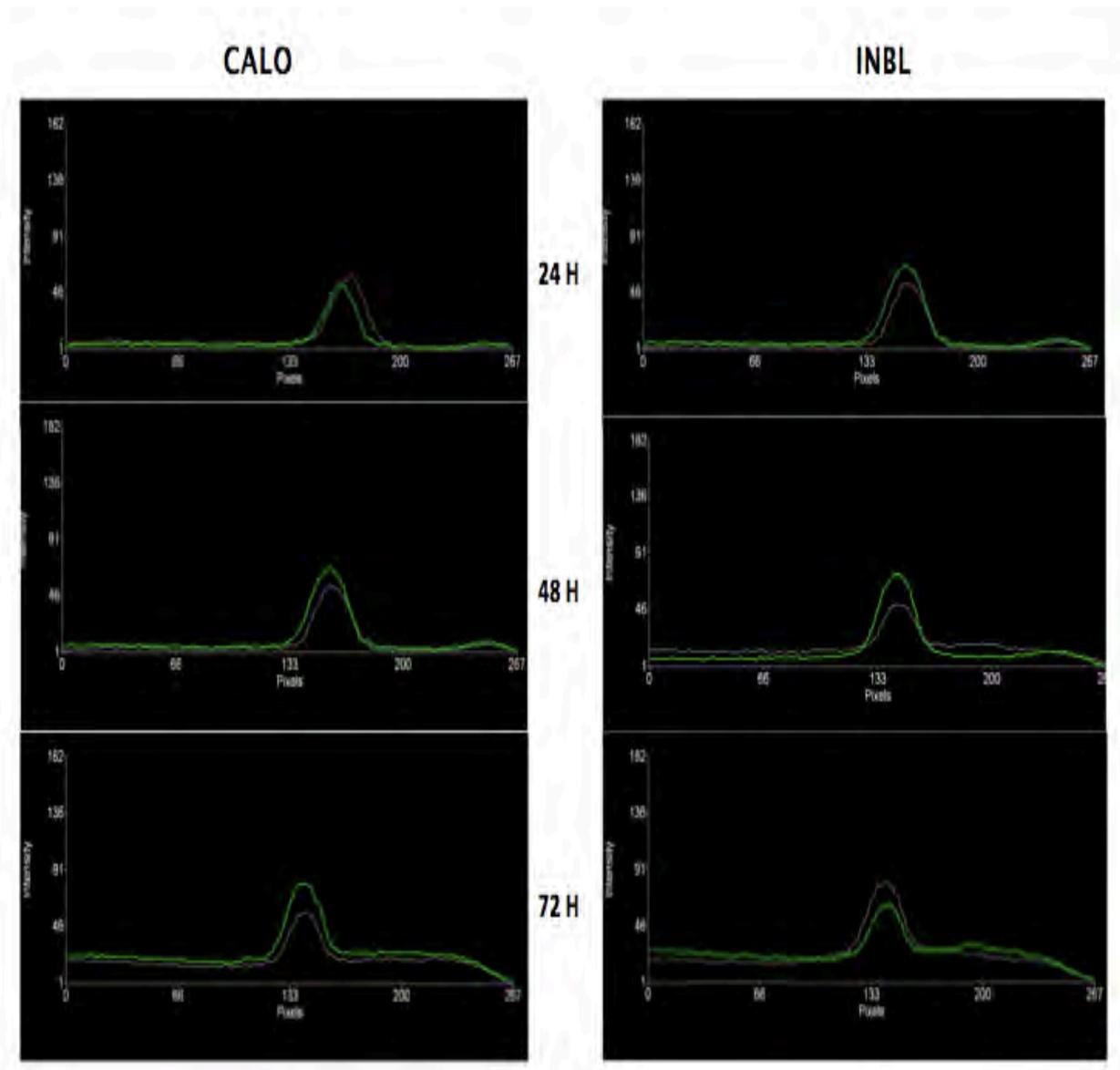


Figura 15. Representaciones en área bajo la curva de los valores arrojados por la densitometría, basada en la intensidad lumínica y pixelaje de cada una de las bandas amplificadas. Esta imagen nos permite apreciar de una forma más clara la condición de la expresión del gen TRAIL-R2 a los distintos tiempos de estímulo con 100 UI/mL de IL-2, los cuales se muestran en color verde y compararlos con sus respectivos controles, mostrados en color blanco. Se aprecia un aumento considerable de este receptor ante el estímulo de IL-2 al tiempo de 48 y 72 horas para la línea celular CALO y para la línea celular INBL a las 48 horas.

6.6 RT-PCR PARA FADD

Por último, se analizó el RNAm de la transcripción del gen para FADD, ésta posee un dominio de muerte homólogo que puede asociarse a los tres receptores de muerte en su región citoplasmática. Tras analizar el gel de agarosa con los productos de su amplificación, observamos una banda de 289 pares de bases (**Figura 16**). Se puede apreciar que los amplificados provenientes de la línea celular CALO cultivada en ausencia de IL-2, muestran un aumento a las 48 horas. Sin embargo, cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2, se observa una acentuación considerable del producto de amplificación a los tiempos de 24 y 72 horas. En el caso de la línea celular INBL, las muestras negativas a IL-2, muestran un incremento con respecto al tiempo, nuevamente 100 UI/mL de IL-2, inducen un incremento considerable para del producto de amplificación para este gen desde a las 24 y 72 horas (**Figura 16**).

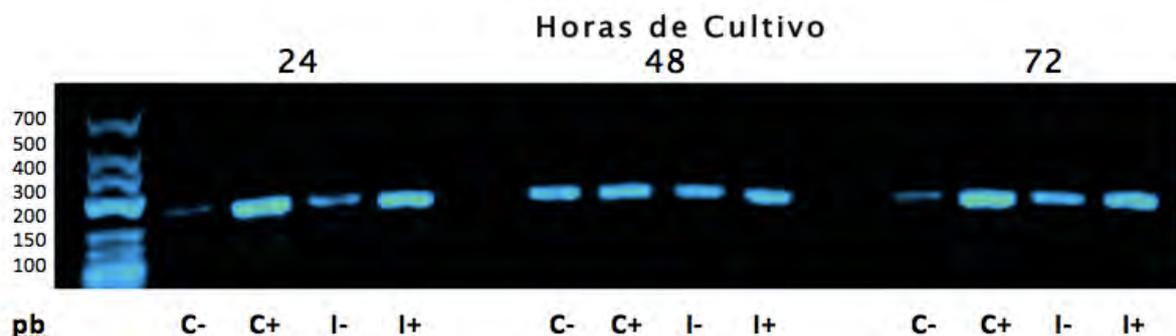


Figura 16. . Productos de amplificación para FADD de las muestras de las líneas de carcinoma de cérvix CALO (C) e INBL (I), utilizando el filtro en alto contraste del equipo de Fotodocumentación DigiDoc-it[®](UVP, EE. UU.). Cultivos en ausencia (-) o presencia (+) de 100 UI/mL de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 289 pares de bases en donde ante el estímulo con la citocina, se nota un aumento a todos los tiempo de cultivo en ambas líneas celulares; **pb**: Tamaño de amplificado en pares de bases.

Los productos de amplificación para el gen FADD fueron analizados por densitometría y así se comprobó la mejora en la expresión del gen y el aumento de la concentración del amplificado genético, que la IL-2 ejerce en las líneas celulares CALO e INBL. Para el caso de la línea celular CALO se observan incrementos de +1.09 ng a las 24horas y +0.99 a las 72 horas. En la línea celular INBL la concentración aumenta +1.17 a las 24 y +1.01 a las 72 horas (**Tabla 8**).

DENSITOMETRÍA DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PARA FADD

Etiqueta	RF	I-Max	I-Vol	Masa(ng)	Corrección de Fondo	Ratio (ng)
C-24	0.43	171	36006	6.40	0	+ 1.09
C+24	0.43	221	44963	7.49	0	
C-48	0.41	215	41200	7.28	0	- 0.04
C+48	0.41	215	41159	7.24	0	
C-72	0.38	184	39954	6.65	0	+ 0.99
C+72	0.38	248	45163	7.64	0	
I-24	0.38	184	37315	6.64	0	+ 1.17
I+24	0.40	255	49680	7.81	0	
I-48	0.40	201	40421	7.06	0	+ 0.02
I+48	0.41	204	40633	7.08	0	
I-72	0.40	256	46820	7.75	0	+ 1.01
I+72	0.41	284	50714	8.76	0	

Tabla 8. Valores numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación para el gen de TRAIL-R2. (RF: Línea de referencia, I-Max: Intensidad máxima proporcionada en lumens [Im], I-Vol: Correlación con los valores de volumen de todas las variables, Masa (ng): Cantidad de ácido nucleico presente en la muestra, Corrección de Fondo: Retoque de la fotografía, Ratio (ng): Diferencia entre positivos con estímulo de IL-2 y negativos o controles. Es la cantidad en nano gramos que aumenta [+] o decrementa [-] en comparación con su control. Se aprecian que en ambas líneas celulares a los tiempos de 24 y 72 horas, existen incrementos considerables en la expresión de este gen.

En el histograma de la regulación de la expresión del dominio de muerte homólogo FADD se muestran gráficamente los datos numéricos proporcionados por el análisis densitométrico de los productos de amplificación efectuados en el software *Doc-ItLS Acquisition and Analysis* versión 7.1 RC3.54, donde se destaca el aumento en la concentración del producto de amplificación de FADD cuando las células son cultivadas en presencia de IL-2 a las 24 y 72 horas (**Figura 17**).

HISTOGRAMA DE ACTIVIDAD DEL GEN FADD

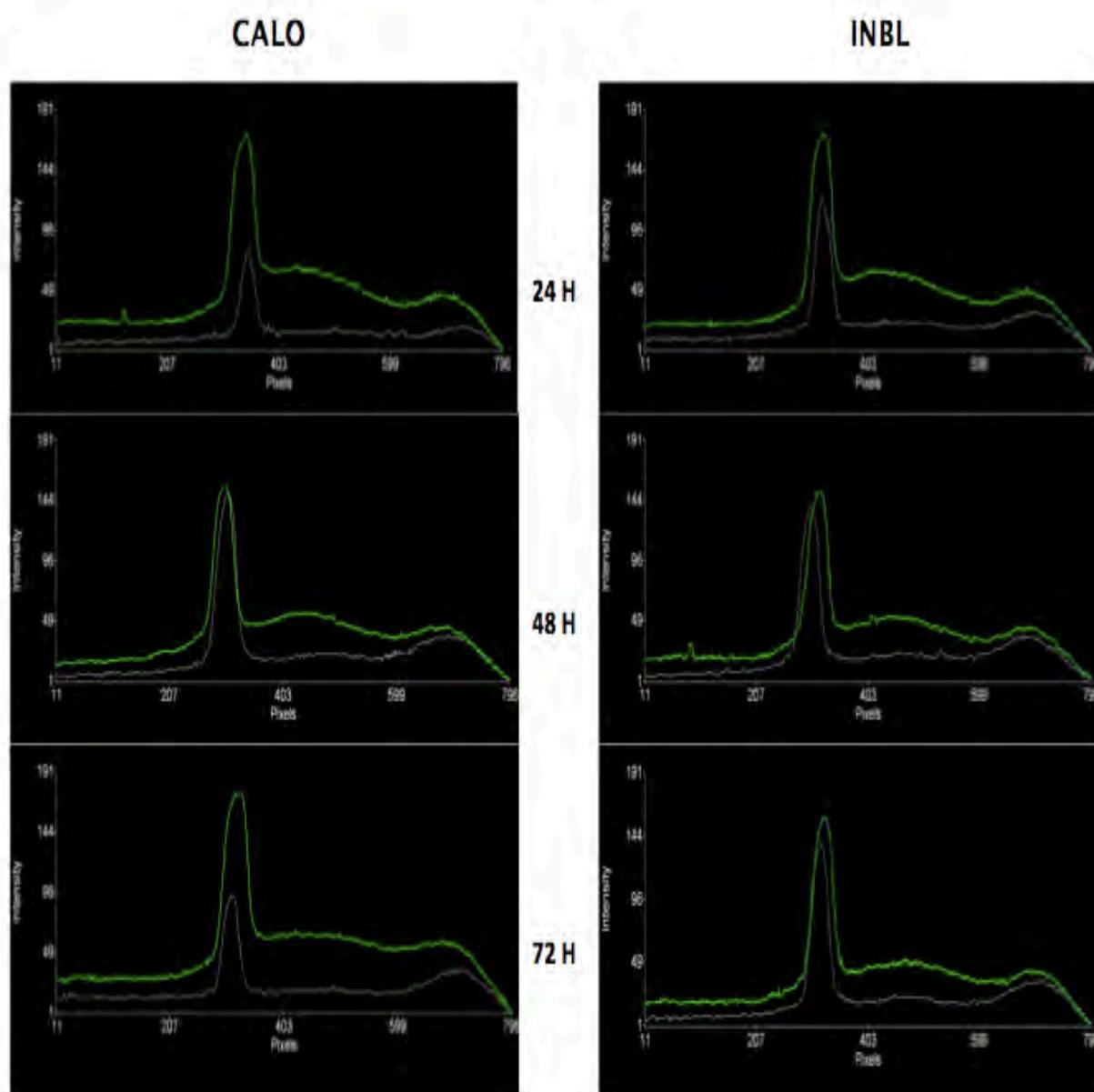


Figura 17. Representaciones en área bajo la curva de los valores arrojados por la densitometría, basada en la intensidad lumínica y pixelaje de cada una de las bandas amplificadas. Esta imagen nos permite apreciar de una forma más clara la condición de la expresión del gen FADD a los distintos tiempos de estímulo con 100 UI/mL de IL-2, los cuales se muestran en color verde y compararlos con sus respectivos controles, mostrados en color blanco. Se nota que en ambas líneas celulares la expresión del RNAm de esta proteína adaptadora aumenta considerablemente, en el caso de CALO al tiempo de 24 Y 72 horas y para la línea celular INBL igualmente.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se ha mencionado, la citocina IL-2 es un potente mediador y activador de diversas células del sistema inmunológico como: Linfocitos T, células NK, macrófagos, linfocitos B, entre otros. El uso de la IL-2 como terapia contra el cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de pulmón, carcinoma de mama y linfomas.

En particular nuestro grupo de trabajo la ha usado como modelo de estudio para el tratamiento de CaCU debido a la alta incidencia de esta enfermedad, sobre la población mexicana. Y por la falta de información sobre los efectos que IL-2 produce en este tipo de carcinoma. Por su parte Rosenberg, en 1985 determinó que parte del mecanismo de inhibición del desarrollo tumoral ejercido por IL-2 de forma *in vivo*, se debe a la capacidad de promover la maduración e infiltrado de linfocitos T CD8+ y células NK al sitio del tumor, lo que aumenta el nivel de actividad lítica del sistema inmunológico hacia las células tumorales (Rosenberg et al., 1985b).

Asimismo, se ha reportado que ante la presencia de dosis menores de IL-2 en el medio extracelular en cultivos de linfocitos T, se favorece la expresión de las subunidades α , β y γ de su receptor (RIL-2), (Cáceres Cortés et al., 1999). También, se ha comprobado que este receptor no es exclusivo de células linfoides y se reporta su presencia en fibroblastos humanos, células endoteliales y células epiteliales intestinales (Ciacci et al., 1993). Igualmente, se ha descrito su presencia en distintos tumores sólidos, como carcinoma colorrectal. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha informado sobre la presencia del RIL-2 en las líneas celulares de CaCU; CALO e INBL, establecidas a partir de biopsias provenientes de pacientes mexicanas y por lo tanto poseedoras de genotipos latinoamericanos (Rocha et al., 2004; Rangel-Corona et al., 1998).

Además, se cuentan con datos que indican que el receptor tiene una expresión y efecto diferencial en estas líneas celulares (Rangel-Corona et al., 1998). De forma que se sabe que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada a cultivos de las líneas celulares CALO e INBL, se puede inhibir su proliferación y desencadenar su muerte celular en presencia de 100 UI/mL de IL-2 o bien, inducir una proliferación con 10 UI/mL (Alvarado 1997; Rangel-Corona et al., 1998).

Por otro lado, se ha reportado que estas mismas líneas, no sólo expresan el RIL-2 de manera funcional (Caceres-Cortes et al., 2001), sino que también producen y secretan pequeñas cantidades de IL-2, lo que sugiere

que las células tumorales de las líneas de CaCU CALO e INBL tienen una dependencia por esta citocina para su proliferación (Rangel-Corona et al, 2010). A pesar de lo antes mencionado desconocemos en gran medida el mecanismo molecular por el cual 100 UI/mL de IL-2 inducen la muerte de las células de las líneas de CaCU CALO e INBL.

Hasta hace unos años solo contábamos con datos morfológicos tanto *in vitro* como *in vivo* de los cambios inducidos en las células de CaCU cuando éstas eran cultivadas en presencia de IL-2. Sin embargo, utilizando el substancial avance en las técnicas en biología molecular y celular, actualmente podemos proporcionar resultados bioquímicos cuantitativos sobre aspectos moleculares implicados en la muerte celular inducida por IL-2 en este tipo de células tumorales. Asimismo, para contribuir en el esclarecimiento de la vía de muerte que induce IL-2 en células de CaCU, los parámetros de muerte hasta ahora obtenidos fueron homologados con los lineamientos del *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) (Galluzzi et al., 2012). Entre dichos parámetros se encuentran los reportados por Sierra Mondragón en 2011 quien menciona el aumento de RNAm para caspasa -8, los datos de Torres Corioles (2012), quien demuestra por citometría de flujo la presencia y aumento de caspasa -3, así como los resultados de Masse Acevedo (2013) quien observa incrementos considerables en el mensajero para el RNAm de BiDt, en las líneas CALO e INBL cultivadas con IL-2. Todas estas, claras evidencias de una muerte celular apoptótica.

No obstante, para la correcta tipificación de este proceso, es importante la descripción de otras moléculas implicadas en la regulación de la vía apoptótica en las células de CaCU. Es por esta razón, que en el presente trabajo se determinó la expresión del RNAm para los receptores de muerte FAS-R, TNF-R1 y TRAIL-R2, así como el RNAm de la Proteína con Dominio de Muerte Asociado a FAS-R (FADD) en células de las líneas CALO e INBL cultivadas con 100 UI/mL de IL-2.

Es importante aclarar que estos receptores se eligieron por ser los principales iniciadores de la vía extrínseca, dependiente de caspasas para la inducción de muerte por apoptosis. Es bien sabido que estos receptores de muerte se encuentran expresados en células de linaje linfoide y que participan regulando su proliferación después de una respuesta inmunológica. Sin embargo, para las líneas celulares CALO e INBL no se había reportado su presencia.

El mostrar evidencia de la síntesis de RNAm para FAS-R, TNF-R1 y TRAIL-R2 en las líneas CALO e INBL en ausencia de IL-2, por sí misma es una información muy relevante y así mismo es importante, ya que debemos

considerar que la presencia de estos no implica que las células sean inducidas a muerte por sintetizar el mensajero de forma continua para estos receptores. Ya que los reportes indican que estos receptores también, están implicados en mecanismos moleculares de prevención pre-apoptótica, la cual como su nombre lo indica, modula la entrada a Apoptosis ante posibles problemas durante la duplicación de DNA y ante situaciones de estrés extracelular o condiciones adversas (Shirley et al., 2013). Esto implica que las vías de proliferación, y las vías de muerte, están ligadas en puntos específicos. Por ejemplo la cascada de señalización del receptor de muerte TRAIL-R2 puede contribuir a la activación transcripcional de NF- κ B mediante interacciones proteicas que conducen a la proliferación celular en donde el complejo TRAF2-NIK-IKK α / β se une al dominio de muerte de la región citoplasmática de este receptor.

Por su parte, el gen promotor de FAS-R, también puede activar la transcripción del factor NF- κ B debido a la aparente presencia de sitios de unión compartidos en las posiciones 286 a 295 con el gen promotor de NF- κ B (Chan et al., 1999). Asimismo, es bien sabida la actividad dual que posee el TNF-R1, el cual colabora en la supervivencia de células tumorales, ya que en su vía canónica de señalización se liga al factor NF- κ B, como una de las principales vías de activación del mismo, conduciendo a las células a la activación de genes antiapoptóticos y a la ubiquitinización de Caspasa - 8.

Por lo tanto, el encontrar expresión de RNAm de los genes promotores de los receptores de muerte en células CaCU, se puede interpretar como un mecanismo ante la constante necesidad de activar factores de transcripción involucrados en la síntesis de DNA, como NF- κ B como una respuesta a los continuos ciclos de división celular que efectúan las células tumorales.

Por otro lado, el haber observado variaciones en las concentraciones del RNAm para FAS-R, TRAIL-R2 y TNF-R1, con respecto al tiempo en ausencia de IL-2 sugiere una síntesis cíclica de los receptores de muerte, ligada a los requerimientos transcripcionales de las células tumorales. Pensamos que en células tumorales, la presencia y regulación cíclica de los receptores de muerte, se ha convertido en un mecanismo de proliferación, ya que como se ha mencionado, FAS-R, TRAIL-R2 y TNF-R1 comparten segundos mensajeros para la transcripción del factor NF- κ B.

Curiosamente, los estudios también indican que para el caso de TRAIL-R2, los eventos de proliferación producto del acoplamiento del complejo TRAF2-NIK-IKK α / β seguirían siendo insuficientes para bloquear la apoptosis, si es que esta fuera inducida, sugiriendo que podría ser simplemente un epifenómeno (Walczak & Krammer, 2000).

Asimismo, en lo reportado para TNF-R1, donde se indica que aunque es considerado como uno de los principales activadores del factor NF- κ B, este podría seguir induciendo apoptosis mediante el reclutamiento de la proteína adaptadora FADD, como pasa en FAS-R y TRAIL -R1 y -R2 (Xiao-Ming & Zheng, 2003).

Es importante retomar la idea de que el reclutamiento de la molécula FADD en la región citoplasmática de los receptores, da como resultado la formación del Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC), que es considerado un punto de no retorno en la cascada molecular para la inducción de muerte por apoptosis. Por esta razón, se incluyó el estudio del RNAm de la proteína con dominio de muerte homólogo FADD, en nuestro trabajo.

Por otro lado y tomando parte ya en los resultados de este trabajo, de forma general, se muestran ligeros aumentos en la expresión del RNAm para los genes de los receptores FAS-R y TRAIL-R2, a las 48 horas principalmente de que las células de las líneas CALO e INBL son cultivadas en presencia de IL-2, así como para el RNAm de la proteína adaptadora FADD en los tiempos de 24 y 72 horas, lo que nos indicaría que IL-2 está interviniendo como un factor de regulación en la expresión de estos mensajeros. Por otro lado para el caso de TNF-R1 se reporta lo opuesto, ya que la concentración de su RNAm baja al mismo tiempo de 48 horas.

De forma particular, en la línea celular CALO observamos que 100 UI/mL de IL-2 regula una mayor expresión del RNAm para FAS-R y TRAIL-R2, al tiempo de cultivo de 48 horas ante el estímulo de IL-2, y que conforme transcurre el tiempo de tratamiento disminuye, por lo cual pensamos que está existiendo un ciclo de regulación en la síntesis del RNAm de este receptor al interactuar con IL-2 y sin dicha interacción ya que se observan regulaciones considerables a las 48 y 72 horas en esta línea celular.

Por otra parte, como ya se comentó, para el caso del receptor TNF-R1 se nota una baja muy considerable en la expresión de su RNAm al tiempo de 48 horas.

En el caso de la línea celular INBL, las 100 UI/mL de IL-2, también están regulando una mayor expresión en la síntesis del RNAm para FAS-R y TRAIL-R2. En ambos receptores la mayor expresión se observa al tiempo de 48 horas en comparación con su control y de igual forma, la expresión del RNA mensajero baja con forme el tiempo de estímulo transcurre, lo que sugiere que en esta línea celular, el RNAm de FAS-R y TRAIL-R2 también parece involucrar en un ciclo de regulación para estos dos genes mediados

por IL-2 a 100 UI/mL y sin la interacción con IL-2. Para el caso de TNF-R1, de igual forma se observa un decremento al tiempo de 48hrs.

Asimismo, aunque los resultados de ambas líneas celulares, para los receptores FAS-R y TRAIL-R2, fueron corroborados por análisis densitométricos y comparados con su respectivo control, pensamos que estos incrementos, no necesariamente sería indicativos de una inducción a muerte celular, ya que de forma natural, la transcripción de los genes codificantes para estos dos receptores muestran un comportamiento cíclico.

Por otro lado, estudios indican que en algunos tipos de cánceres epiteliales, los receptores de muerte, principalmente; FAS-R y TRAIL -R1 y R2 continúan siendo funcionales, a pesar de las diversas desregulaciones, propias de enfermedades como el cáncer. Esto indicaría que para estos receptores las señales de muerte prevalecen aun sobre las relaciones de supervivencia (Shirley et al., 2013).

Por esto mismo, el haber observado el incremento en la síntesis de RNAm en FAS-R y TRAIL-R2, para ambas líneas celulares, podría ser la respuesta a él cómo las 100 UI/mL de IL-2 están induciendo la muerte celular tipo apoptótica en las líneas celulares de CaCU CALO e INBL. Si bien es cierto que la activación de estos receptores de forma natural es mediada principalmente por la asociación con su ligando específico, anticuerpos monoclonales o moléculas afines (Xiao-Ming & Zheng, 2003), existen reportes de efectos de activación de los receptores por fenómenos de montado espontáneo en ausencia y pre ligando, a lo que se le ha denominado efecto PLAD, el cual ocasiona tripletes de activación auto catalíticos por estrés que consecuentemente propagan la señal apoptótica (Siegel et al., 2000).

Por otro lado, el decremento de TNF-R1 en las dos líneas celulares CALO e INBL, da pie a pensar en que IL-2, está inhibiendo una ruta clave de síntesis de DNA (NF- κ β), mermando así la proliferación celular.

En el caso de los resultados obtenidos para el RNAm de la proteína adaptadora FADD, se muestran que las células CALO e INBL expresan el RNA mensajero, pero ante la inducción del estímulo de 100 UI/mL de IL-2 su expresión aumenta considerablemente. En el caso de CALO, esta alza es denotada a las 24 horas con +1.09 ng y a las 72 horas con +0.99 ng. En la línea celular INBL el efecto es semejante ya que la síntesis de RNAm para esta proteína se eleva a +1.17 ng a las 24 horas de estímulo, mientras que a las 72 horas el aumento es de +1.01 ng.

Por otra parte, la inducción a una mayor síntesis de RNAm de la proteína FADD, podría indicar de manera indirecta, que los receptores de muerte FAS-R y TRAIL-R2 son funcionales en estas líneas celulares y que IL-2 está induciendo a las líneas celulares CALO e INBL a sintetizarlos de forma más continua y que además, estos receptores podrían verse activados por el estrés de las 100 UI/mL de la citocina IL-2. Esta hipótesis a su vez, se apoya en datos recientes, donde se muestran fragmentaciones de DNA a secuencias de 200 pb en las líneas celulares CALO e INBL cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, la cual es una característica ineludible del proceso apoptótico, así como la salida de la proteína Citocromo C de la matriz mitocondrial (Del-Rio Ortiz., 2013).

Por otra parte el denoatdo aumento en la sintesis de RNAm para la proteina FADD, tambien podria dar pie a pensar en la existencia de algun mecanismo alterno donde FAAD independiente de receptores de muerte, pudiera sociarse a caspasa -10 y ocasionar muerte celular (CITA).

Si bien nuestra investigación proporciona información suficiente para poder proponer que la vía de muerte por la cual las 100 UI/mL de la citocina IL-2 recombinante humana induce la muerte en las células de CaCU CALO e INBL, es por la de la apoptosis vía extrínseca dependiente de Caspasas, aun quedan aspectos sobre el mecanismo molecular exacto de cómo IL-2 puede mediar la sobre expresión de estos receptores de muerte en células tumorales y si existen mediadores o segundos mensajeros que coadyuven a que se produzca este fenómeno. De igual forma se fortalece la idea de que el tratamiento con IL-2 para pacientes con CaCU se vislumbra como una alternativa terapéutica viable y prometedora, por inducir la muerte por apoptosis de las células tumorales en estadios tempranos (IIB) en el caso de la línea celular CALO y en estadios tardíos (IVB) en el caso de la línea celular INBL. Y al mismo tiempo activar la respuesta inmunológica del paciente por la presencia de IL-2, lo que como ya se mencionó, se sabe que induce la generación de células citotóxicas con actividad antitumoral.

8. CONCLUSIONES

- ✚ El RNAm de los receptores de muerte FAS-R, TRAIL-R2 y TNF-R1 está siendo expresado en las líneas celulares de CaCU: CALO e INBL cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/mL de IL-2.
- ✚ En las líneas celulares CALO e INBL cultivadas en presencia de 100 UI/mL de IL-2, decreta la expresión del RNAm de TNF-R1 al tiempo de 48 horas en comparación de su transcripción normal.
- ✚ 100 UI/mL de IL-2 regula el aumento en la expresión del RNAm para FADD en las líneas celulares CALO e INBL a los tiempos de 24 y 72 horas.

9. PERSPECTIVAS

- ✚ Confirmar la presencia de los receptores FAS-R y TRAIL-R2 en membrana mediante citometría de flujo
- ✚ Confirmar la inhibición del receptor TNF-R1 en membrana mediante citometría de flujo
- ✚ Realizar mediciones mediante microscopía confocal de la formación de los tripletes de activación auto catalíticos ante estímulos de IL-2
- ✚ Analizar la expresión de RNAm y proteína del factor transcripcional NFKB y caspasa -10

10. REACTIVOS Y SOLUCIONES

APÉNDICE I

Condiciones utilizadas en la técnica RT-PCR y densitometría

a. Retrotranscripción:

Para el presente estudio se partió de 2µg de RNA total para todas las muestras (Controles y tratamientos con IL-2). Para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

Absorbancia 260: Lectura dada por cada muestra en el biofotómetro que representa el máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos. A esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración.

Volumen de disolución: Se utilizó una dilución 1:50 en un volumen de 200µl.

40: Unidad de densidad óptica (1UDO) equivale a 40µg/mL del biofotómetro.

$$\frac{(\text{Absorbancia 260}) (\text{Volumen de la disolución}) (40)}{1000}$$

Teniendo los cálculos de todas las muestras y partiendo de 2µg de RNAm se prosiguió a realizar la RT con las siguientes condiciones establecidas para una reacción (Rx), (Tabla 3). Cada una de las condiciones por reactivo se multiplicó por el número total de reacciones que se quisieron obtener (5 controles y 5 tratamientos):

Reactivos	1 RX
Amortiguador 5x <small>(PROMEGA)</small>	5 µl
DNTP's 10 Mm <small>(INVITROGEN)</small>	1.5 µl
Enzima MMLV-RT <small>(PROMEGA)</small>	1 µl
Oligo dt <small>(PROMEGA)</small>	2 µl
Muestra	¿ µl
Agua libre RNAsas <small>(FERMENTAS)</small>	¿ µl
Volumen Total	20 µl

Tabla 9. Condiciones para RT.

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Con los cDNA obtenidos de la RT se llevó a cabo la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren (tabla 4), para cada primer utilizado en el presente estudio (FAS-R, TNF-R1, TRAIL-R2, FADD y β Actina).

Reactivos		1 RX
Amortiguador (PROMEGA)	5x Green	6 μ l
DNTP's 10 Mm (INVITROGEN)		0.8 μ l
Primer 1 (Sentido) (UNIPARS, S.A.)		1 μ l
Primer 2 (Anti sentido) (UNIPARS, S.A.)		1 μ l
Go Taq Polimerasa (PROMEGA)		0.15 μ l
Muestra cDNA		4 μ l
Agua libre RNAsas (FERMENTAS)		7.05 μ l
Volumen Total		20 μl

Tabla 10. Condiciones para PCR.

c. Marcador para Electroforesis y Densitometría

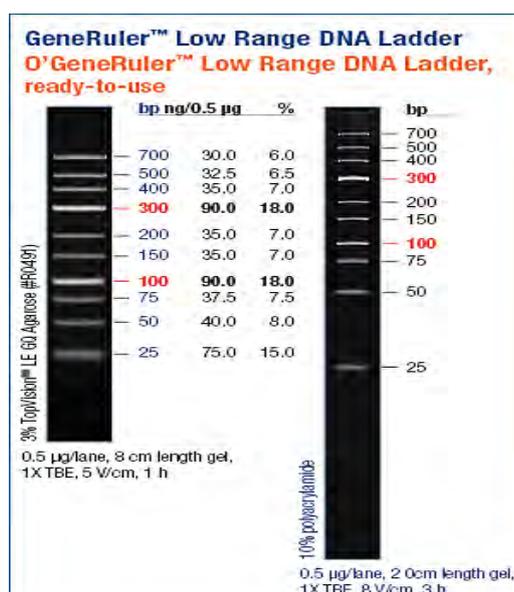


Figura 18. Marcador de tamaños de amplificado y valor de concentración por banda

APÉNDICE II

Reactivos y Soluciones usadas

Soluciones para cultivo

- RPMI-1640/10% SFB
- Solución fisiológica de Verseno
- Solución de Fosfatos (PBS)
-

Reactivos Extracción RNA Total

- TRIzol (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol 70%
- H₂O inyectable
- H₂O libre de RNAsas

Reactivos para Retrotranscripción (RT)

- Amortiguador 5X (Promega)
- DTT 0.1M (Invitrogen)
- Enzima MMLV-RT (Promega)
- DNTP´S 5mM (Invitrogen)
- Oligo dT (Promega)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos para Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Amortiguador 5X Green *GoTaq* (Promega)
- DNTP´S 10 mM (Invitrogen)
- Enzima *GoTaq* DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)
- Primers: β - Actina (1:10), FAS-R (1:5), TNF-R1 (1:5), TRAIL-R2 (1:5) y FADD (1:5) (Unipars S.A)
- H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Reactivos y soluciones para electroforesis

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

APÉNDICE III

Preparación de reactivos y soluciones usadas

- **Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)**

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

- **DNTPS 10 mM (MIX)**

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

- A 100 μl (Invitrogen S.A de C.V)
- G 100 μL (Invitrogen S.A de C.V)
- T 100 μL (Invitrogen S.A de C.V)
- C 100 μL (Invitrogen S.A de C.V)

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

- **TBE 10X**

- Tris base 108g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Ácido bórico 55g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- EDTA 0.5 M 40 mL (Sigma chemical Co.U.S.A)

Se lleva a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Se guardó a temperatura ambiente hasta su uso.

- **TBE 1X**

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

- **TBE 0.5X**

Tomar 250 mililitros de TBE 1X y diluirlo en 250 mililitros de agua destilada

- **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. Para su preparación se utilizan las siguientes sustancias:

- Tris base 3.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.04 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen -diamen-tetra-acético(EDTA) 0.40 g (Sigma chemical Co.U.S.A)

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada, que ajusta al pH a 7.7 con HCL 1M y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min.

- **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. Los componentes se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua bidestilada.

- Cloruro de magnesio 0.10 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de calcio 0.10 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 8.00 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.20 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato mono ácido de sodio 2.16 g (Sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato diácido de potasio 0.20 g (Sigma chemical Co.U.S.A)

El cloruro de magnesio y de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada y después se adicionan los 100 ml que contengan el cloruro de magnesio y de calcio. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 utilizando HCL 8N y se afora finalmente a un volumen final de 1000ml Esta solución se esteriliza por medio de autoclave a 20 lbs durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento del uso.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrams JS, Rayner AA, Wiernik PH. 1990. High-dose recombinant interleukin-2 alone: a regimen with limited activity in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 82: 1202-6.
2. Aggarwal BB. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. Sep;3(9):745-56.
3. Alnemri E, Livingston D, Nicholson D, Salvensen G, Thornberry N, Wong W, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *J Cell*, 1996: 87.
4. Alonso P, Lozano E y Hernández M. 2000. Cáncer Cervico-Uterino diagnóstico, prevención y control. 254-267 Panamericana.
5. Alvarado M. J. 1997. Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura de FES-Zaragoza UNAM.
6. Ashkenazi A, Dixit VM. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin. Cell Biol*. 11: 255-260.
7. Ayala Alpuche. 2005. Efecto de la IL-2 encapsulada en liposomas neutros y aniónicos sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL. Tesis de Licenciatura de Fes Zaragoza-UNAM.
8. Barbara S, Zoschnick L. 2001. Bethesda System Terminology. *Am Fam Physician*. 2001 Nov 15;68(10):1992-1999.
9. Barca GE. 1997. Tratamiento con interleucina 2 en pacientes con neoplasia linfoides en remisión completa con alto riesgo de recaída. Tesis Doctoral de la Facultat de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona
10. Bennet M, MacDonald, K, Chan SW, Luzio JP, Simari, Weissberg P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282: 290-293.
11. Berke G. 1995. The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12.
12. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor α from cells. *Nature* 385: 729-733
13. Boatright KM & Salvesen GS. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin. Cell Biol* 15:72-731.

-
-
14. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85: 803-815
 15. Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH. 1995. Self-association of the 'death domains' of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270: 387-391.
 16. Brandhuber BJ, Boone T, Kenney WC, McCay OB. 1987. Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science* 238: 1707-9.
 17. Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. 2006. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6: 196-204.
 18. Buendia B, Santa Maria A, Courvalin JC. 1999. Caspase dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112:1743-1753.
 19. Caballero A & Mora J. 2002. Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica. *REB* 2002, 2:235-244.
 20. Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A. 1999. Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res*; 61: 6281-6289.
 21. Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB. 1999. Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappaB p50-p65 recruitment. *Mol. Cell Biol.* 19, 2098-2108.
 22. Ciacci C, Mahida R, Dignass A, Koizumi M y Podolsky K. 1993. Functional Interleukin-2 Receptors on Intestinal Epithelial Cells. *Clin Invest* 92:527-532.
 23. Clarke-Pearson D, Soper TJ. 2011. Manejo del cáncer ginecológico. Identificación, Diagnostico y Tratamiento. Capitulo 4 Amolca.
 24. Coventry J, Weeks C, Heckford E, Sykes J, Bradley J. y Skinner M. 1996. IL-2 Cytokine Expression Despite IL-2 Messenger RNA Transcription in Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Primary Human Breast Carcinoma. *Immunology* 156:3486-3492.
 25. Creagh E, Conroy H, Martin S. 2003. Caspase activation pathways in apoptosis and immunity. *J Immunol*, 2003: 193
 26. Damle NK, Doyle LV, Bradley EC. 1986. Interleukin 2-activated killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. *J Immunol* 137:2814-8.

-
-
27. Del Rio Ortiz I. 2013. Estudio de la participación de genes mitocondriales citocromo C y COX4 en células de carcinoma de Cérvix CALO e INBL. Tesis de Maestría de Fes Zaragoza-UNAM.
28. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17: 2215-2223
29. Duan H, Dixit VM. 1997. RAIDD is a new "death" adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.
30. Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of programmed cell death. *J. Toxicol pathol*, 2007: 35.
31. Elumalai P, D.N. Gunadharini, K. Senthilkumar, S. Banudevi, R. Arunkumar, C.S. Benson, G. Sharmila, J. Arunakaran. 2012. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway *Toxicol Lett* Nov 30;215(2):131-42.
32. Feng G, Kaplowitz, N. 2000. Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. *J. Clin. Invest.* 105, 329-339.
33. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin, KM. 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* 2, 574-580.
34. Galluzzi L, Kroemer GP, Vandenabeele J, Abrams ES, Alnemri EH, Baehrecke MV, Blagosklonny WS, El-Deiry P, Golstein DR, Green M, Hengartner RA, Knight S, Kumar SA, Lipton W, Malorni G, Nuñez ME, Peter J, Tschopp J, Yuan M, Piacentini B, Zhivotovsky G, Melino L. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death (2009). *Cell Death and Differentiation.* *Nature* 16, 3-11.
35. Golstein, P. 1997. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr. Biol.* 7, R750-R753.
36. Grimm EA, Mazumber A, Rosenberg SA. 1982a. In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes. Generation of allospecific cytotoxic lymphocytes to nonimmunogenic antigen by supplementation on in vitro sensitization with partially purified T cell growth factor (PP-TCGF). *Cell Immunol* 70:248-59.
37. Grimm EA, Mazumder A, Zhand H. 1982b. The lymphokine activated killer cell phenomenon: Lysis of NK resistant fresh solid tumors cells by IL-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155: 1823-41.
38. Guimares P & Linden Rafael. 2004. Programmed cell death Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem*; 271:1638-1650.
39. Hu WH, Johnson H, Shu HB. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J. Biol. Chem.* 274, 30603-30610.

-
-
40. Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Leverson JD, Hunter T. 2000 The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspase-3 and -7. *J. Biol. Chem.* 275, 26661-26664.
41. Janeway, Travers, Walport, Capra. 2000. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Edit. Masson, Barcelona 115-136.
42. Jiang YP, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. 1999. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
43. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265, 528-530.
44. Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters* 399: pp. 104D.
45. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
46. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-5588.
47. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 276, 46639-46646.
48. Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. 2000. FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis: lack of trail-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275, 25065-25068.
49. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; 171:4672-9.
50. Leonard WJ, Depper JM, Kronke M, Robb Rj, Waldmann TA. 1985. The human receptor for T cell growth factor (TCGF): evidence for variable post-translation, sulfation and ability of precursors forms of the receptor to bind TCGF. *J Biol Chem* 260: 1.872-1.880.
51. Leyton L, A. F. Quest. 2004. Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on a recurrent theme in cell life and death. *Biol Res*; 37(1): 29-43.
52. Longo L, Kasper D, Jameson L, Fauci S, Hauser L, Loscalzo J. 2012.: Harrison: Principios de Medicina Interna. Capítulo 7 18ed Vol.1 Mc Graw Hill.
53. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652.

-
-
54. Martinon F & Tschopp J. 2007. Inflammatory caspase and inflammasomes: master switches of inflammation. *J Cell Death Differ*, 2007: 14.
55. Masse Rubi. 2013. 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 de Fes Zaragoza-UNAM.
56. Mazumder A, E.L. DuPree, A. Almasan. 2004. A Dual Role of Cyclin E in Cell Proliferation and Apoptosis May Provide a Target for Cancer Therapy. *Curr Cancer Drug Targets* February 4(1): 65–75.
57. McMillan D, Kernohan M, Flett M, Heys S, Deehan D, Sewell H, Walker F, Eremin O. 1995. 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. *Cancer* 60: 776-785.
58. Mehlen P, Bredesen DE. 2011. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* 4: mr2.
59. Mire S, Thorpe R. 1998. *Cytokines*. 19-33 Academic Press Great Britain.
60. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. 1976. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193: 1007-8.
61. Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann E M, Walczak H, Hofmann WJ. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.* 99, 403–413.
62. Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* 188, 2033–2045.
63. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death – inducing signaling complex. *Cell* 85: 817–827
64. Nazzal N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F y Bronda M. 2006. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: una visión actual. *Chil Obstet Ginecol* 71(5):341-348.
65. Oocities.org. Caspasas Apoptosis [en línea]. Octubre 2000 [14-01-2013]. Disponible en: <http://www.oocities.org/hmontoliu/caspase/caspase-1.html>
66. Peter ME, Hellbardt S, Schwartz-Albiez A, Westendorp MO, Walczak H, Moldenhauer G. 1995. Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Diff.* 2, 163–171.
67. Peter ME. 2000. The TRAIL DISCUSSION: it is FADD and caspase-8. *Cell Death Diff.* 7, 759–760.

-
-
68. Pistritto G, Jost M, Srinivasula S, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri E. 2002. Expression and transcriptional regulation of caspase 14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ* 2002, 9: 9.
69. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271, 12687-12690.
70. Rai N, Tripathi K, Sharma D, Shukla V. 2005. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *J. Low Extrem Wounds*, 2005: 4.
71. Rangel-Corona, L. Rodríguez Cruz, G. Flores Flores, C. Gómez Ruiz, I. Soto Cruz, J.F. Mendoza Rincon, B Weiss Steider. 1998. Differential expression of the tree components of the Interleukin2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors PP12391243*.
72. Rangel-Corona, Corona-Ortega T, Soto-Cruz I, López-Labra A, Pablo-Arcos T, Torres-Guarneros CF, Weiss-Steider B. 2010. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine.* 2010 Jun;50(3):273-7. doi: 10.1016/j.cyto.2010.02.013. Epub 2010 Mar 15
73. Rebollo A, A. Silva. 1994. Estructura y función del receptor de IL2. *Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Inmunología volumen 13 numero 2 de Abril Junio de 1994.*
74. Riedl SJ & Shi Yigong. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molcular Cell Biol* 5:897-907.
75. Riedl SJ & Salvesen G. 2007. The apoptosis: signaling platform of cell death. *Mol Cell Biol Nat Rev* 5: 405-413.
76. Robb RJ, Smith KA. 1981. Heterogeneity of human T cell Growth factor(s) due to variable glycosylation. *Mol Immunol* 18: 1.087-1.094.
77. Rocha Z, Huitron C, Cacéres C, Alvarado M, Valle M, Soto C, Weiss S y Rangel C. 2004. Interleukin-2 (IL-2) receptor- $\beta\gamma$ signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Elsevier Cellular signaling* 16: 1239-1247.
78. Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M. 1984. Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Eschenchia Coli*. *Science* 223: 1412-4.
79. Rosenberg SA, Mule 11, Spiess PJ, Reichert CM, Schwarz SL. 1985a. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumors mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin-2. *J Exp Med* 161: 1169-88.
80. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM. 1985b. Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313: 1485-92.

-
-
81. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316:889-97.
82. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC. 1989a. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg* 210:474-85.
83. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC. 1989b. Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for the treatment of patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 7: 1863-74.
84. Savill J, Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-8.
85. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187, 1205-1213.
86. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439-459.
87. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 655-662.
88. Seigel U, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo R, Nash WG, O'Brien SJ. 1984. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science* 223: 175-8.
89. Shi YG. 2004. Caspase Activation: Revisiting the induced proximity model. *Cell* 117: 855-858.
90. Shi Yigong. 2005. Activation of initiator caspasas: History. Hypotheses and perspectives. *Cancer Mol* 1(1): 9-18.
91. Shirley S, F Dufour, O Micheau. 2013. Death receptors as target in cancer. *The British Pharmacological Society* doi: 10.1111/bph.12238.
92. Shudo K, Kinoshita K, Imamura R, Fan H, Hasumoto K, Tanaka M. 2001. The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. *Eur. J. Immunol.* 31, 2504-2511.
93. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288: 2354-2357.

-
-
94. Sierra Edith. 2011. Participación de Caspasa 8 y 12 en la regulación de Apoptosis en líneas celulares de cáncer cervico uterino cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Licenciatura de Fes Zaragoza-UNAM.
95. Smith KA. 1988. Interleukin-2: inception, impact and implications. *Science* 240: 1.169-1. 176.
96. Sodeman, T., Bronk, S. F., Roberts, P. J., Miyoshi, H., and Gores, G. J. 2000. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G992-G999.
97. Stennicke H, Jurgensmeier J, Shin H, Deveraux Q, Wolf B, Yang X, Zhou Q, Ellerby M, Bredesen D, Green D, Reed J, Froelich, Salvesen G. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase -8. *J. Biol. Chem.* 1998: 273.
98. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. 1997. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J. Exp. Med.* 186, 2045-2050.
99. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
100. Takeshita T, Asao H, Ohtani K. 1992. Cloning of the γ chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257:379-82.
101. Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F. 1996. Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* 2, 317-322.
102. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T. 1983. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302:305-10.
103. Tapia-Conyer R., Kuri-Morales P., Macías Ma. C., Martínez M. 1999. Mortalidad por cancer en México. Capítulo 1 por: Meneses-García A; Mohar-Betancourt A.
104. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F. 1997. Viral FLICE- inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521.
105. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F. 1997. Viral FLICE- inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386: 517-521.
106. Thompson JA, Peace DJ, Klarnet JP, Kern DE, Greenberg PD, Cheever MA. 1986. Eradication of disseminated murine leukemia by treatment with high-dose interleukin-2. *J Immunol* 137:3675-80.
107. Thornberry N & Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281.5381.1312-116.

-
-
108. Torres Edgar. 2012. Interlucina 2 regula la expresión de la Caspasa 3 en líneas celulares de cáncer cervicouterino CASKI, CALO, INBL y SIHA. Tesis de Licenciatura de Fes Zaragoza -UNAM.
109. Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC. 2000 Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 23319-23325.
110. Ullman KS, Northrop JP, Verweij CL, Grabtree GR. 1990. Transmissions of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8:421-52.
111. Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-99.
112. Wajant H, Scheurich P. 2001 Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 19-32.
113. Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636.
114. Walczak H, Krammer PH. 2000. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* 256, 58-66.
115. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331-367.
116. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS. 1998 NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF 1 and TRAF 2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
117. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13884-13888.
118. Weiss-Steider B, Monrroy GA, Rangel-Corona R, Zavaleta RL, Becerril TC, Gaitan RL, Martinez DR. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares, provenientes de biopsias de cervix normal y con cancer cervico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de Desmogleina-1. *Oncologia* 1992,7:69-78
119. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
120. Xiao-Ming Yin, Zheng Dong. 2003. *Essentials of Apoptosis, a guide for basic and clinical research* Totowa, New Jersey EE. UU.