



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Efecto de interleucina 2 (IL-2) sobre la
proliferación celular, la activación de
STAT5 y su translocación a núcleo en la
línea celular SiHa**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

Diego Francisco Morelos Laguna

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Isabel Soto Cruz

Ciudad de México, febrero 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que el alumno **MORELOS LAGUNA DIEGO FRANCISCO**, con número de cuenta **311247451**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **18 de junio de 2019** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- | | |
|-------------------|----------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA |
| VOCAL | Dra. ISABEL SOTO CRUZ |
| SECRETARIO | Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ |
| SUPLENTE | Dra. MARÍA DE LORDES MORA GARCÍA |
| SUPLENTE | Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO |

[Firma: Alberto Monroy García]
[Firma: Isabel Soto Cruz]
[Firma: Luis Sánchez Sánchez]
[Firma: María de Lores Mora García]
[Firma: Juan José Rodríguez Mercado]

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de interleucina-2 (IL-2) sobre la proliferación celular, la activación de STAT5 y su translocación a núcleo en la línea celular SiHa.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
 Ciudad de México, a 07 de mayo de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 ZARAGOZA
 DIRECCIÓN

[Firma: José Luis Gómez Márquez]

Vº. BO.
 Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
 JEFE DE CARRERA

RECIBI
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

CONTENIDO

Agradecimientos	6
Dedicatoria.....	7
Resumen	8
Introducción.....	9
Cáncer	9
Cáncer de cérvix.....	12
Virus del papiloma humano.....	13
Interleucina 2	15
Vía JAK/STAT	16
Vía JAK/STAT activada por IL-2 en células normales.....	17
Vía JAK/STAT activada por IL-2 en células tumorales	18
Justificación y planteamiento del problema.....	20
Hipótesis	20
Objetivos.....	21
General.....	21
Particulares	21
Materiales y Métodos.....	22
Cultivo celular	22
Ensayo de proliferación	22
Determinación de pSTAT5 citoplasmático.....	23
Determinación de pSTAT5 nuclear	23
Análisis estadístico.....	25
Resultados.....	26
La línea celular SiHa responde a 10 UI/mL de IL-2 para favorecer su proliferación, mientras que 100 UI/mL de IL-2 tienen el efecto opuesto	26
.....	27
.....	27
IL-2 aumenta la fosforilación citoplasmática de STAT5	27
IL-2 aumenta la translocación de pSTAT5 al núcleo	28
Discusión	30
Conclusiones	33
Perspectivas	33

Referencias	34
Anexo 1: reactivos.....	38
Anexo 2	40

Apoyo institucional

El trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular (Laboratorio 9 Planta Baja) perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la UNAM a través del programa PAPIIT (IN222218) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto 253262).

Especial agradecimiento a la UNAM a través del programa PAPIIT por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Isabel Soto Cruz, por su apoyo, paciencia y por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, apoyando así mi desarrollo académico y personal.

Al Dr. Arturo Valle Mendiola, porque ser un gran maestro para mí, tanto en mi vida académica como personal, por siempre responder a todas mis dudas con una gran sonrisa en el rostro, mostrándome el gran amor que se le puede tener al conocimiento y a la ciencia, y sobre todo por su valiosa amistad y confianza, impulsándome siempre a seguir adelante.

A los miembros del grupo de investigación del laboratorio 9, Octavio Zerecero Carreón, Adriana Gutiérrez Hoya y María del Carmen Lagunas Cruz, por compartir sus conocimientos, apoyo y sus enseñanzas.

A los miembros del jurado: Dr. Alberto Monroy Juan José Rodríguez Mercado, por brindar sus conocimientos y consejos para desarrollar mi trabajo de forma satisfactoria.

A Itzel Guadalupe Salazar Valencia, porque con tu constante motivación y apoyo incondicional me has impulsado para poder terminar esta meta en mi vida.

A mis padres, José Ma. Morelos Martínez y Oralia Laguna Serrano, porque siempre apoyaron mi amor por la ciencia e impulsaron a siempre lograr mis objetivos.

A mis hermanos José María Morelos Laguna y Ruth Estefanía Morelos Laguna, porque siempre estuvieron para mí, por compartir momentos tan bellos de sonrisas y carcajadas, y por enseñarme que siempre se puede lograr aún más.

DEDICATORIA

A mis padres, José Ma. Morelos Martínez Oralia Laguna Serrano, por ser grandes ejemplos de vida al dedicar todo su esfuerzo y trabajo a formarme como un hombre recto y honesto, por siempre enseñarme el valor del trabajo, porque siempre me han brindado todo el apoyo y confianza que he necesitado, siempre me han escuchado y me han aconsejado para tomar la mejor decisión, porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias por tanto amor y apoyo, les prometo que siempre haré que estén orgullosos de todo su esfuerzo y sacrificios.

A mi hermana, Ruth Estefanía Morelos Laguna, porque siempre has sido una gran inspiración para mí, por mostrarme que puedo lograr todo lo que me proponga con una gran sonrisa en el rostro, siempre has estado para mí y me has mostrado que los límites no existen.

A mi hermano, José María Morelos Laguna, porque solo contigo he podido compartir mis gustos y aficiones, por siempre acompañarme y mostrarme que uno puede dedicarse a lo que ama y porque siempre me has cuidado más allá de las responsabilidades de un hermano mayor.

A Itzel Guadalupe Salazar Valencia, te convertiste en una gran inspiración para mí, me has ayudado a poner los pies en la tierra y me has ayudado a desarrollar mi camino. Es inefable explicar lo que representas para mí, e inexplicable por qué llegaste a mi vida, pero todos los días agradezco a la vida el haberte conocido, pues tu amor me ayuda a seguir adelante día tras día, gracias, **Mocita**.

RESUMEN

En México, el cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar entre las neoplasias ginecológicas con mayor prevalencia y mortalidad, por lo que se considera un problema de salud pública. Esta neoplasia posee múltiples factores de riesgo; sin embargo, se destaca entre todos ellos la infección persistente con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, principalmente el tipo 16 y 18. El VPH se ha encontrado en más del 99% de los casos de cáncer de cérvix a nivel mundial. Se sabe que la mayoría de los tumores sólidos, entre ellos el cáncer de cérvix, presentan en su microambiente células inmunológicas infiltradas (TILs por sus siglas en inglés) y que promueven la progresión neoplásica; sin embargo, poco se sabe acerca de cómo estas células ayudan al tumor en vez de eliminarlo. Investigaciones enfocadas en descubrir cómo funciona este mecanismo han llevado al descubrimiento de receptores funcionales para interleucina 2 (IL-2R) en la membrana de células de cáncer de cérvix, a pesar de que el epitelio cervical normal carece de este receptor. Por ello, se ha buscado desvelar la función de esta citocina sobre las células de tumores cervicales. Estudios muestran que la IL-2 tiene un efecto dosis-dependiente sobre líneas celulares de cáncer cérvix VPH⁺, ya que bajas dosis de IL-2 inducen su proliferación, mientras que con altas dosis de IL-2 se obtiene el efecto opuesto. No obstante, estos estudios se han enfocado principalmente en líneas celulares VPH18⁺, por lo que existe poca información sobre el efecto que la IL-2 tiene sobre células de cáncer de cérvix VPH16⁺.

Con este propósito, se utilizó la línea celular SiHa (cáncer de cérvix VPH16⁺) tratada con 10 UI/mL y 100 UI/mL de IL-2 para evaluar el efecto sobre la proliferación celular a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los resultados muestran un aumento significativo con el tratamiento de 10 UI/mL de IL-2, y una disminución significativa en la proliferación con 100 UI/mL de IL-2. Además, se analizó la fosforilación de STAT5 para determinar su migración al núcleo. Nuestros resultados mostraron aumento en la fosforilación de STAT5 citoplasmático con ambos tratamientos; las células tratadas con 10 UI/mL de IL-2 presentaron el máximo de fosforilación a los 5 minutos (73.2%) y con 100 UI/mL de IL-2 lo presentaron a los 15 minutos (56.55%). Por otro lado, se observó que la translocación de STAT5 fosforilado al núcleo solamente ocurrió a los 30 minutos tras el tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 (43.98%). Con los resultados obtenidos, concluimos que la línea celular SiHa tiene una respuesta dosis-dependiente de la IL-2, ya que 10 UI de IL-2 favorecen la proliferación celular, mientras que 100 UI tienen el efecto opuesto. Sin embargo, esta línea celular es más resistente a la disminución de su proliferación con 100 UI/mL de IL-2 en comparación con otras líneas celulares de cáncer de cérvix VPH18⁺. Por otro lado, la fosforilación de STAT5 es inducida con ambas dosis; sin embargo, sólo las dosis de 100 UI promueven su migración al núcleo para favorecer la regulación génica con 10 UI se favorece la permanencia de esta fosfoproteína en el citoplasma, tal vez para activar vías de señalización que promueven la proliferación celular.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El término “cáncer” es utilizado para englobar a un amplio grupo de más de 100 enfermedades capaces de afectar cualquier tipo de célula. La principal característica que comparten estas enfermedades es la proliferación celular descontrolada, invadiendo el tejido circundante y posteriormente diseminándose a otros órganos (Organización Mundial de la Salud, 2018; Secretaría de Salud, 2015; American Cancer Society, 2018). El crecimiento anormal de células es denominado tumor, el cual se puede categorizar como tumor benigno o maligno. Un tumor benigno carece de la capacidad de abandonar su zona de origen, lo que lo mantiene localizado. El tumor maligno (o neoplasia), por otro lado, es referido como cáncer y tiene la capacidad de invadir el tejido cercano al punto de origen e incluso de invadir otros órganos formando tumores secundarios, denominando este fenómeno “metástasis” (Cooper y Hausman, 2000).

El cáncer es considerado una enfermedad genética, ya que la mutación de genes específicos lleva al desarrollo de dicha enfermedad. Estos genes se dividen en dos categorías: oncogenes y genes supresores de tumores. En condiciones de una célula normal, estos genes se encuentran en un equilibrio, regulando así las señales de muerte celular (apoptosis), de proliferación e incluso de procesos metabólicos. Sin embargo, cuando cualquiera de estos dos grupos es alterado por mutagénesis, el equilibrio puede romperse, aumentando el riesgo de pérdida del control proliferativo (Alberts et al., 2005).

Existen diversos factores de riesgo que son capaces de aumentar el riesgo de desarrollar cáncer. Estos carcinógenos son clasificados en tres categorías: químicos, los cuales son moléculas que al estar en contacto con el organismo humano tienen la capacidad de generar mutaciones o alteraciones postraduccionales; físicos, como la radiación, que afectan directamente al ADN de la célula; y los biológicos, los cuales son agentes infecciosos capaces de alterar los procesos celulares y así

aumentar el riesgo a desarrollar cáncer, tales como los virus; como ejemplos tenemos al virus del papiloma humano (VPH) o el virus de Epstein-Barr. Estos agentes afectan a la célula a nivel genómico aumentando las mutaciones y confieren ciertas características necesarias para que pueda considerarse maligna (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Se han definido características biológicas fundamentales que transforman a una célula normal en una maligna, y se encuentran presentes en casi todos los tipos de cáncer humano (**Figura 1**), siendo éstas: 1) el mantenimiento de señal proliferativa; 2) la capacidad de poder invadir tejido y metástasis; 3) la inducción de angiogénesis; 4) la resistencia a la apoptosis; 5) la capacidad de replicación ilimitada; 6) la evasión de supresores del crecimiento; 7) el favorecimiento de la inflamación; 8) la evasión de la respuesta inmunológica; 9) la reprogramación del metabolismo energético; 10) el favorecimiento de la inestabilidad genómica, con presencia de mutaciones (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 1. Características biológicas fundamentales involucradas en la transformación de una célula normal a maligna. Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011.

El cáncer se ha posicionado como la segunda causa de muerte a nivel mundial. Sólo en el 2018 se registraron 9.8 millones de muertes, y se presentaron más de 17 millones de casos nuevos (Bray et al., 2018). En México el cáncer se encuentra entre las cuatro principales causas de muerte. En 2018 se registraron más de 83 mil muertes relacionadas a algún tipo de cáncer, con una incidencia de 190 667 mil

(Organización Mundial de la Salud, 2018). De esta manera, el cáncer se ha convertido en una de las principales problemáticas sanitarias a nivel mundial y por ello se encuentra como tópico primordial en la investigación. En 2018, las cinco neoplasias con mayor tasa de mortalidad en mujeres en el mundo fueron: cáncer de mama, cáncer de pulmón, colorrectal, cérvix y estómago, respectivamente (**Figura 2**) (Organización Mundial de la Salud, 2018). En los países del primer mundo se ha logrado disminuir la incidencia de ciertos tipos de cáncer, como el de cérvix; sin embargo, México permanece con una alta mortalidad y prevalencia respecto a este cáncer.

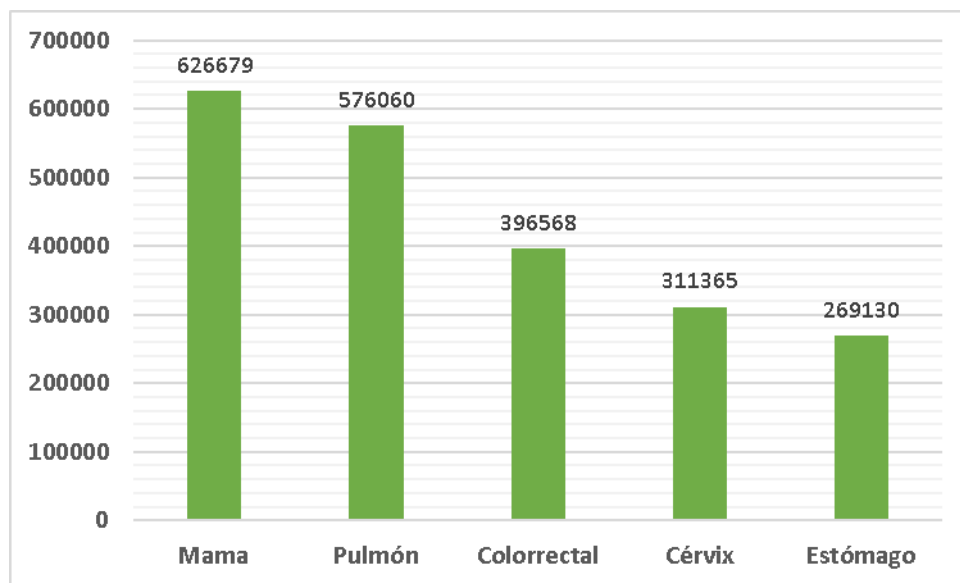


Figura 2. Muertes por cáncer en mujeres a nivel mundial en 2018. Basado en Organización Mundial de la Salud, 2018.

En México, el cáncer de cérvix es la segunda neoplasia ginecológica con mayor mortalidad. Tan solo en 2018 se diagnosticaron más de 7 800 casos de cáncer de cérvix. Ese mismo año, se reportaron alrededor de 4800 fallecimientos relacionados a esta neoplasia (**Figura 3**) (Organización Mundial de la Salud, 2018).

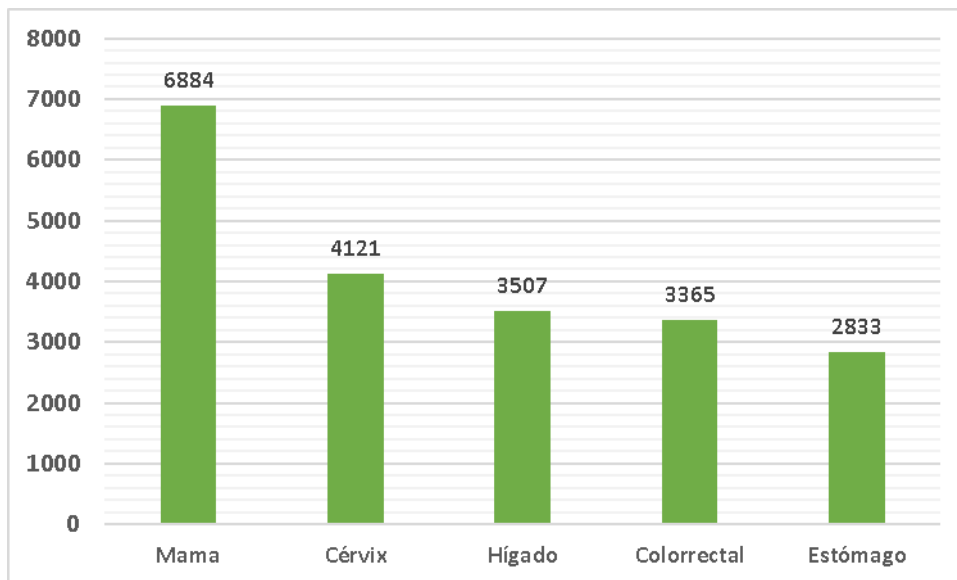


Figura 3. Muertes por cáncer en mujeres en México en 2018. Basado en Organización Mundial de la Salud, 2018.

Cáncer de cérvix

El cérvix, también conocido como cuello uterino, es una estructura que conecta el útero (órgano en forma de pera invertida donde se desarrolla el feto) con la vagina (canal de nacimiento). La parte que conecta con el cuerpo del útero es conocida como endocérvix, mientras que la parte conectada con la vagina es el ectocérvix (**Figura 4**) (American Cancer Society, 2018). El epitelio cervical presenta una organización estratificada, donde las células basales conservan su potencial mitótico. Éstas se dividen, generando dos células; una de ellas migrará a los siguientes estratos superiores, diferenciándose, mientras que la segunda se mantendrá en el estrato basal como célula de ciclado lento y de recambio (Martínez, 2013).

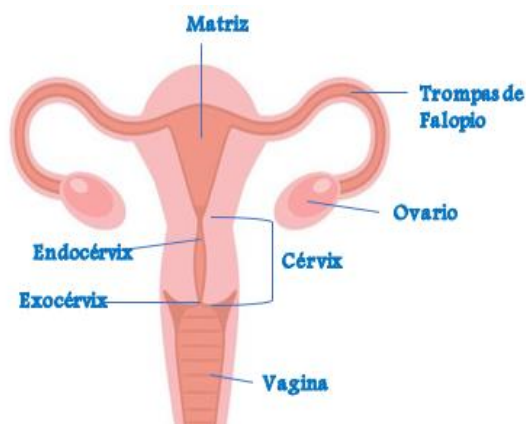


Figura 4. Aparato reproductor femenino. Los órganos que comprenden este sistema son: el útero, trompas de Falopio, ovarios, vagina y el cérvix. Este último se puede dividir en endocérvix y exocérvix. Modificada de <https://pt.123rf.com>.

El cáncer de cérvix es una transformación celular en el epitelio del cuello uterino. Se manifiesta inicialmente en forma de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que pueden derivar en displasia leve, moderada y severa, evolucionando a cáncer *in situ* o invasor, donde éste último puede propagarse a la membrana basal. Este cáncer puede presentarse de dos formas; el primero como carcinoma, que corresponde al 90% de los casos, mientras que el adenocarcinoma sólo se presenta en el 10% (López y Lizano, 2006).

A principios de los años 80, el Dr. Harald zur Hausen demostró la relación entre el cáncer de cérvix y el virus del papiloma humano (VPH) (López y Lizano, 2006), hoy en día se considera el 99.8% de los casos de CaCu son debido al VPH, por ello, este virus es considerado el mayor factor de riesgo para desarrollar neoplasias malignas en el cuello uterino, no obstante, por sí sólo no es capaz de generar esta neoplasia (Yepes, 2003). Se Requieren otros factores de riesgo, tales como la multiparidad, inicio de la vida sexual a temprana edad, haber tenido múltiples parejas sexuales, la edad, ser activamente fumador, el uso prolongado de píldoras anticonceptivas hormonales, la predisposición genética y la presencia de condilomas.

Virus del papiloma humano

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Esta familia posee miembros capaces de infectar a una amplia gama de organismos, ya que invade de manera específica el epitelio escamoso de más de 20 distintas especies de mamíferos, aves y reptiles (López y Lizano, 2006).

Se pueden clasificar según el tejido que invadan, que pueden ser cutáneo o mucoso. La OMS y la IARC (International Agency for Research on Cancer, 2018) clasifican a los distintos tipos de VPH según su capacidad oncogénica en alto y bajo riesgo (Yepes, 2003). Hoy en día se reconocen aproximadamente 40 tipos de VPH que son capaces de infectar epitelio del tracto anogenital. Los VPH de bajo riesgo, tales como el VPH 6 y 11, son capaces de generar verrugas genitales y muy rara vez generan lesiones malignas progresivas, mientras que los VPH de alto riesgo, como

VPH 16 y 18, son recurrentemente asociados a lesiones premalignas o malignas, estos VPH también se asocian a diversas neoplasias, como el de pene, vulva, colorrectal, cabeza y cuello, además de contribuir al 40% de los carcinomas orales (Fernandes y de Medeiros, 2012).

El VPH posee una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros y carece de envoltura. Su capsómero se encuentra formado por las proteínas L1 y L2. Su genoma del VPH (**Figura 5**) consiste en una molécula de ADN de doble cadena circular de aproximadamente 8000 pb, que contiene de manera regular, ocho marcos de lectura abiertos (ORF por sus siglas en inglés) (National Human Genome Research Institute, 2018). El genoma se encuentra dividido en tres regiones funcionales; la primera consiste en una región reguladora no codificante río arriba denominada Región Larga de Control (LCR) que tiene como función regular la expresión de los genes virales E6 y E7; la segunda es denominada región temprana (E), que consiste en seis ORFs: E1, E2, E4, E5, E6, y E7, genes que codifican para proteínas involucradas en la replicación viral y la transformación celular. La tercera región es la tardía (L), en la cual se encuentran los genes para las proteínas estructurales L1 y L2 (Fehrmann y Laimins, 2003).

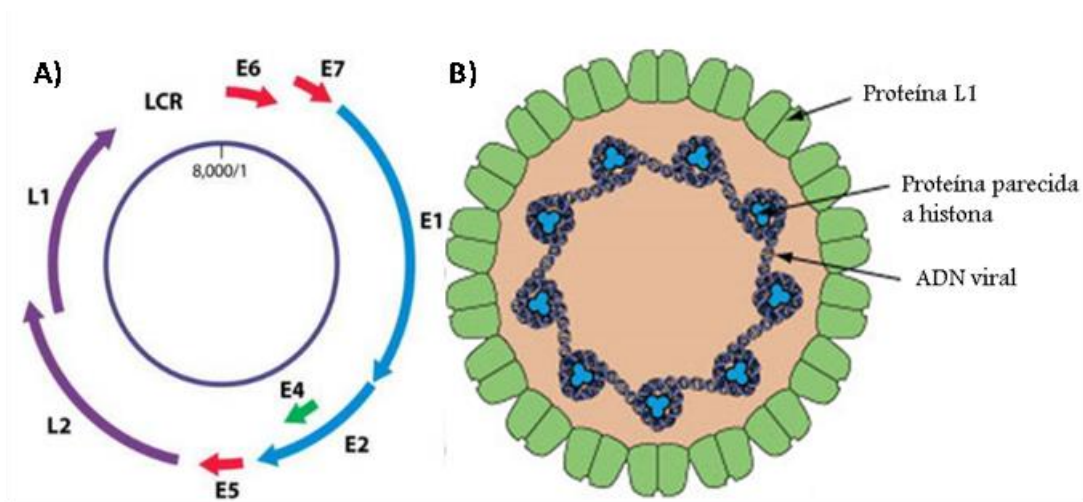


Figura 5. Estructura biológica del virus del papiloma humano (VPH). **A)** El ADN de VPH está compuesto por tres regiones: región larga de control (LCR por sus siglas en inglés); región temprana y la región tardía. **B)** Estructura viral donde se puede observar la cápside, el ADN viral y las proteínas parecidas a histonas del VPH. Modificada de Fernandes y de Medeiros, 2012.

Se conocen al menos 15 tipos de VPH de alto riesgo. A nivel mundial, los VPH 16 y 18 son los más comunes, que también son los más comunes en México (López, et al., 2012).

Interleucina 2

En los últimos años, se han encontrado múltiples tumores sólidos densamente infiltrados por células del sistema inmunológico (Dvprak, 1986); sin embargo, estas células no sólo ignoran al tumor, sino que las células tumorales son capaces de reclutar a células inflamatorias inmunológicas capaces de producir agentes inmunosupresores y a su vez citocinas proinflamatorias, como es la IL-2 (Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009; Mougiajajos et al., 2010). No obstante, aún no es claro cómo las células neoplásicas se ven beneficiadas ante la presencia de estas citocinas.

La IL-2 es una glicoproteína codificada por el gen localizado en el cromosoma 4q26-27, consta de 133 aminoácidos (aa), con un peso de 15.5 kDa con una marcada hidrofobicidad (Soto et al., 1999). Es producida principalmente por linfocitos T CD4⁺ luego de la presentación antigénica, que conlleva a un aumento de su expresión inducido por otras citocinas, tales como IL-1 e IL-6. La IL-2 tiene efectos inmunomoduladores importantes, como la activación de linfocitos T para inducir su proliferación y producción de citocinas. También contribuye en la proliferación y activación citotóxica de las células NK (López et al., 2009). Esta citocina es el principal factor de progresión en linfocitos T, y ejerce su función de manera autócrina y parácrina (Barrios, 2013).

Las células responsivas a la IL-2 expresan el receptor para esta citocina (IL-2R). El IL-2R es un complejo formado por 3 subunidades denominadas en función a su peso molecular; p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ_c). Al combinarse forman el receptor de alta (α, β, γ_c), media (β, γ_c) o baja (α) afinidad (Rebollo y Silva, 1994). De manera basal, Los linfocitos T CD4⁺ expresan el receptor de alta afinidad, mientras que las células T CD8⁺, NK y B expresan el de media afinidad (Geng et al., 2012). La IL-2 ejerce su función mediante la vía JAK/STAT, la cual está involucrada en diversos procesos celulares así como metabólicos, proliferación, pro- y anti- apoptóticos (de Oliveria et al., 2011).

En condiciones normales, casi ningún epitelio expresa IL-2R; sin embargo, hay reportes de múltiples tumores sólidos que expresan de manera funcional este receptor, como el cáncer de mama, colorrectal, próstata, cuello y cabeza, gástrico, pulmón, piel y cérvix (Rocha et al., 2004; Weidmann et al., 1992; Lin et al., 1995; Rimoldi et al., 1993; McMillan et al., 1995; Reichert et al., 2000; Ciacci et al., 1993). En células de cáncer de cérvix se ha identificado una dependencia a la IL-2 para estimular la proliferación, además de que a mayor severidad de la lesión, aumenta la expresión de IL-2R, por lo que se ha propuesto que en el cáncer de cérvix, las células malignas podrían estar compitiendo por la IL-2 con las células del sistema inmune, lo que genera la estimulación de la proliferación de las células neoplásicas y un deficiente funcionamiento de los mecanismos inmunológicos (Rangel et al., 2010). Esto explicaría por qué los tumores reclutan células inmunológicas capaces de producir IL-2.

Vía JAK/STAT

La familia de las Janus Cinasas (JAKs) comprende cuatro proteínas (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2). Poseen entre 1100 y 1200 aa, con un peso molecular entre 120 y 130 kDa, organizados en siete dominios de homología Janus (JH). El dominio JH1 corresponde a su sitio catalítico, mientras que el JH2 es un dominio pseudocinasa, los otros 5 dominios son vitales para interactuar con los receptores de varios sistemas. El dominio JH2 es lo que distingue a esta familia de otras cinasas de tirosina (Valle y Soto, 2005).

La familia de los Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STATs) se conforma de siete miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6). Las proteínas de esta familia poseen entre 750 y 800 aa, con un peso molecular entre 90 y 115 kDa; poseen dominios altamente conservados para poder llevar a cabo su dimerización. Consta del dominio N-terminal, involucrado en diversas interacciones proteína-proteína, en la translocación al núcleo y la desactivación de las STAT; el dominio de homología a Src 2 (SH2), el cual reconoce residuos de tirosina fosforiladas, uniéndose a otras STATs activadas u otras fosfoproteínas; el dominio de superenrollamiento (Coiled-coil) involucrado en la unión al receptor, la fosforilación de tirosina y la exportación nuclear; el dominio

de unión al ADN, el cual se une a una región específica del ADN; el dominio de transactivación (TAD), necesario para reclutar la maquinaria de transcripción génica. Estas proteínas requieren ser fosforiladas para poder dimerizarse, migrar al núcleo y ejercer su función.

La vía JAK/STAT es activada por una amplia gama de citocinas. Los receptores de estas citocinas carecen de actividad enzimática intrínseca, por lo que requieren de enzimas cinasas que puedan llevar a cabo la fosforilación de las proteínas que participan en la vía (Valle y Soto, 2005).

Después de que el ligando es reconocido por su receptor, este último se dimeriza o trimeriza y las proteínas JAK asociadas al receptor se transfosforilan para activarse. Después de su activación, las JAK son capaces de fosforilar residuos de tirosina presentes en el mismo receptor, lo que promueve el reconocimiento y unión de los dominios SH2 de las proteínas STAT. Tras la unión de las STAT, las JAK fosforilan residuos de tirosina presentes en las STAT, generando que estos factores de transcripción se dimericen, transloquen al núcleo y promuevan la expresión de genes como c-Myc, c-Jun, HIF2 α , Bcl-X_L, entre otros (Valle y Soto, 2005).

Vía JAK/STAT activada por IL-2 en células normales

Cuando el IL-2R reconoce a su ligando se induce una trimerización de sus subunidades (**Figura 6**). Asociados a este complejo se encuentran JAK1 y JAK3, las cuales se fosforilan entre sí para activarse. Estas JAKs fosforilan tirosinas de la subunidad β del IL-2R, lo que promueve la unión de STAT3 y/o STAT5. Estas moléculas son activadas por las JAKs, formando dímeros que migran al núcleo para ejercer su función.

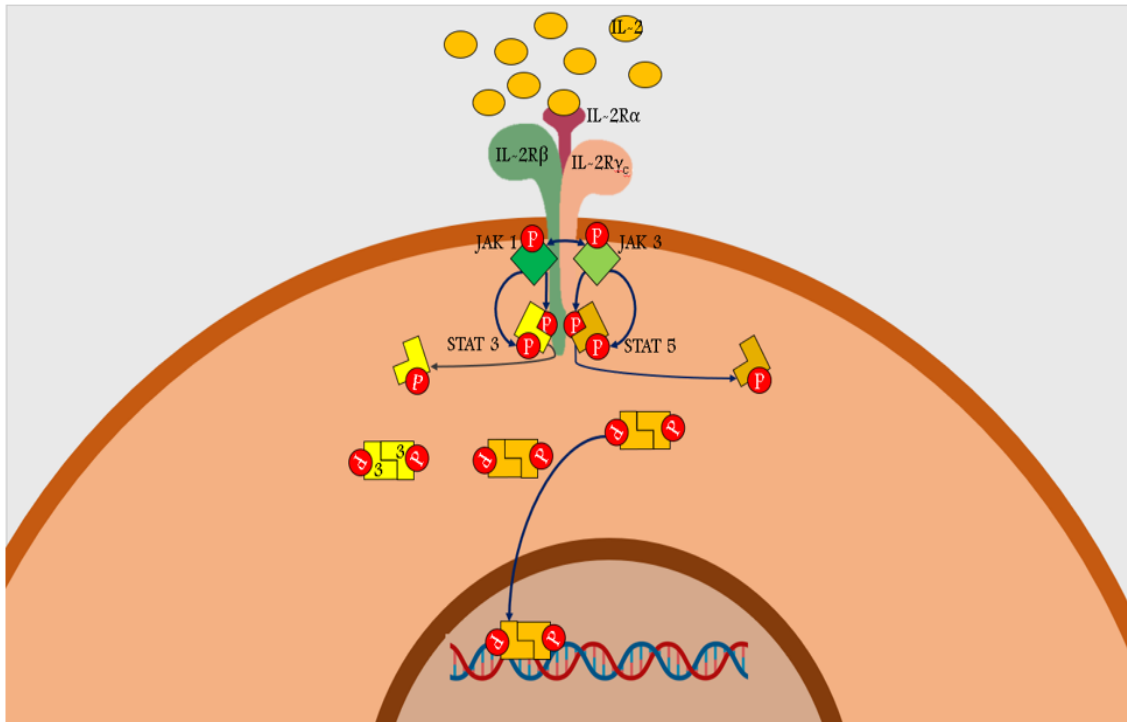


Figura 6. Vía de señalización mediada por IL-2. En presencia de IL-2, las subunidades p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ_c) se heterotrimerizan para formar al complejo IL-2R. Tras este cambio conformacional, las proteínas Janus cinasas (JAK) 1 y 3 se transfosforilan, activándose para poder fosforilar tirosinas de p70. Esto recluta a los factores de transducción de señales y activadores de la transcripción (STAT) 3 y 5, que son fosforiladas por las JAK para su posterior dimerización. Hecho esto, son capaces de translocar al núcleo y activar la maquinaria necesaria para la expresión de genes activados por citocinas. Basado en R&D Systems, 2019.

De manera normal, se requiere a JAK1 como pareja de JAK3 para la correcta señalización del sistema IL-2, ya que promueve señales de supervivencia. Sin embargo, los tumores sólidos que responden a IL-2 presentan modificaciones en estas proteínas (Valle et al., 2014).

Vía JAK/STAT activada por IL-2 en células tumorales

En carcinoma cervical se ha observado que, tras el estímulo con IL-2, JAK1 no se fosforila, mientras que JAK3 sí, e incluso se encuentra constitutivamente fosforilada. A diferencia de los linfocitos, en las células tumorales JAK3 se activa a sí misma y es capaz de continuar con la señalización. JAK3 activa el resto de la vía, principalmente a STAT5. En condiciones normales, STAT5 sólo se presenta en células linfoides y algunos tejidos como el mamario, mientras que en epitelio cervical sano no tiene presencia; no obstante, se ha encontrado STAT5 en diversos

tumores sólidos, incluso se encuentra constitutivamente fosforilado. Sin embargo, la respuesta a esta citocina es dosis-dependiente, ya que 10 UI/mL de IL-2 favorecen el crecimiento y la proliferación de líneas celulares de cáncer de cérvix VPH18⁺, promueven la fosforilación de JAK3 y STAT5 y la translocación al núcleo de STAT5. Así mismo, se ha demostrado que 100 UI/mL de IL-2 detienen el ciclo celular, no obstante esta cantidad de IL-2 resulta sumamente tóxica para ser implementada en tratamientos contra el cáncer (Valle et al., 2016; Rangel et al., 2010; Valle et al., 2014).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que líneas celulares de cáncer de cérvix VPH18⁺ (INBL y CALO) responden de manera diferencial ante el tratamiento con estas dos dosis de IL-2. Sin embargo, no se ha reportado si las células derivadas de tumores cervicales VPH16⁺ responden de la misma manera, a pesar de que este tipo de VPH predomina a nivel mundial y nacional como el principal factor de riesgo para desarrollar tumores cervicales malignos.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer cervicouterino es la segunda neoplasia ginecológica con mayor incidencia en México, y se asocia como principal factor de riesgo al virus del papiloma humano. Se han llevado a cabo trabajos enfocados en definir el efecto de bajas y altas dosis de IL-2 sobre líneas celulares VPH18⁺; sin embargo, se desconoce si los tumores cervicales VPH16⁺ responden de igual manera o presentan modificaciones en la respuesta a esta citocina. Esto es de suma importancia, ya que el VPH16 se ha identificado en el 80% y el 43% de todos los casos de cáncer de cérvix a nivel mundial y en México, respectivamente.

HIPÓTESIS

La línea celular SiHa (carcinoma cervical VPH16⁺) responderá a 10 UI/mL de IL-2 al aumentar su proliferación, al igual que la fosforilación de STAT5 y la translocación al núcleo; mientras que con 100 UI/mL de IL-2 tendrá el efecto opuesto, debido a que este comportamiento se ha registrado en líneas celulares similares como CALO e INBL.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de 10 y 100 UI/mL de IL-2 sobre la proliferación, el estado de fosforilación de STAT5 y su translocación al núcleo en la línea celular de cáncer de cérvix SiHa positiva a VPH16.

Particulares

-Analizar el efecto de 10 y 100 UI/mL de IL-2 sobre la proliferación de las células SiHa.

-Analizar el efecto de 10 y 100 UI/mL de IL-2 sobre la fosforilación de STAT5 en el citoplasma de células SiHa.

-Analizar el efecto de 10 y 100 UI/mL de IL-2 sobre la translocación de pSTAT5 al núcleo de las células SiHa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular SiHa fue obtenida del banco de criopreservación de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza. Se mantuvieron en cajas de cultivo de 75 cm² (Sarstedt, Alemania), con 8 mL de RPMI 1640 (Microlab, México) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado (Gibco, Estados Unidos). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Samsung, Corea del Sur) a 37°C, 5% de CO₂ y un ambiente saturado de humedad.

Ensayo de proliferación

Se sembraron 1500 células por pozo en placas para cultivo con fondo plano de 96 pozos (Sarstedt, Alemania) y se dejaron durante tres horas para su adherencia. Tras este lapso, se retiró el medio y se adicionó medio nuevo con IL-2. Las condiciones por placa fueron: células control sin tratamiento; células tratadas con 10 UI/mL de IL-2; y células tratadas con 100 UI/mL de IL-2. A las 48 horas las células fueron estimuladas nuevamente con medio fresco con su respectivo tratamiento. La proliferación fue medida a las 24, 48, 72 y 96 horas. Para determinar la proliferación celular, se utilizó la técnica de incorporación de cristal violeta (Kueng et al., 1986). Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio a las células y se fijaron con 100 µL de glutaraldehído 1.1% (Sigma, EUA) durante 20 minutos. Después de este tiempo, el fijador se retiró mediante chorro indirecto de agua corriente y se dejó secar al aire. Posterior a esto, se agregaron 100 µL de cristal violeta 0.1% (Sigma, EUA) y las muestras se incubaron 20 minutos con agitación suave. El cristal violeta fue retirado a chorro indirecto con agua corriente y se dejó secar al aire. Se adicionaron 100 µL de ácido acético al 10% en agitación suave durante 20 minutos; las muestras se leyeron a 590 nm en un lector de placas 3550 Microplate Reader (Bio-Rad, EUA).

Determinación de pSTAT5 citoplasmático

Se utilizaron 1×10^6 células por condición. Las células se sembraron en cajas Petri de 60x15 mm (Nunc, Dinamarca) con RPMI-1640 (5% SFB) durante 24 horas para su adherencia. Se retiró el medio y se agregó RPMI-1640 sin SFB durante 15 minutos para retirar moléculas externas capaces de alterar la fosforilación. Tras ese lapso, se retiró el medio y se adicionó medio (sin SFB) con tratamiento. Las condiciones empleadas fueron; células control sin tratamiento; tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos; tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos. Pasado el tiempo, todas las muestras se mantuvieron en condiciones frías para no perder la fosforilación. Las células se despegaron mediante verseno 1X (**Anexo 1**), colocadas en microtubos de 1.5 mL (Axygen, EUA) y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos en una centrifuga 5415 C (Eppendorf, Hamburgo). Se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con PBS 1X (**Anexo 1**), retirándolo posteriormente por centrifugación (3000rpm/5min). Las células se fijaron y permearon con el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD, EUA) por 15 minutos en la oscuridad y en agitación constante. Se retiró el reactivo Cytofix/Cytoperm y se realizaron dos lavados con disolución de lavado (BD, EUA) a 3000 rpm por 5 minutos. La mitad de la población de cada muestra fue separada en microtubos nuevos para obtener los controles de autofluorescencia (CAF). Las muestras destinadas a teñirse fueron tratadas con el anticuerpo murino anti-pSTAT5 (pTyr 694), conjugado con el fluorocromo PE-eFluor 610 (Thermo Fisher, EUA) con una dilución de 1:50 durante 90 minutos en la oscuridad. Se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con disolución de lavado BD a 3000 rpm por 5 minutos. Todas las muestras fueron resuspendidas con disolución de lavado BD y leídas en un citómetro de flujo FACSaria II (BD y EUA). Los datos se analizaron en el programa Flowing Software 2.

Determinación de pSTAT5 nuclear

Para determinar la translocación nuclear de pSTAT5 en la línea celular SiHa tras el estímulo con IL-2, se utilizaron 1×10^6 células por tratamiento. Las células fueron sembradas en cajas Petri de 60x15 mm con RPMI-1640 (5% SFB) durante

24 horas para su adherencia. Se retiró el medio y se agregó RPMI-1640 sin SFB durante 15 minutos para retirar moléculas externas capaces de alterar la fosforilación. Tras ese lapso, se retiró el medio y se adicionó medio sin SFB con el correspondiente estímulo. La translocación de pSTAT5 se determinó con las siguientes condiciones; células control sin tratamiento; tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos; tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos. Pasado el tiempo, todas las muestras fueron procesadas sobre hielo para no perder la fosforilación. Las células fueron despegadas con verseno 1X y depositadas en microtubos de 1.5 mL (Axigen, Estados Unidos). Fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos en una centrífuga 5415 C (Eppendorf, Alemania). Se retiró el sobrenadante y el botón fue lavado con PBS 1X, retirándolo posteriormente mediante centrifugación (3000 rpm/5'). Para la extracción de los núcleos, las células fueron tratadas con el reactivo "extranuc" (**Anexo 1**). Se agitó durante 10 segundos con un agitador Vortex Genie 2 (Daigger, EUA) y se incubaron durante 10 minutos, se retiró el reactivo y se lavaron con la disolución de lavado, la disolución se retiró con centrifugación (4500 rpm por 3 minutos). Fueron fijadas y permeadas con la disolución Cytofix/Cytoperm por 25 minutos en la oscuridad y en agitación suave constante. Se retiró el reactivo Cytofix/Cytoperm mediante centrifugación (3000 rpm por 3 minutos) y se realizaron dos lavados con disolución de lavado a 3000 rpm por 5 minutos. La mitad de la población de cada muestra fue separada en microtubos nuevos para obtener los controles de autofluorescencia (CAF). Las muestras destinadas a teñirse se incubaron con el anticuerpo murino anti-pSTAT5 (pTyr 694), conjugado con el fluorocromo PE-eFluor 610 (Thermo Fisher, EUA) con una dilución de 1:50 durante 90 minutos en la oscuridad. Se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con disolución de lavado a 3000 rpm por 5 minutos. Todas las muestras fueron resuspendidas con disolución de lavado y leídas en un citómetro de flujo FACS ARIA II. Los datos se analizaron en el programa Flowing Software 2.

Análisis estadístico

Para los resultados de proliferación con cristal violeta individuales, se realizó la prueba ANOVA de una vía con prueba Dunnet para determinar diferencias estadísticamente significativas. Para los resultados globales de proliferación, se usó la prueba ANOVA de dos vías con prueba Bonferroni. Los resultados de citometría de flujo para determinación de pSTAT5 citoplasmático y nuclear fueron analizados con la prueba ANOVA de dos vías con prueba Bonferroni cada una. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Prism 5 software. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

La línea celular SiHa responde a 10 UI/mL de IL-2 para favorecer su proliferación, mientras que 100 UI/mL de IL-2 tienen el efecto opuesto

Los resultados muestran que la dosis de 10 UI/mL de IL-2 estimula la proliferación, mientras que 100 UI/mL tienen un efecto antiproliferativo. Tras 24 horas, 10 UI/mL estimularon la proliferación al aumentarla un 29.5% respecto a su control, mientras que el tratamiento con 100 UI/mL inhibieron la proliferación al disminuirla un 12.8% respecto a su control. A las 48 horas, el tratamiento con 10 UI/mL indujo una estimulación del 32.66%, por el contrario, el tratamiento con 100 UI/mL indujo una inhibición del 29.7%. A las 72 horas, el tratamiento con 10 UI/mL indujo una estimulación del 28.6%, y el tratamiento de 100 UI/mL indujo una inhibición del 19.8%. A las 96 horas, el tratamiento con 10 UI/mL indujo un estímulo del 30%, y el tratamiento 100 UI/mL indujo una inhibición del 20.2% (Figura 7).

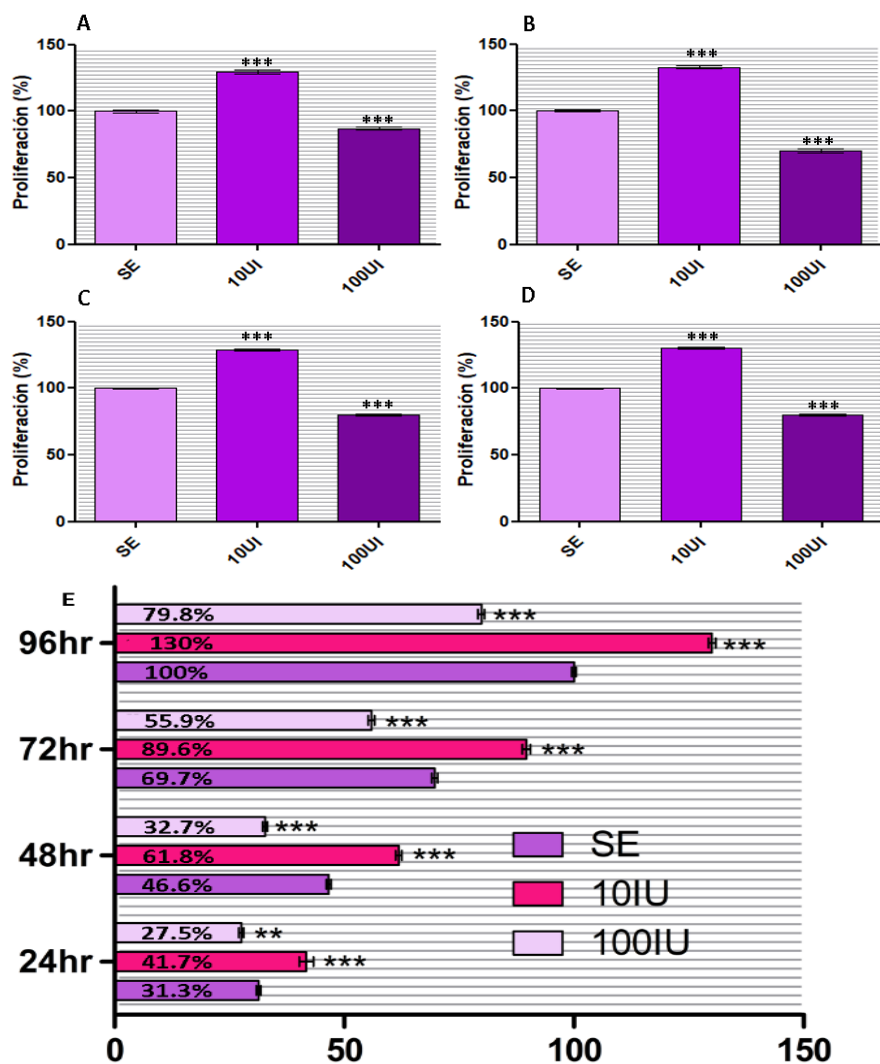


Figura 7. Efecto de 10 y 100 UI/mL de IL-2 sobre la proliferación de la línea celular SiHa. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de IL-2 por 24, 48, 72 y 96 horas para evaluar el efecto de la citocina sobre la línea de cáncer cervical. SE corresponde a las células sin estímulo que se utilizaron como control; 10 UI corresponde a las células estimuladas con 10 UI/mL de IL-2; 100 UI corresponde a las células estimuladas con 100 UI/mL de IL-2. **A)** Células cultivadas por 24 horas. **B)** Células cultivadas por 48 horas. **C)** Células cultivadas por 72 horas. **D)** Células cultivadas por 96 horas. **E)** Representación gráfica de los 4 tiempos juntos, tomando SE de 96 horas como el control. Donde ** P<0.01, ***P<0.001.

IL-2 aumenta la fosforilación citoplasmática de STAT5

Con la intención de establecer si la vía JAK/STAT se encontraba involucrada en la respuesta proliferativa inducida por la IL-2 en las células SiHa, determinamos la fosforilación de STAT5 en citoplasma y su migración al núcleo. Como se observa en la **Figura 8**, tras 5 minutos del estímulo se detectó un aumento en la fosforilación de STAT5 con ambas dosis, el estímulo con 10 UI/mL indujo un aumento de 73.2% en comparación con el control, mientras que en las células tratadas con 100 UI/mL el aumento fue de 29.54%. Después de 15 minutos de estimulación, las células tratadas con 10 UI/mL presentaron 38.8% de su población con pSTAT5, las células tratadas con 100 UI/mL presentaron 56.55% en comparación con el control. A los 30 minutos del estímulo disminuyó la fosforilación, 5% para las células tratadas con 10 UI/mL de IL-2 y 5.6% para las células tratadas con 100 UI/mL de IL-2.

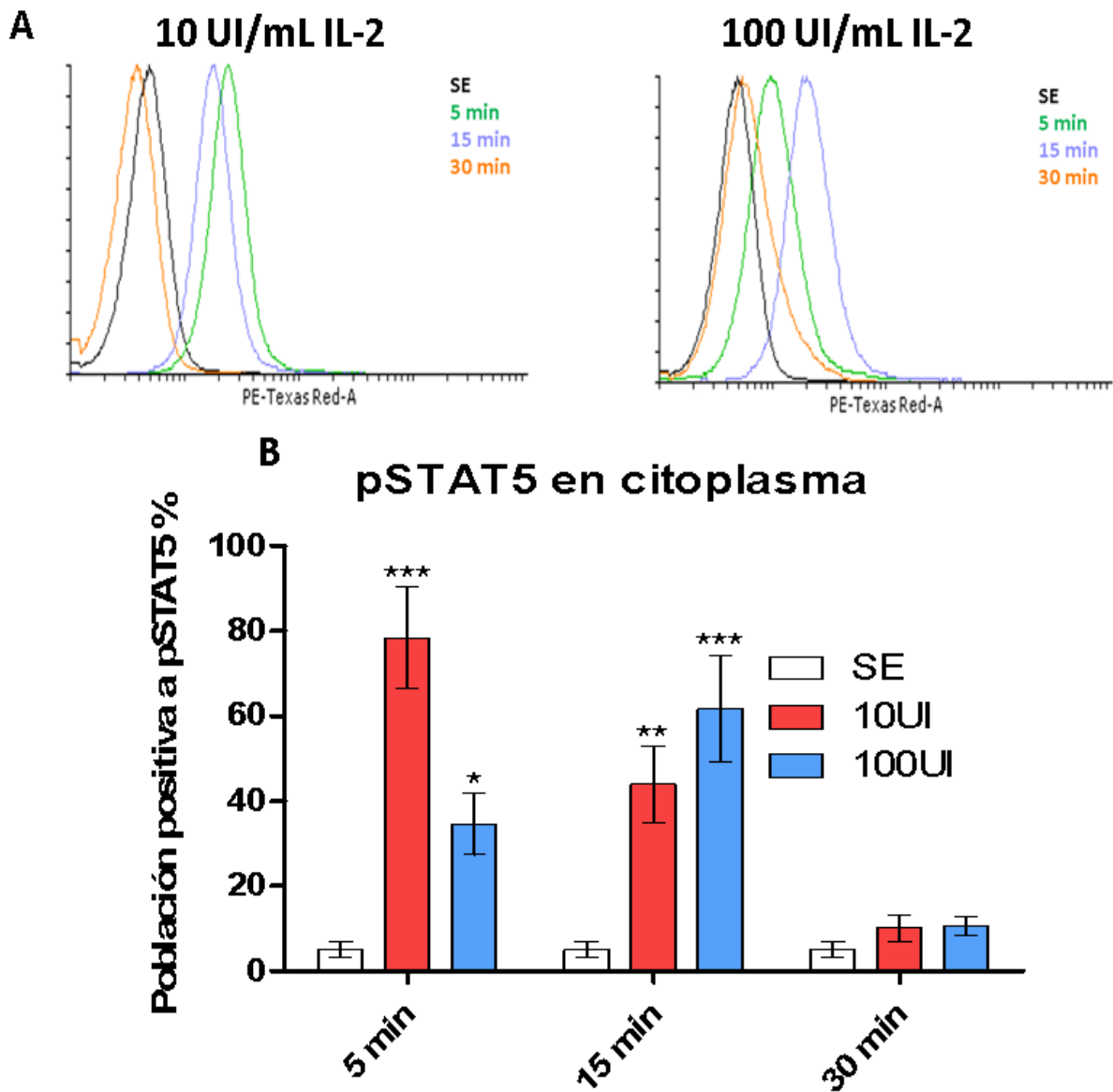


Figura 8. Efecto de la interleucina 2 sobre la fosforilación de STAT5 en la línea celular SiHa. Células SiHa fueron sembradas en cajas petri (1×10^6 células por caja) y estimuladas con IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos para evaluar el efecto de IL-2 sobre la fosforilación de STAT5. SE corresponde a las células sin estímulo que se utilizaron como control; 10 UI corresponde a las células estimuladas con 10 UI/mL de IL-2; 100 UI corresponde a las células estimuladas con 100 UI/mL de IL-2. **A)** Histogramas representativos de tres ensayos independientes. **B)** Representación gráfica de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías, seguida por una prueba posterior Bonferroni con un intervalo de confianza del 95%. Donde * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

IL-2 aumenta la translocación de pSTAT5 al núcleo

Para que la molécula STAT5 pueda ejercer sus efectos debe de translocar al núcleo, por lo que decidimos determinar si este factor de transcripción efectivamente migraba al núcleo. Las células fueron estimuladas con IL-2 durante diferentes periodos de tiempo. Tras 5 minutos, el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 indujo una migración de 4.1%, de 4.5% a los 15 minutos y de 11% a los 30

minutos. El tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 indujo la migración de 5.9% a los 5 minutos, de 9.4% a los 15 minutos y de 43.98% a los 30 minutos (Figura 9).

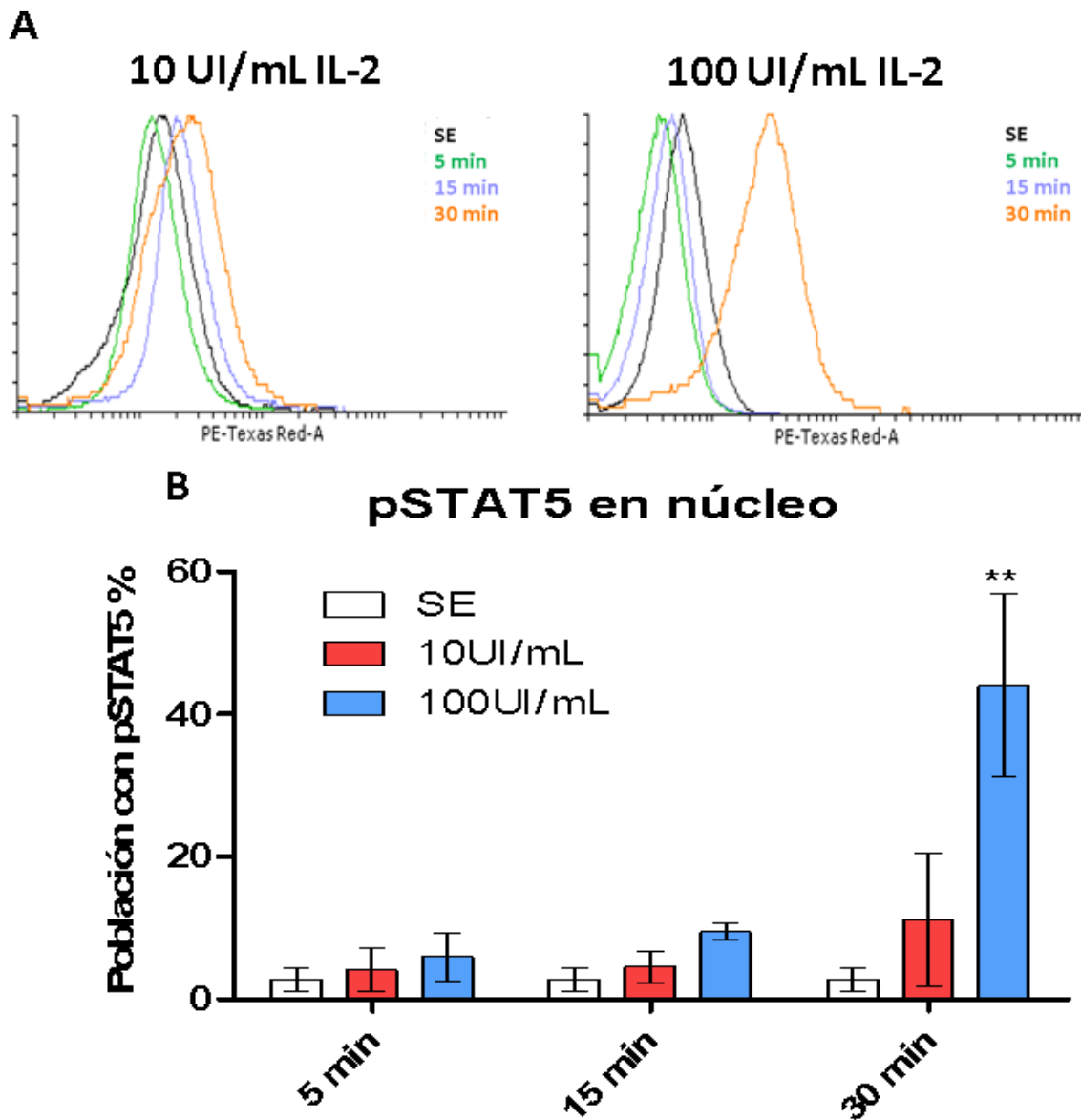


Figura 9. Efecto de la interleucina 2 sobre la translocación al núcleo de STAT5 activada en la línea celular SiHa. Células SiHa fueron sembradas en cajas petri de 60x15mm (1×10^6 células por caja petri) y estimuladas con IL-2 durante 5, 15 y 30 minutos para evaluar el efecto de IL-2 sobre la translocación nuclear de pSTAT5. SE corresponde a las células sin estímulo que se utilizaron como control; 10 UI corresponde a las células estimuladas con 10 UI/mL de IL-2; 100 UI corresponde a las células estimuladas con 100 UI/mL de IL-2. **A)** Histogramas representativos de tres ensayos independientes. **B)** Representación gráfica de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías, seguida por una prueba posterior Bonferroni con un intervalo de confianza del 95%. Donde ** $P < 0.01$.

DISCUSIÓN

Cuando el IL-2R reconoce a su ligando (IL-2), inicia la transducción de señales que desemboca en la fosforilación de STAT5 (pSTAT5), lo que favorece su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, pSTAT5 es capaz de unirse al ADN y regular la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, la inducción de señales de supervivencia y progresión del ciclo celular en células normales (Valle y Soto, 2005). El epitelio cervical normal no responde a IL-2, ya que no se ha encontrado la expresión de este receptor, sin embargo, el carcinoma cervical infectado por VPH es capaz de expresar proteínas como IL-2, IL-2R, JAK3 y STAT5, lo que puede promover la evasión del sistema inmune, evasión de apoptosis y estimulación de la angiogénesis (Rangel et al., 2010; Valle et al., 2014). Pacientes con carcinoma de cérvix infectadas con VPH 16, 18 o ambos, han mostrado aumento significativo en la expresión de la proteína STAT5, lo cual está directamente relacionado con la gravedad de la lesión (Sobti et al., 2010). Aunado a esto, se ha demostrado que STAT5 se encuentra constitutivamente activo en múltiples líneas celulares de cáncer y biopsias de cáncer cervicouterino VPH⁺. Cuando se inhibe la expresión de este factor de transcripción o su activación, las células cancerosas disminuyen su proliferación, además de ser más vulnerables a la apoptosis (Xiong et al., 2009).

La expresión del receptor de afinidad intermedia para IL-2 se ha identificado en líneas celulares de cáncer de cérvix VPH18⁺ (Rocha et al., 2004), así mismo, Rangel et al., (2010) demostraron que estas células son capaces de producir IL-2. Valle et al., (2014) demostraron que al estimular células VPH18⁺ con 10 y 100 UI/mL de IL-2 se induce una señalización diferencial, en la que 10 UI/mL promueven la fosforilación de JAK3 y STAT5 y la translocación de pSTAT5 al núcleo, lo que induce un aumento en la proliferación celular. Por otro lado, el tratamiento con 100 UI/mL redujo la fosforilación de JAK3 y STAT5, aunado a una reducción en la migración de pSTAT5 al núcleo, y en consecuencia una marcada disminución de la

proliferación en líneas celulares VPH⁺ (Valle et al., 2014; Lagunas et al., en revisión). Debido a que no se han realizado estos estudios en líneas celulares de cáncer de cérvix VPH16⁺, decidimos realizar este estudio en la línea celular SiHa. Al evaluar la proliferación de la línea celular SiHa en presencia 10 y 100 UI/mL de IL-2, se observó que el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 favorece la proliferación celular en un 30% en comparación con el control, mientras que con altas dosis la proliferación disminuye un 20% (**Figura 7**). Este comportamiento es similar a las células que son positivas para VPH18⁺, lo que sugiere que las líneas celulares VPH⁺, sin importar el tipo de virus, responden de manera similar al tratamiento con IL-2 respecto a su proliferación.

Aún se desconoce la activación río abajo de la cascada de señalización de IL-2 en células de cáncer de cérvix VPH 16⁺, por lo que decidimos analizar parte de esta vía. Los resultados muestran que STAT5 está fosforilado de manera constitutiva. Al analizar la fosforilación de STAT5 citoplasmático en células SiHa tratadas con 10 y 100 UI/mL, se observó un aumento significativo de pSTAT5 con ambas dosis. El mayor aumento de esta fosfoproteína en respuesta al tratamiento con 10 UI/mL fue a los 5 minutos (73.2%), y con 100 UI/mL a los 15 minutos (56.55%). A los 30 minutos la fosforilación regresó a los niveles basales con ambos tratamientos (**Figura 8**). Este comportamiento difiere respecto a las células VPH18⁺, debido a que se ha mostrado en estudios previos que éstas aumentan la cantidad de pSTAT5 al cabo de 30 minutos y únicamente con 10 UI/mL de IL-2, mientras que con 100 UI/mL disminuye la fosforilación basal. Esto sugiere que hay una respuesta diferencial en la vía JAK/STAT inducida por IL-2 dependiendo del tipo de VPH con el que el epitelio se encuentra infectado. Así mismo, los resultados obtenidos sobre la migración de pSTAT5 al núcleo en células SiHa muestran un comportamiento distinto a las células VPH18⁺, pues se observó que el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 no modifica la translocación de pSTAT5 en los tiempos evaluados. Por el contrario, el tratamiento con 100 UI/mL, durante 30 minutos, induce un aumento en la migración al núcleo de pSTAT5 (43.98%) (**Figura 9**).

Estos resultados sugieren que las células VPH16⁺ tratadas con 10 UI/mL de IL-2 aumentan la presencia citoplasmática de pSTAT5; sin embargo, dicho factor de transcripción no migra al núcleo, probablemente porque participa en el citoplasma

activando vías proliferativas. Esto concuerda con resultados en células de carcinoma colorrectal, en las cuales se encontró que pSTAT5 en citoplasma se encontraba asociado con ERK1/ERK2 y SAPK/JNK (Xiong et al, 2009). Así mismo, en leucemia mieloide, pSTAT5 se encontró asociado con PI3K (Harir et al, 2009). Por tanto, se puede especular que en las células de cáncer de cérvix VPH16⁺ tratadas con 10 UI/mL de IL-2, la proteína STAT5 se fosforila, pero no migra al núcleo debido a que podría interaccionar con vías tales como MAPK (vía de las cinasas activadas por mitógenos), c-Jun y/o PI3K, para inducir la proliferación sin ejercer función directamente en el núcleo.

Por otro lado, la estimulación con 100 UI/mL de IL-2 también promueve la activación de STAT5, sin embargo, este factor de transcripción migra al núcleo donde, probablemente, actúa directamente sobre la expresión de genes como Bcl-X_L, c-Myc y HIF2 α , confiriéndole a la célula protección contra la apoptosis lo que induce un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Se ha demostrado que 100 UI/mL de IL-2 disminuyen notablemente la proliferación de líneas celulares VPH⁺, pero no afecta su resistencia anti-apoptótica contra tratamientos como cisplatino (Lagunas Cruz et al., en revisión).

CONCLUSIONES

- La línea de cáncer de cérvix SiHa VPH16⁺ modifica su proliferación cuando es estimulada con IL-2, aumenta con 10 UI/mL; por el contrario, disminuye con 100 UI/mL.
- Bajas dosis de IL-2 promueven la fosforilación de STAT5 y su permanencia en citoplasma para la activación de vías de señalización que promueven la proliferación celular.
- Altas dosis de IL-2 promueven la fosforilación de STAT5 y su translocación al núcleo para regular la expresión de genes.

PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto que 10 y 100 UI/mL de IL-2 tienen sobre la proliferación celular, fosforilación y translocación al núcleo de STAT5 en células SiHa silenciadas para STAT5.
- Determinar si con 10 UI/mL de IL-2, pSTAT5 interactúa con la vía de señalización MAPK o la vía PI3K en citoplasma mediante co-inmunoprecipitación en células VPH⁺ y VPH⁻.
- Determinar el efecto de 100 UI/mL de IL-2 sobre fosfoSTAT5 para regular la expresión génica de Bcl-X_L, c-Myc y HIF2 α en células VPH⁺ y VPH⁻.

REFERENCIAS

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2005). *Molecular Biology of the Cell*. 5ta edición, Garland Science: EUA.

American Cancer Society. (2018). *Cancer Basics*. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>.

Barrios Maya, M. A. (2013). *Expresión del complejo COX3 en células de las líneas de cáncer cérvico uterino CaLo e INBL, cultivadas en presencia de IL-1β*. Tesis que para obtener el título de Biólogo: FES Zaragoza, UNAM.

Ciacchi, C., Mahida, Y. R., Dignass, A., Koizumi, M. & Podolski, D. K. (1993). Functional interleukin-2 receptor on intestinal epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 92(1): 527-532.

Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2000). *The cell: a molecular approach*. 2da edición, ASM Press: EUA.

De Oliveria, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R. & Salomão, R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2): 137-142.

Fehrmann, F. & Laimins, A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogenes*, 22(33): 5201-5207.

Fernandes, J.V. & de Medeiros Fernandes, T. A. A. (2012). Human Papillomavirus: biology and pathogenesis. En: Vandell Broeck, D. (2012). *Human Papillomavirus and related diseases; from bench to bedside- A clinical perspective*. IntechOpen: <https://www.intechopen.com/> citado el 20 de octubre de 2018.

Geng, X., Zhang, R., Yang, G., Jiang, W. & Xu, C. (2012). Interleukin-2 and autoimmune disease occurrence and therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16(11): 1462-1467.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

Harir, N., Pecquet, C., Kerenyi, M., Sonneck, K., Kovacic, B., Nyga, R., Brevet, M., Dhennin, I., Gouilleux-Gruart, V., Beug, H., Valent, P., Lassoued, K., Moriggl, R. & Gouilleux, F. (2007). Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic

- localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood*, 109(4), 1678-1686.
- Kueng, W., Silber, E. & Eppenberger, U. (1989). "Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*, 182 (1): 16-19
- Lin, W. C., Yasumura, S., Suminami, Y., Sung, M. W., Nagashima, S., Stanson, J. & Whiteside, T. L. (1995). Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. *The journal of immunology*, 155 (10): 4805-4816.
- López Rivera, H. G., Medel Flores, M. O., Villada Magdaleno, J. D'A. & Sánchez Monroy, V. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. *Infectious Diseases in Obstetric Gynecology*, 2012.
- López Saavedra, A. & Lizano Soberón, M. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Cancerología*, 1, 31-55.
- López, M. T. R., Javier, P. P., & Guarín, C. J. M. (Eds.). (2009). *Inmunología una ciencia activa*. 2da edición, Editorial Universidad de Antioquia: Colombia.
- Martínez Mata, S. I. (2013). Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosfenina-3-glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, Caski y ViBo. Tesis para obtener el título de Biólogo: FES Zaragoza, UNAM.
- McMillan, D. N., Kernohan, N. M., Flett, M. E., Heys, S. D., Deehan, D. J., Sewell, H. F., Walker, F. & Eremin, O. (1995). Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localization in human solid tumour cells in situ and in vitro: Evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 60(6): 766-772.
- National Human Genome Research Institute. (2018). Recuperado de <https://www.genome.gov/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Cáncer: Prevención del cáncer. Recuperado de <https://www.who.int/cancer/prevention/es/>.
- Rangel Corona, r., Corona Ortega, T., Soto Cruz, I., López Labra, A., Pablo Arcos, T., Torres Guarneros, D. F. & Weiss Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, 50(3): 273-277.
- Rebollo, A. & Silva, A. (1994). Estructura y función del receptor de IL-2. *Inmunología*, 13(2): 39-47.

Reichert, T. E., Nagashima, S., Kashii, Y., Stanson, J., Gao, G., Dow, Q. P. & Whiteside, T. L. (2000). Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene*, 19 (4), 514-525.

Rimoldi, D., Salvi, S., Hartmann, F., Schereyes, M., Blum, S., Zografos, L., Plaisance, S., Azzarone, B. & Carrel, S. (1993). Expression of IL-2 receptor in human melanoma cells. *Anticancer Research*, 13 (3), 555-564.

Rocha Zavaleta, L., Huitrón, C., Cáceres Cortés, J. R., Alvarado Moreno, J. A., Valle Mendiola, A., Soto Cruz, I., Weiss Steider, B. & Rangel Corona, R. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta-gamma signaling 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. *Cell Signal*, 16 (11), 1239-1247.

R&D Systems. (2019). IL-2 Signaling Pathways. Recuperado de <https://www.rndsystems.com/pathways/il2-signaling-pathways>.

Secretaría de Salud. (2015). Estadística de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.

Sobti, R. C., Singh, N., Hussain, S., Suri, V., Bharadwaj, M., & Das, B. C. (2010). Deregulation of STAT-5 isoforms in the development of HPV-mediated cervical carcinogenesis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 30(3): 178-188.

Soto Cruz, I., Cáceres Cortés, J. R., Mendoza Rincón, J. F. & Weiss Steider, B. (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. 1ra edición, Plaza y Valdés: México.

Valle Mendiola, A. & Soto Cruz, I. (2005). Vía JAK-STAT: una visión general. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 8(1-2): 14-25.

Valle Mendiola, A., Gutiérrez Hoya, A., Lagunas Cruz, M. D. C., Weiss Steider, B. & Soto Cruz, I. (2016). Pleiotropic effect of IL-2 on cancer: its role in cervical cancer. *Mediators of Inflammation*, 2016: 1-11.

Valle Mendiola, A., Weiss Steider, B., Rocha Zavaleta, L. & Soto Cruz, I. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer investigation*, 32(4): 115-125.

Weidmann, E., Sacchi, M., Plaisance, S., Heo, D. S., Yasumura, S., Lin, W., Jhonson, J. T., Heberman, R. B., Azzarone, B. & Whiteside, T. L. (1992). Receptors for

interleukin 2 on human squamous cell carcinoma cell lines and tumor in situ. *Cancer Research*, 52(21): 5963-5970.

Xiong, H., Su, W. Y., Liang, Q. C., Zhang, Z. G., Chen, H. M., Du, W., Chen, Y. X. & Fang, J. Y. (2009). Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells. *Laboratory Investigation*, 89(6): 717.

Yepes, H. C. (2003). Papilomavirus y cáncer de cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(2), 107-112.

ANEXO 1: REACTIVOS

Cristal Violeta 0.1%

En un tubo de 50mL limpio agregar 2.15mL de cristal violeta 2.3% (Sigma-Aldrich, EUA), posteriormente aforar a 50mL con agua destilada, agitar suavemente para homogeneizar la mezcla para su uso. Almacenar a temperatura ambiente.

Ácido Acético 10%

En un tubo de 50mL limpio agregar 5mL de ácido acético glacial (J.T. Baker, México), posteriormente aforar a 50mL con agua destilada, agitar suavemente para homogeneizar la mezcla para su uso. Almacenar bien cerrado a temperatura ambiente

Glutaraldehído 1.1%

En un tubo de 50mL limpio agregar 2.2mL de Glutaraldehído al 25% (Sigma-Aldrich EUA), posteriormente aforar a 50mL con agua destilada, agitar suavemente para homogeneizar la mezcla para su uso. Almacenar a 4°C protegido de la luz.

Verseno 1X

EDTA	0.2g
Tris	3.04g
NaCl	8g
KCl	0.4g

Agregar 500mL de agua destilada a un recipiente limpio. Pesados ya los reactivos, agregar uno a uno al recipiente con agua destilada y disolver con la ayuda de un agitador magnético y una placa magnética a temperatura ambiente. Cuando el último reactivo se encuentre homogeneizado en la disolución, llevar el volumen a 900 mL con agua destilada, agitar brevemente y ajustar el pH a 7.7 con HCl y/o NaOH y un potenciómetro. Ya ajustado

el pH, aforar a 1000 mL. Repartir en varios recipientes de cristal y esterilizar mediante el uso de autoclave para su posterior uso y almacenamiento.

PBS 1X

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₃	2.88g
KH ₂ PO ₃	0.4g

Agregar 500mL de agua destilada a un recipiente limpio. Pesados ya los reactivos, agregar uno a uno al recipiente con agua destilada y disolver con la ayuda de un agitador magnético y una placa magnética a temperatura ambiente. Cuando el último reactivo se encuentre homogeneizado en la disolución, llevar el volumen a 900 mL con agua destilada, agitar brevemente y ajustar el pH a 7.3 con HCl y/o NaOH y un potenciómetro. Ya ajustado el pH, aforar a 1000 mL, repartir en varios recipientes de cristal y esterilizar mediante el uso de autoclave para su posterior uso y almacenamiento.

Reactivo Extranuc

MgCl ₂	0.2 mg
Tris 1M pH 7.5	10mL
Tritón X-100	0.25mL

Agregar 10mL de agua destilada en un tubo de 50mL. Adicionar los reactivos, uno por uno hasta que la mezcla se homogenice. Aforar a 50mL con agua destilada, agitar suavemente para su uso y almacenar a 4°C aislado de la luz.

ANEXO 2



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.
FUNDADA EN 1957

AVE. CIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.
APARTADO POSTAL 70-406, CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX. (55)5622-5742
<http://www.smb.org.mx>
Correo Electrónico: smbq@fc.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2017 - 2019

PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

VICEPRESIDENTE
DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA

SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SUBSECRETARIA TESORERA
DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
Dr. Joaquín Cravioto (†)
Dr. Carlos del Río Estrada (†)
Dr. Silvestre Frenk Freund
Dr. Mario García Hernández (†)
Dr. Jesús Guzmán García (†)
Dr. Jesús Kumate Rodríguez
Dr. José Laguna García (†)
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta
Dr. Efraín G. Pardo Codina
Dr. Guillermo Soberón Acavedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Diego Francisco Morelos Laguna

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Effect of IL-2 on the activation and nuclear translocation
of STAT5 in cervical cancer cell line SiHa**

Por: Diego Francisco Morelos Laguna, Arturo Valle Mendiola,
Benny Weiss Steider, Octavio Zerecero Carreón,
Itzel Salazar Valencia and Isabel Soto Cruz

En la modalidad de cartel durante el
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Irene B. Castaño Navarro
Presidenta