



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL
ZARAGOZA**

T E S I S

**Caracterización molecular del receptor para Interleucina-2 (IL-2) en
células de carcinoma de cérvix**

Que para obtener el Título de

B I Ó L O G O

Presenta

Hernández Silva Marco Antonio

Directora: C. Dra. Rosalva Rangel Corona



Ciudad de México, 2019

PAPIIT IN222118



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.

"Vivimos en una plácida isla de ignorancia en medio de mares negros e infinitos, pero no fue concebido que debiéramos llegar muy lejos".

- H. P. Lovecraft (1890-1937)

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado en primera instancia a mi madre, Agustina, cuyo apoyo es indispensable en cada etapa de mi vida; este es tu logro, má. También para Marianita; sin ella quién sabe en dónde estaría en este momento; gracias de todo corazón en donde quiera que esté. Una mención aparte merecen mis abuelos Isabel Serrano y Gabino Silva, sobre todo este último, quien creía legítimamente en mí y a quien le hubiera gustado verme llegar hasta aquí; gracias abuelito, lo logré.

AGRDECIMIENTOS

Hace tiempo, un buen amigo y compañero quien actualmente está estudiando el posgrado, me dijo en tono de broma que la parte más difícil de escribir una tesis eran los agradecimientos. No se equivocó. Han sido tres años de arduo trabajo que se han sentido en mis estados físico y anímico. Durante ese tiempo he conocido a muchas personas que han dejado cierta marca en mi persona y que me han acompañado a lo largo de este ajetreado viaje.

Primeramente, quisiera dar gracias a la doctora Rosalva Rangel, quien me acogió bajo su tutela por la paciencia y los conocimientos transmitidos, doctora. De igual forma, agradezco a mis maestros y amigos, Leonardo Trujillo, Edgar Torres y Adrián Vargas, quienes me apoyaron en el entendimiento teórico y práctico de este trabajo. A los técnicos José Chavarría y Juan Navarrete, por la excelente labor de esterilización y provisión de materiales. Gracias también a la profesora Yolanda Cortés Altamirano por la orientación y el apoyo con los trámites administrativos; y agradecimientos especiales a Madi, por las recomendaciones en estudios de fotografía y lugares para la impresión de este trabajo. También a mis compañeros, Itzel, Ángel, Sergio, Santa, Carmen, Ana, Gaby y Bere, por las tardes de pizza, películas y UNO. A Víctor, Virginia, Josué, David, Zeit, Diana y Paola, mis primeros “alumnos”. Mención aparte merecen mis amigos y compañeros de la generación 2012, con quienes pasé las mejores experiencias y los mejores años de mi vida; Yair, Irving, Thor, Monsse, Fer, Uri, Janeth y Alexa, “los desagradables”. A Armando, el único amigo que he tenido en estos últimos meses; gracias por la dosis de realidad, pequeña basura. A mi Lily bonita, por estar cuando nadie más estuvo; te adoro.

En fin, de continuar, creo que nunca acabaría, ya que cada vez que reflexiono, vienen a mi mente nombres y más nombres. Pero es imperativo mencionar unos cuantos más. Una vez más, agradezco a mi madre, quien me alentó, me consejo, reprendió y me enseñó a ser un hombre e inculcó en mí el amor por la naturaleza, cualidad que todo biólogo debe poseer. A Miguel, por fungir como figura paterna y enseñarme que la vida es mejor riendo. A Marianita, sin quien nada de esto sería posible; gracias infinitas y eterno respeto; no sé qué habría sido de mi mamá ni de mí sin ella. Una vez más, a mis abuelos, Gabino e Isabel, a quienes quisiera volver a abrazar y decirles que lo logré.

No sé qué venga después ni qué me depare el destino (o la suerte); nunca me ha gustado pensar en ello. Pase lo que pase, estoy seguro que podré contar con todos los aquí mencionados y saben que ustedes pueden esperar lo mismo de mí. Bueno. Eso es todo. Por fin terminé. Gracias a todos.

Contenido

DEDICATORIA.....	3
AGRDECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
MARCO TEÓRICO.....	8
1. Cáncer.....	8
2. Mutaciones.....	9
2.1 Mutaciones hereditarias.....	9
3. Mutaciones en el cáncer.....	10
3.1 Mutaciones puntuales.....	10
4. Carcinoma de Cérvix.....	13
5. Mutaciones en el Carcinoma de Cérvix.....	17
6. Sistema inmune.....	18
7. Interleucina-2 (IL-2).....	20
8. Receptor de Interleucina-2 (IL-2R).....	20
9. Organización del gen de IL-2R β	22
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
METODOLOGÍA.....	26
Material biológico.....	26
Extracción de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP).....	26
Extracción de RNA.....	27
Cuantificación de RNA.....	28
Purificación de RNA.....	28
Retrotranscripción/PCR (RT/PCR).....	29
Purificación de productos de PCR.....	31
Secuenciación.....	31

RESULTADOS	32
Gel de integridad de RNA total	32
Amplificación por PCR de IL-2Rβ en células de Carcinoma de Cérvix	32
Reamplificación del producto de PCR correspondiente al IL-2Rβ en INBL	33
Purificación de productos de PCR	34
Secuenciación de productos de PCR purificados con el primer IL-2Rβ left	34
Análisis de la secuencia obtenida por secuenciación tipo Sanger del primer IL-2Rβ left	37
Secuenciación de productos de PCR purificados con el primer IL-2Rβ right	38
Análisis de la secuencia obtenida por secuenciación tipo Sanger del primer IL-2Rβ right	40
Análisis del transcrito resultante de los productos de secuenciación en BLAST	41
Repetición de secuencias purificadas obtenidas con PCR	44
Análisis de las repeticiones de secuenciación con BLAST	55
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	59
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	64

ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer Cérvico Uterino o Carcinoma de Cérvix
CD4+	Linfocitos T colaboradores
CD8+	Linfocitos T citotóxicos
CPA	Células presentadoras de antígeno
EPO	Eritropoyetina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
G	Gravedades
GAS	Sitios activados gamma
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HPV	Virus del Papiloma Humano

IL2.....Interleucina-2
IL-2R.....Receptor para Interleucina-2
IL-2R βCadena beta del Receptor para Interleucina-2
Kb.....Kilobase
LSP.....Linfocitos de Sangre Periférica
MHC.....Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mRNA.....RNA mensajero
NF-KB.....Factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK.....Células Natural Killer o Asesinas Naturales
RNA.....Ácido Ribonucléico
RPM.....Revoluciones por minuto
RT/PCR.....Retrotranscripción/PCR
TH.....Células T colaboradoras
UI.....Unidades Internacionales
UV.....Ultravioleta
VIH.....Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

El Carcinoma de Cérvix o Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es una neoplasia con alta incidencia en la población femenina, con el mayor índice de mortalidad en países en vías de desarrollo a nivel mundial. Es por ello, que la comprensión de su biología y las características de las células de este tipo de neoplasias cobra importancia para el desarrollo de alternativas terapéuticas para este tipo de neoplasia.

Se sabe que las células cancerosas son capaces de presentar características anormales como resistencia a la apoptosis, un aumento descontrolado en la proliferación y expresión de diversas moléculas atípicas del linaje celular del cual se originaron. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de receptores de células linfoides en líneas celulares tumorales epiteliales. El grupo de investigación del Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, ha demostrado la presencia del Receptor para IL-2 (IL-2R) en células de carcinoma de cérvix. Éste receptor se presenta de manera normal en linfocitos T y B activados y es de suma importancia para su proliferación; está constituido por tres subunidades, α , β , γ que dependiendo de su combinación muestran diferente afinidad por Interleucina 2 (IL-2).

La subunidad β (IL-2R β) es la responsable de desencadenar una cascada de señalización que promueve la proliferación de las células que expresan el receptor cuando éste se une a su ligando, IL-2. Por lo tanto, la caracterización de esta subunidad, expresada en células de carcinoma de cérvix, es de suma importancia para comprender el papel del receptor para IL-2 en células de CaCu. La presencia del IL-2R en estas células tumorales puede ser el resultado de una mutación en su genoma, lo cual puede llegar a desencadenar una cascada de señalización completamente distinta a la descrita en linfocitos.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización de la cadena beta del RIL-2 presente en células de CaCu, utilizando la técnica RT/PCR y posteriormente una secuenciación tipo Sanger. El análisis de los datos obtenidos indican que la secuencia de pares de bases presenta cambios, mientras que la secuencia de aminoácidos no se modifica en la IL-2R β de células de Carcinoma de Cérvix, estos resultados nos hacen suponer que al no existir cambio en la secuencia de aminoácidos de la cadena beta, no habrá cambio en la cascada de señalización.

MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

Las células normales cumplen funciones específicas, dividiéndose y proliferando de manera ordenada. Éstas mueren cuando son muy viejas o se dañan y nuevas células ocupan su lugar. Sin embargo, en el cáncer, las células de una parte del cuerpo comienzan a crecer y proliferan de manera descontrolada sobrepasando en cantidad a las células normales, causando problemas en el área en la que se originó (ACS, 2016). Sin embargo, existen muchas características adicionales, típicas de estas células, que han sido agrupadas en lo que se llama marcas del cáncer, entre las que destacan la capacidad que adquieren las células cancerosas para activar cascadas de señalización atípicas por mutaciones somáticas, resistencia a la muerte celular y evasión de la respuesta inmune (Hanahan & Weinberg, 2011), lo que sugiere la expresión de diferentes receptores y moléculas que no suelen expresar.

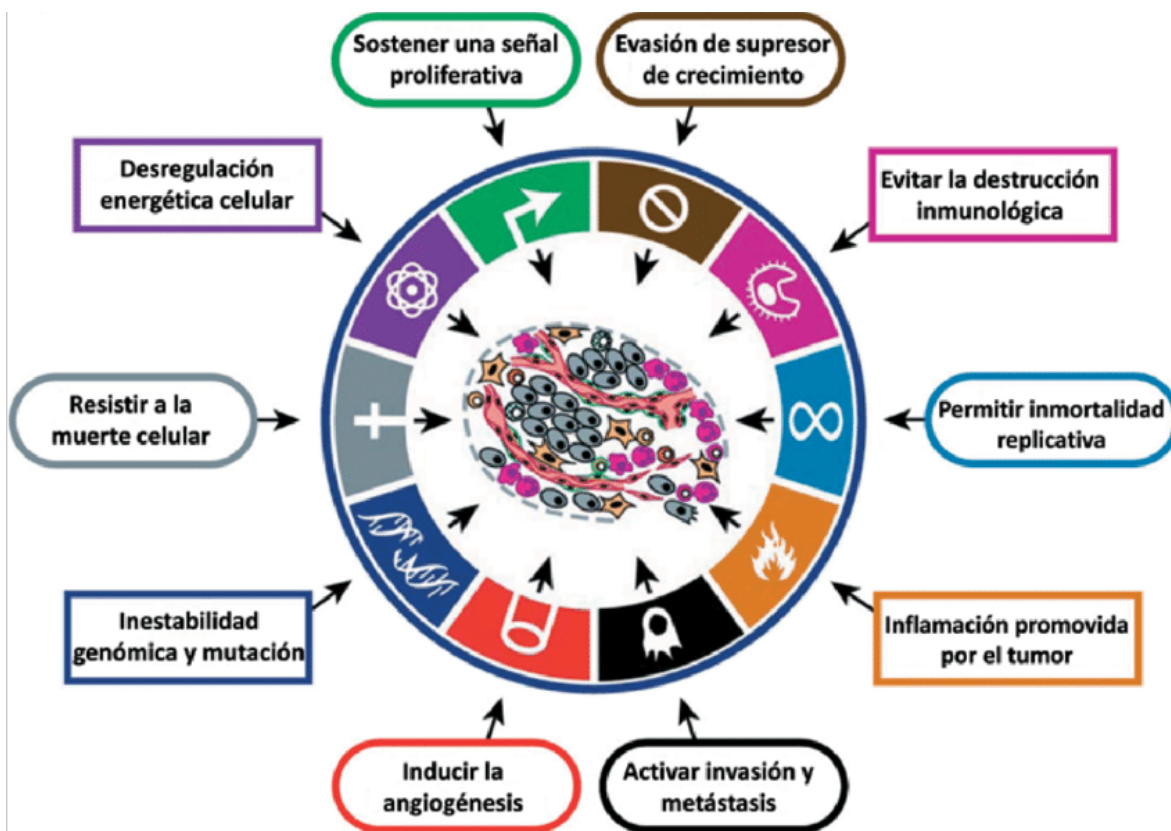


Figura 1: Las huellas del cáncer (Hallmarks of cancer). Tomado de: (Hanahan & Weinberg, 2011).

En la célula tumoral puede ocurrir la pérdida de determinados antígenos presentes en células normales. De igual modo pueden ocurrir cambios en la estructura de elementos normales como los antígenos de histocompatibilidad. Los cambios en la expresión antigénica de la célula cancerosa también pueden comprender la aparición de nuevos antígenos que no son característicos del tejido normal (Batista Duharte, 2003). Esto puede deberse principalmente a cambios en la estructura del DNA de dichas células que llevan a la expresión de nuevos antígenos.

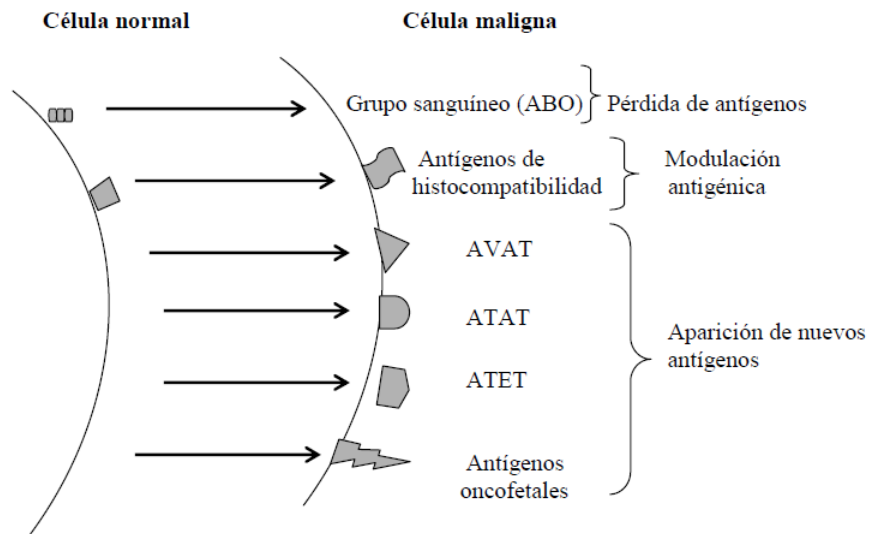


Figura 2: Cambios en la estructura de las células malignas cancerosas en comparación con células normales. Tomado de: (Batista Duharte, 2003)

2. Mutaciones

Una mutación génica es una alteración permanente en la secuencia de DNA que compone un gen de manera que hará que esta secuencia difiera de la que se presenta expresada de manera normal. Una mutación puede presentarse en distintas escalas, ya sea a partir de un solo par de bases hasta un segmento completo de un cromosoma, abarcando múltiples genes (National Library of Medicine, 2018). Éstas pueden ser:

2.1 Mutaciones hereditarias. Son heredadas por uno de los padres y se presentan a lo largo de la vida de una persona. Son llamadas también mutaciones germinales debido a que están presentes en las células espermáticas del padre o en los óvulos de la madre. Cuando el óvulo es fecundado, el embrión resultante posee el DNA de ambos padres. Así, si el DNA presenta alguna mutación, el embrión resultante tendrá esa mutación en todas las células de su cuerpo (Online Medical Investigation Current Research, 2018).

2.2 Mutaciones adquiridas (somáticas). Se trata de alteraciones en el DNA que a diferencia de las mutaciones hereditarias, se presentan en el individuo después de ser concebido. Pueden presentarse en cualquier célula del cuerpo a excepción de las células germinales y no

son hereditarias. Estas alteraciones pueden causar en la mayoría de los casos cáncer u otras enfermedades (National Cancer Institute, 2018). Pueden ser causadas por diversos factores ambientales como pueden ser la radiación ultravioleta de la luz solar o por errores en el copiado del propio DNA durante la división celular (National Library of Medicine, 2018).

Los cambios genéticos son comunes, ocurriendo en el 1% de la población y son llamados polimorfismos, los cuales son considerados como variaciones comunes del DNA y son responsables de muchas de las diferencias que pueden observarse a simple vista en una población, como puede ser el color de cabello y de ojos, así como el tipo de sangre. Generalmente éstos cambios no tienen efectos negativos en la salud de las personas, sin embargo, pueden llegar a ser factores de riesgo para desarrollar determinados padecimientos (National Library of Medicine, 2018). En cambio, las mutaciones que causan enfermedades son poco comunes en la población en general.

3. Mutaciones en el cáncer

El comportamiento anormal de las células durante el cáncer es resultado de mutaciones en genes reguladores clave, como pueden ser genes supresores de tumores o proto-oncogenes. La mayoría de los cánceres surgen a partir de una sola célula precursora mutante, que al dividirse transmite la anormalidad a sus “hijas”. Debido a los cambios que generan, estas células ganan resistencia ante los controles de muerte y ganan una proliferación descontrolada (Cancer Quest, 2018). Los diferentes tipos de mutaciones que existen son las siguientes:

3.1 Mutaciones puntuales. Solo se altera uno o pocos nucleótidos en la cadena de DNA. Los cambios ocasionados por este tipo de mutaciones pueden dar como resultado errores en la traducción de proteínas. Estos cambios en la traducción pueden ser:

3.1.1 Mutaciones “sinsentido” (Non-sense mutation en inglés). Ocurre cuando un codón que codifica para un aminoácido cambia por un codón de terminación, es decir, un codón UAG, UAA o UGA. Esto puede dar como resultado una segunda mutación que afecte al aparato transcripcional, lo que resultará en la inserción de un aminoácido en respuesta al codón de terminación y la expresión de un fenotipo de tipo silvestre o cercano al tipo silvestre (Herrington, 2018).

3.1.2 Mutaciones de sentido erróneo (Missense mutation en inglés). Ocurre cuando un par de bases es sustituido por otro, lo que resulta en la traducción de un aminoácido distinto en esa posición (Scott, 2005).

3.1.3 Mutaciones con desplazamiento del marco de lectura (Frameshift mutation en inglés). Implica la inserción o la delección de un nucleótido constituido por tres pares de bases que son indivisibles y que se traducen en uno de los veinte aminoácidos que componen una proteína (National Human Genome Research Institute, 2018).

3.1.4 Mutaciones transcripcionales. Algún daño en el DNA resulta de la modificación de un nucleótido o un pequeño grupo de nucleótidos que no pueden ser “leídos” por la enzima

RNA polimerasa. Cuando el complejo RNA polimerasa llega a estos puntos, ignora el daño y añade nucleótidos muchas veces erróneos. Este proceso es conocido como mutagénesis transcripcional y suele jugar un rol significativo en el desarrollo del cáncer (Cancer Quest, 2018).

3.1.5 Translocaciones. Un segmento de un cromosoma es transferido a otro cromosoma no homólogo o a otro sitio en el mismo cromosoma. Este tipo de mutaciones ocasionan nuevas relaciones de vinculación y generan nuevos cromosomas con un emparejamiento anormal. Aunque se han encontrado varias translocaciones al realizar análisis comparativos entre especies relativamente cercanas, este tipo de mutaciones se asocian más con consecuencias negativas como aneuploidías, infertilidad o cáncer (O'Connor, 2008).

3.1.6 Amplificación genética. Se trata de un incremento de una determinada región en el brazo de un cromosoma. Muchas veces, la presencia de tumores está asociada a este tipo de mutaciones y a la sobreexpresión de algunos genes que estas conllevan (Albertson, 2006). Si un oncogén está incluido en la región amplificada, la sobreexpresión lleva a un crecimiento y proliferación celular descontrolados. Ejemplos de oncogenes involucrados en gran diversidad de procesos neoplásicos son *ErBb-2* o *HER-2/neu* en cánceres de mama y ovario. Igualmente, este tipo de mutación contribuye a la resistencia a los fármacos en el cáncer; un gen comúnmente involucrado en esto es el MDR (multiresistencia a drogas). El producto proteico de este gen actúa como una bomba localizada en la membrana celular que expulsa selectivamente las moléculas que se encuentran dentro de las células (Cancer Quest, 2018).

3.1.7 Inversiones. Segmentos de un cromosoma son liberados y reinsertados en la posición contraria. Esto puede llevar a la activación de un oncogén o a la desactivación de genes supresores de tumores (Cancer Quest, 2018).

3.1.8 Duplicaciones. Esto ocurre cuando un gen o un grupo de genes son copiados más de una vez en un cromosoma. Difiere de la amplificación génica en que los genes son copiados fuera del cromosoma y sólo una vez, no cientos ni miles de veces (Cancer Quest, 2018).

3.1.9 Delecciones. Se trata de la pérdida de una parte de un gen o del gen en su totalidad. Puede ocasionar una pérdida en el RNA y la proteína traducida de ese gen. Ciertas delecciones han sido halladas en cáncer, así como en otras anomalías genéticas y demás anormalidades (National Cancer Institute, 2018).

3.1.2 Aneuploidías. Se define como un número cromosómico que deriva de un juego haploide y está asociado con anormalidades en las funciones de las células, como pueden ser cáncer u otros padecimientos como síndrome de Down y Aneuploidía Variegada en Mosaico. En este tipo de anormalidad cromosómica hay pérdida/ganancia de segmentos cromosómicos completos derivando en una aneuploidía cromosómica completa así como

re-arreglos no balanceados en el juego cromosómico, como deleciones, translocaciones o amplificaciones de regiones completas, resultando en una aneuploidía estructural (Orr, et al., 2015).

Además de los cambios en la secuencia del DNA, la expresión génica puede ser alterada por cambios en la cromatina que no afectan la secuencia en sí, estas modificaciones son conocidos como epigenéticos (Cancer Quest, 2018). Los principales cambios epigenéticos que existen son:

3.1.2.1. **Metilación.** Se refiere a la adición de grupos metilo (-CH₃) a ciertas posiciones de los nucleótidos mediante enzimas específicas. Esto puede ocasionar un bajo nivel de transcripción en las regiones que se metilan, mientras que las regiones que no se metilan se transcriben activamente (Pierce, 2006). Patrones anormales de metilación se han observado asociados a diferentes tipos de cáncer (Cancer Quest, 2018).

3.1.2.2. **Acetilación.** Durante la transcripción puede ocurrir la adición de grupos acetilo (CH₃CO) a las histonas por acción de las acetiltransferasas; los grupos acetilo desestabilizan el nucleosoma, neutralizando las cargas positivas sobre las colas de las histonas, permitiendo así que el DNA se separe de estas proteínas. Las desacetilasas, despojan a las histonas del grupo acetilo y reestablecen la represión de la cromatina (Pierce, 2006). La modificación de los procesos de adición y remoción de grupos acetilo en el DNA es un área activa de investigación en el tratamiento del cáncer (Cancer Quest, 2018).

Los mecanismos por los cuales son inducidas las mutaciones y las modificaciones epigenéticas son variadas y se pueden clasificar en las siguientes categorías:

3.1.2.3 **Mutaciones espontáneas.** En ellas, las bases del DNA se pierden o se alteran por errores de replicación o eventos moleculares al azar no reparados. Si este tipo de daño no es corregido, se presenta una mutación (Cancer Quest, 2018).

3.1.2.4 **Mutaciones inducidas.** Las mutaciones se pueden presentar debido a la exposición a diversos agentes químicos o físicos (Cancer Quest, 2018), destacando:

3.1.2.4.1 **Radiación.** Uno de los agentes causantes de mutaciones más conocido. Diferentes tipos de radiación causan diferentes tipos de cambio genético; por ejemplo, la radiación UV causa mutaciones puntuales y al igual que los rayos X puede romper la doble hélice del DNA; estos últimos pueden llegar a causar translocaciones, inversiones y otras anomalías cromosomales. Así mismo, la radiación emitida de forma natural por algunos elementos como el uranio y el radón u otros creados por el hombre pueden afectar directamente a las células o crear otros químicos que dañen al DNA de las mismas (Cancer Quest, 2018).

3.1.2.4.2 **Químicos mutagénicos.** Pueden inducir mutaciones uniéndose directamente al DNA o a sus componentes básicos e interferir con los procesos de transcripción y traducción, tal y como hacen el benzopireno, presente en el

humo del cigarro y la aflatoxina, la cual se encuentra en productos agrícolas que no han sido almacenados de manera correcta (Cancer Quest, 2018).

3.1.2.4.3 Inflamación crónica. La inflamación puede ser definida como una respuesta fisiológica y química ante una herida, en la que existe liberación de leucocitos (neutrófilos, monocitos y eosinófilos) desde los vasos sanguíneos hasta el sitio afectado, de igual modo, los mastocitos tienen un papel importante (Coussens, 2002). La inflamación crónica puede causar daño al DNA por medio de la producción de químicos mutagénicos por parte de las células involucradas (Cancer Quest, 2018), como pueden ser, radicales libres y demás especies reactivas de oxígeno (Coussens, 2002).

3.1.2.4.4 Radicales de oxígeno. Son producidos como productos normales del metabolismo y de la peroxidación de lípidos. Están involucrados en muchos tipos de cáncer, en los procesos de progresión del ciclo celular, proliferación, supervivencia celular, apoptosis, metabolismo, morfología celular, adhesión célula-célula, motilidad celular, así como angiogénesis y mantenimiento de la rigidez tumoral (Liou, 2010).

3.1.2.5 División celular anormal. Las aneuploidías ocurren en ~90% de tumores sólidos y en ~75% de cánceres hematopoyéticos, por lo que han sido reconocidas como características de las células tumorales (Weaver, 2008). De igual forma, se han detectado errores en la mitosis como causantes de anomalías en este tipo de células, siendo de los más destacados, un alineamiento incorrecto del huso mitótico a los cinetocoros de los cromosomas al realizarse la mitosis (Ly, 2017), lo que puede llevar a consecuencias en el número y distribución de diversos genes involucrados en la carcinogénesis, como se ha planteado con anterioridad.

3.1.2.6 Transposones. Se trata de secuencias cortas de DNA que se pueden mover de una posición a otra a través del genoma. Aquellos que son de la clase 2, codifican la enzima transposasa la cual usan para inserción y escisión, sin necesidad de usar RNA como intermediario (Pray, 2008). El movimiento de transposones activos puede llevar a mutaciones cambiando la actividad de los genes, lo cual puede llevar a desórdenes como el cáncer (Cancer Quest, 2018).

3.1.2.7 Virus y mutaciones. Se piensa que muchos virus son causantes de un porcentaje significativo en numerosos casos de cáncer (Cancer Quest, 2018). Los retrovirus, por ejemplo, poseen un oncogén (*v-onc*) cuya expresión resulta en un crecimiento anormal de células aberrantes (Ruprecht, et al., 2008) Uno de estos retrovirus es el Virus del Papiloma Humano (HPV por sus siglas en inglés), cuyo papel en el desarrollo del Carcinoma de Cérvix es de suma importancia.

4. Carcinoma de Cérvix

El Carcinoma de Cérvix, también conocido como Cáncer Cérvicouterino (CaCu) es la séptima neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más frecuente en mujeres, con

aproximadamente 528,000 casos nuevos diagnosticados por año, de los cuales un 85% se registran en países en vías de desarrollo, siendo en las regiones de África oriental y Asia occidental, en las que se registra la incidencia más alta variando de 42.7 a 4.4 por cada 100,000 mujeres respectivamente. De igual manera, es una importante causa de muerte en la población femenina mundial con 266,000 defunciones anuales, de las cuales, un 87% se da en países subdesarrollados. En América Latina, es la segunda neoplasia más común, con 68,818 casos anuales con una mortandad de 8.7 defunciones por cada 100,000 mujeres y un porcentaje de 75% en seis países: Brasil, México, Colombia, Perú, Venezuela y Argentina. Por su parte, en México, el Carcinoma de Cérvix es la segunda causa de muerte por neoplasia más recurrente en la población femenina. Se estima que anualmente se tiene una ocurrencia de 13,960 casos con una incidencia de 23.3 casos por cada 10,000 mujeres, siendo las entidades de Morelos, Chiapas y Veracruz los municipios que presentan una mayor incidencia del mismo (Secretaría de Salud, 2015).

Según estadísticas de GLOBOCAN (Bray, et al., 2018), el Carcinoma de Cérvix es una de las neoplasias con mayor incidencia a nivel mundial, ocupando el octavo lugar a nivel mundial en la población en general y el cuarto lugar en la población femenina, con un porcentaje del 6.6% en 8.6 millones de nuevos casos por año y una mortalidad del 7.5% en un total de 4.2 millones de muertes por año.

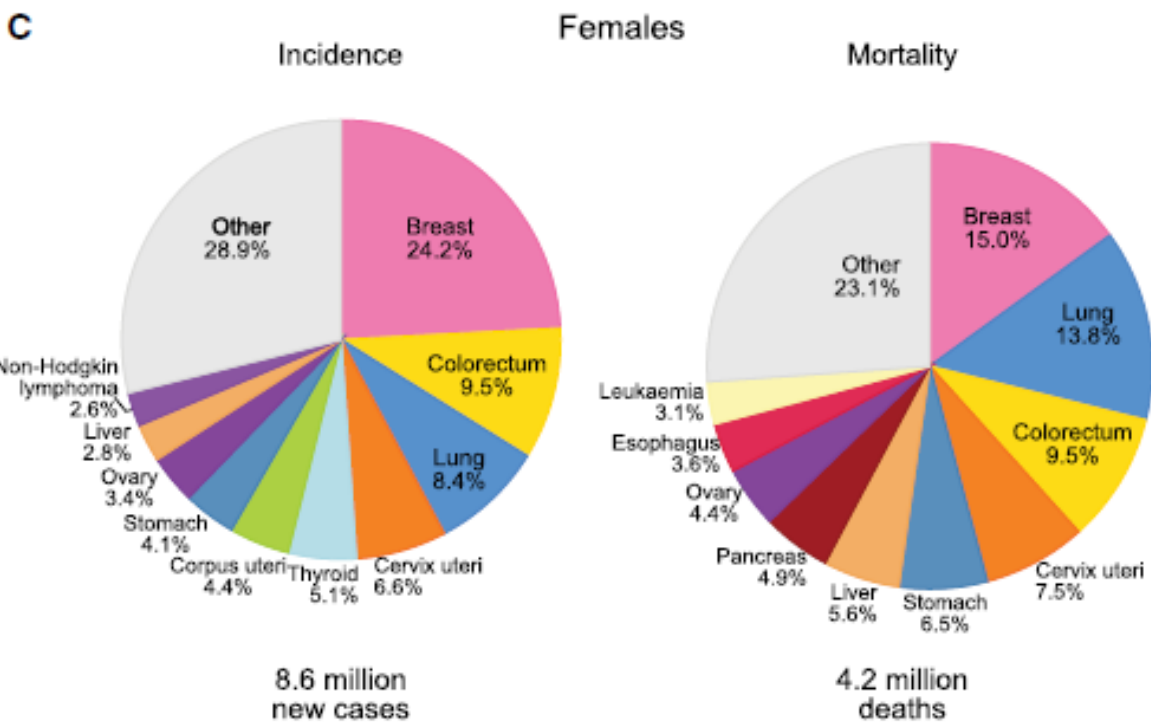


Figura 3: Incidencia y mortalidad de diferentes neoplasias en la población femenina a nivel mundial. Tomado de: (Brey, et. al. 2018).

Así mismo, la mayor incidencia de esta neoplasia se presenta en países en vías de desarrollo, siendo en África, Centro y Sudamérica las regiones en las que se presenta en mujeres jóvenes en edades de entre 30 y 40 años.

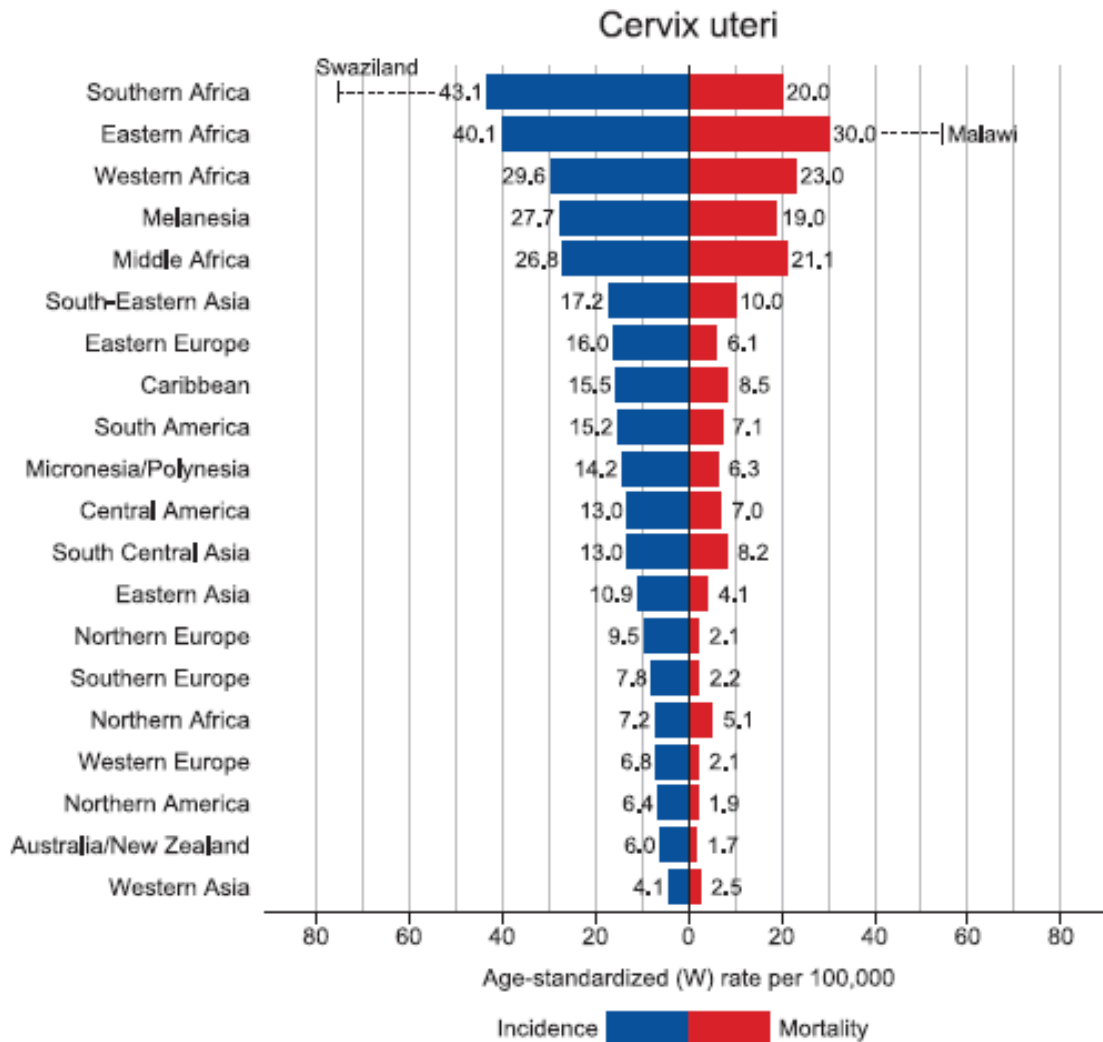


Figura 4: Incidencia y mortalidad del Carcinoma de Cérvix en la población femenina a nivel mundial. Tomado de: (Brey, et. al. 2018).

El Carcinoma de Cérvix se origina en las células que revisten el cuello uterino. Éste conecta el cuerpo del útero con la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix. La parte próxima a la vagina, es el exocérvix. Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el exocérvix) y las células glandulares (en el endocérvix). Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado

zona de transformación. La ubicación exacta de la zona de transformación cambia a medida que se envejece y si se llega a dar a luz (ACS, 2014).

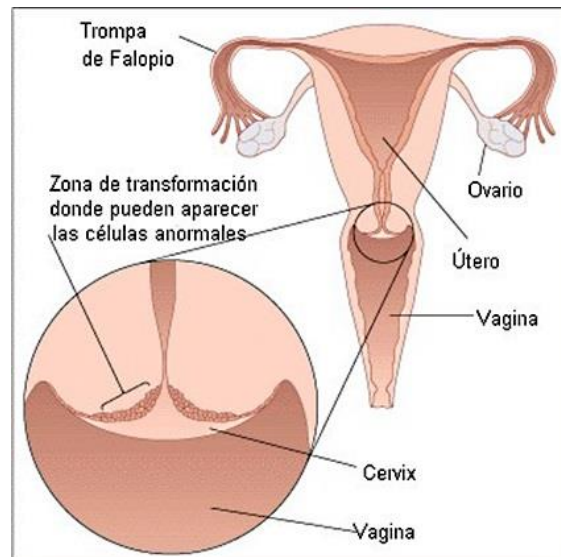


Figura 5: Localización de la zona de transformación del cuello uterino. Tomada de: (<http://cancercervicouterino.com.mx/anatomia-basica-del-cervix/>).

La mayoría de los Carcinomas de Cérvix se originan en las células de la zona de transformación. El factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de cuello uterino es la infección con el HPV. El HPV es un grupo de más de 150 virus relacionados, algunos de los cuales causan un tipo de crecimiento llamado papilomas, conocido más comúnmente como verrugas. El HPV se puede transmitir de una persona a otra durante el contacto con la piel. Una forma en la que el HPV se transmite es mediante el sexo, incluyendo el sexo vaginal, anal y oral. Alrededor de dos tercios de todos los cánceres de cuello uterino son causados por HPV 16 y 18. Sin embargo, el HPV no explica completamente qué causa el cáncer de cuello uterino. Se trata del factor más importante que influye en el desarrollo de este, aunque otros factores de riesgo (como fumar e infección con VIH) influyen en qué mujeres expuestas a HPV sean más propensas a padecer Carcinoma de Cérvix (ACS, 2014).

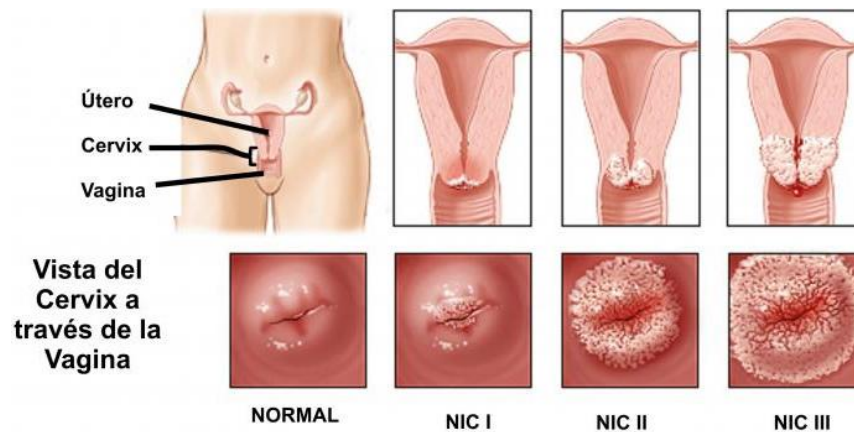


Figura 6: Comparación entre un cérvix normal y diferentes estadios del Carcinoma de Cérvix. Tomada de: (<http://www.radioterapiaguatemala.com/cancer-de-cervix/>)

5. Mutaciones en el Carcinoma de Cérvix

Como ya se ha planteado con anterioridad, algunos retrovirus son causantes de mutaciones en las células que infectan, a través de la activación/desactivación de genes que pueden llevar al cáncer. Los HPV no son la excepción, causando la síntesis de dos proteínas conocidas como E6 y E7 las cuales “apagan” genes supresores de tumores. Esto conduce a que estas células proliferen descontroladamente y provoca la expresión de genes importantes en el proceso carcinogénico (American Cancer Society, 2018).

Muchos tumores expresan genes cuyos productos son necesarios para la transformación maligna o para el mantenimiento del fenotipo maligno característico del cáncer. Con frecuencia, la regulación de estos genes es producto de mutaciones puntuales, eliminaciones, translocaciones cromosómicas o inserciones de genes víricos que afectan a protooncogenes o genes supresores de tumores. Los productos de muchos de estos oncogenes son proteínas citosólicas o nucleares que se degradan en los proteosomas y pueden presentarse en moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en células dendríticas que han fagocitado células tumorales. Estas moléculas pueden entrar en las vías de presentación del antígeno de las clases I y II del MHC en células tumorales. . Debido a que los genes mutados no están presentes en las células normales, los péptidos codificados por ellos no inducen autotolerancia estimulando así respuestas de los linfocitos T del anfitrión (Abbas & Litchman, 2015). Se han identificado diversas mutaciones en el Carcinoma de Cérvix, tanto en adenocarcinomas como en carcinomas de tipo escamoso. Por ejemplo, mutaciones en los genes P13K y MEK (Wright, et al., 2013). Recientemente, se han identificado nuevas mutaciones que

pueden fungir como biomarcadores de este tipo de cáncer y que no habían sido relacionadas con el mismo, como son SHKBP1, ERBB3, CASP8, HLA-A y TGFBR2 (Mitch, 2017).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, las células cancerosas se caracterizan por presentar cambios en su estructura genética que pueden alterar la expresión de receptores y otras moléculas que les confieren funciones distintas a las que normalmente desempeñan. Un ejemplo de ello es la expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) en Carcinoma de Pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en el cual incrementa la resistencia a distintos fármacos, tales como gefitinib y erlotinib, dos de los medicamentos más usados en tratamientos para este tipo de cáncer (Sharma, et al., 2007).

Se ha probado también, la relación entre el sistema inmune y el desarrollo de tumores, el cual se da por vías de señalización de células inmunológicas, que pueden actuar como agentes pro-tumorales así como anti-tumorales, como la activación del Factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), el cual provoca una mayor producción de quimiocinas en las células tumorales que atraen más moléculas inflamatorias hacia él (Grivennikov, et al., 2010).

6. Sistema inmune

El sistema inmune tiene la capacidad de distinguir entre componentes que resultan inherentes al organismo y cuerpos extraños, como pueden ser bacterias, virus o parásitos haciendo usos de diferentes mecanismos de defensa y reconocimiento celular. Esto debido a la presencia de componentes antigénicos presentes en la superficie de las células que lo componen. La reacción inmunológica humoral requiere de la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, mientras que en la de tipo celular participan diferentes subpoblaciones de linfocitos T que reconocen y destruyen células con antígenos de superficie extraños (Acosta, 2012).

Los principales efectores de la inmunidad celular, encargados básicamente de erradicar microorganismos intracelulares son los linfocitos T. Existen dos subpoblaciones: los T colaboradores, o "helper" (CD4+) y los T citolíticos o citotóxicos (CD8+). A su vez, los LTh (linfocitos T helper) se subdividen en TH1 y TH2. Este tipo celular reconoce a los péptidos antigénicos de los microorganismos intracelulares cuando se expresan en la superficie de la célula huésped asociados a moléculas del MHC I o MHC II, de acuerdo a quien sea el linfocito T efector, CD4+ o CD8+ respectivamente (Brandan, et al., 2007).

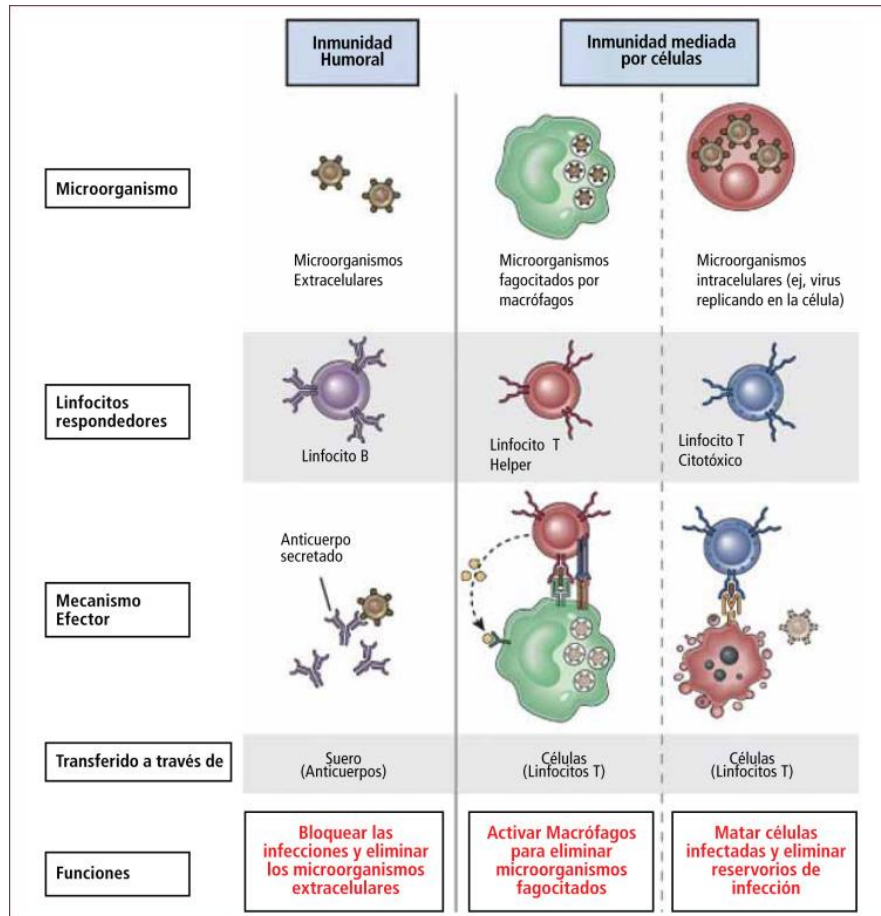


Figura 7: Principales tipos celulares implicados en la inmunidad celular. Tomado de: (Brandan, Aquino & Codutti, 2007).

Una de las respuestas más importantes de los linfocitos T al reconocimiento del antígeno es la producción de citocinas, y dentro de estas, la interleucina-2. Las citocinas (o citoquinas) median la proliferación de los linfocitos después del reconocimiento del antígeno en la fase de activación, y de las células efectoras especializadas en la respuesta inmunitaria adaptativa. Éstas poseen un peso molecular aproximado de 30 KDa. Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, los macrófagos son las células más comprometidas con su producción en lo que se refiere al sistema inmune humoral, mientras que en el sistema inmune específico, son las células T colaboradoras (Th), ya que sus citocinas son esenciales para que exista una respuesta inmune una vez que entran en contacto con las células presentadoras de antígeno (CPA). Muchas de las citocinas pertenecen a la familia de las llamadas hematopoyetinas y tienen estructuras terciarias compuestas por un conjunto de cuatro hélices alfa, con escasos dominios en láminas beta (Aguirre, et al., 2002).

7. Interleucina-2 (IL-2)

La interleucina-2 (IL-2) es una proteína descubierta en 1976 en los laboratorios del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, descrita inicialmente como un factor de crecimiento de las células T. Es producida principalmente por una sub-población de linfocitos T conocida como células Th1. La IL-2 humana, es una proteína monomérica de 15 kDa con 153 aminoácidos. Una vez traducida puede ser blanco de N y O glicosilaciones. 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 (Aguilar, 2014).

Se trata de un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por un antígeno y es responsable de la expansión clonal de las células T, tras el reconocimiento del antígeno. Actúa principalmente sobre las mismas células que la producen, es decir, como factor de crecimiento autócrino. Esta incrementa la actividad de las células NK (asesinas naturales o Natural Killer por sus siglas en inglés), y estimula el crecimiento y diferenciación de las células B indirectamente a través de la IL-4 y directamente sobre el receptor de IL-2 en la célula B10. La IL-2 es producida por linfocitos TCD4+ y en menor cantidad por células TCD8+. La activación de las células T por antígenos y co-estimuladores regula la transcripción del gen de la IL-2, la síntesis y la secreción de esta proteína, durante las primeras 4 a 8 horas con una secreción máxima de unas 24 a 48 horas después de la activación (Aguilar, 2014) siendo su producción transitoria (González, et al., 2007),

8. Receptor de Interleucina-2 (IL-2R)

La activación por antígenos o mitógenos de las células T induce la síntesis de IL-2 y la expresión de su receptor. Este receptor pertenece a la familia de receptores de tipo I, también llamada familia de receptores para hematopoyetina, los cuales pueden presentarse como dímeros o trímeros que suelen constar de cadenas ligadoras de ligando únicas y una o más cadenas transductoras de señales, que comparten a menudo receptores para citocinas. Esta familia puede dividirse en subgrupos de acuerdo a homologías estructurales o el uso de polipéptidos de señal compartidos. Este receptor está clasificado en uno de estos grupos debido a que su cadena γ es compartida por varios receptores para citocinas, como pueden ser IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Abbas & Litchman, 2015).

Este receptor multimérico puede existir en tres formas: con alta, media y baja afinidad a su ligando. Solo el receptor de alta y mediana afinidad es capaz de transmitir los efectos biológicos de la IL-2. El receptor al que se une IL-2 se expresa en la superficie celular y está formado por tres subunidades nombradas en función de su peso molecular: p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y las p64 (subunidad γ) que al combinarse forman un receptor de baja afinidad (p55, KD 10^{-8} M), afinidad media (p70/p64 KD 10^{-9} M) y alta afinidad (p55/p70/p64 KD 10^{-11} M) (Rebollo & Silva, 1994). Las diferentes subunidades también son nombradas como α (CD25), β (CD122) y γ (CD132).

La mayoría de las células T, células B y monocitos en reposo no expresan la subunidad α . Sin embargo, cuando las células T son activadas por anticuerpos CD3, con antígeno o lectinas, empiezan a expresar receptores para IL-2. La subunidad α del receptor para IL-2 también se expresa en células B activadas, leucemias de células B, linfomas, monocitos y macrófagos. En cuanto a la subunidad β , está comprobado que se expresa en células B y en monocitos activados, de igual manera que en líneas celulares que no expresan la subunidad α (Acosta, 2012). Esto se lleva a cabo mediante la vía JAK/STAT, en la cual, las enzimas JAK que normalmente se encuentran asociadas de manera inactiva a dominios citoplasmáticos de receptores de citocinas de tipo I o de tipo II se activan al entrar en contacto con dos moléculas de receptores, provocando la fosforilación de tirosinas en las porciones citoplasmáticas de los receptores agrupados. Luego, algunas de las fosfotirosinas son reconocidas por dominios homólogos al dominio 2 de src (SH2) de proteínas STAT citoplasmáticas, uniéndose a ellas. Es así como las STAT se acercan a las JAK y son fosforiladas por las cinasas asociadas al receptor. Luego, los dímeros de STAT que se generan son capaces de migrar al núcleo donde se unen a secuencias específicas del DNA en las regiones promotoras de genes que activan a la citocinas, activando así la transcripción de genes y permitiendo la proliferación (Abbas & Litchman, 2015).

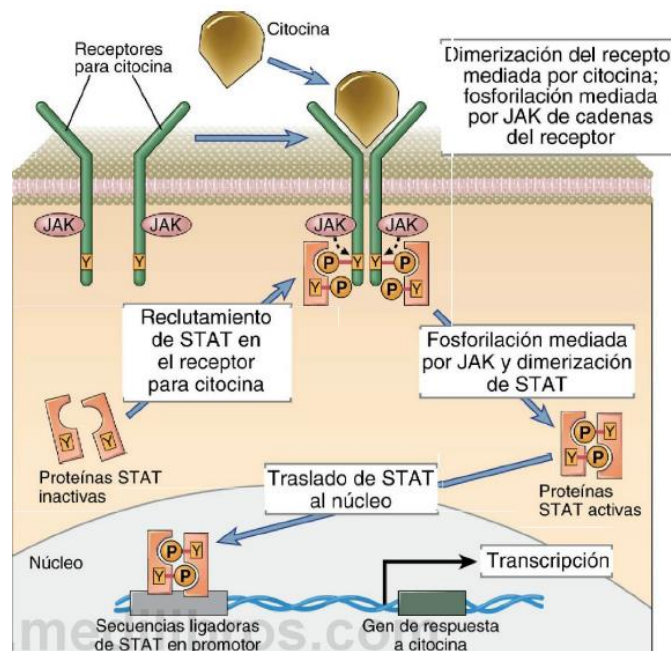


Figura 8: Vía de señalización JAK/STAT. Tomada de: (Abbas & Litchman, 2015).

Una vez en el núcleo, los dímeros de STAT se unen a secuencias consenso llamados sitios activados gamma (GAS) en los promotores de genes inducibles por citocinas, resultando en una activación transcripcional. De igual manera, las STAT pueden ser reguladas de manera negativa por supresores inducibles de citocinas o proteínas de señalización de citocinas (SOCS). Existen ocho miembros de la familia de las SOCS, destacando CIS (Dominio de proteína inducible de

citocinas SH2) y SOCS1-7. Algunas de las estrategias que adoptan las SOCS para ello son unirse a las JAK para inhibir su actividad, unirse a los receptores para impedir su unión a las JAK y competir con las STAT para su unión a los receptores activados (Mitchell, 2005).

9. Organización del gen de IL-2R β

El gen que codifica para la subunidad β del receptor para IL-2 está localizado en el brazo q del cromosoma 22, en el locus 22q12.3 y está organizado en 10 exones. La región extracelular de esta proteína tiene 214 aminoácidos, tamaño comparable con el de la subunidad α . Ambas subunidades reconocen epítomos distintos en la molécula de IL-2. La transfección de esta subunidad en células que no responden a la IL-2 y expresan la subunidad α y permite la recuperación de la capacidad de proliferación en respuesta a IL-2 (Rebollo & Silva, 1994). Las regiones transmembrana y citoplasmática de la proteína están compuestas por 25 y 296 aminoácidos respectivamente.

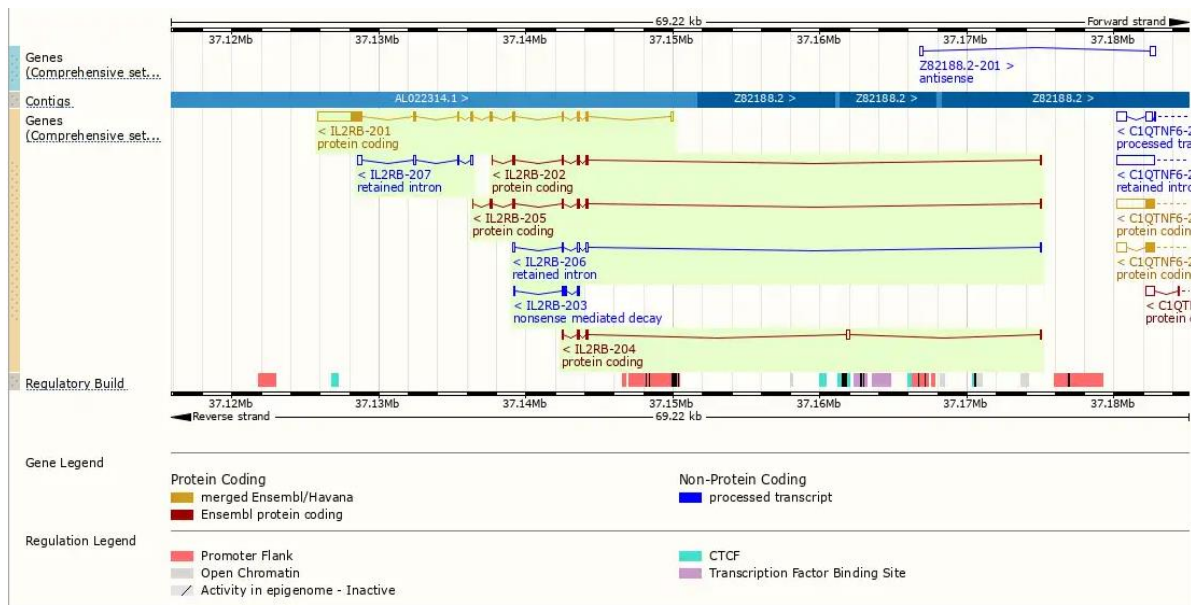


Figura 9: Organización del gen de IL-2R β . Tomado de Ensembl

(http://may2017.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000100385;r=22:37119350-37188566)

Inicialmente se determinó que el gen de la cadena beta del receptor para interleucina-2 (IL2R β) contiene diez exones y nueve intrones abarcando cerca de 24.3 (kb) (Shibuya, et al., 1990). Así mismo, la región extracelular del IL-2R β es codificada por siete exones (exones 2 a 8). El exón siete codifica el dominio extracelular pobre en cisteína, el cual incluye el motivo W-S (W-S-X-W-S; donde X es un aminoácido no conservado), el cual es estrictamente conservado en la

superfamilia de receptores a la que pertenece IL2R β . Además el IL2R β posee un dominio rico en cisteína en la región proximal al grupo N-terminal que parece estar evolutivamente relacionado con receptores para otras citocinas como interleucina 3 (IL-3), 4 (IL-4), 6 (IL-6), 7 (IL-7), eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), así como hormona de crecimiento y prolactina; este dominio parece estar codificado aunque no en su totalidad por los exones 3 y 4. La región citoplasmática es codificada por tres exones. Curiosamente, ésta región y la región 3' que no se traduce son codificados por un único exón, el exón 10. Anteriormente, el equipo de Shibuya determinó de igual forma que la región citoplasmática contiene varios dominios característicos: dominios ricos en prolina, dominios ácidos y ricos en serina, por ejemplo. Todos estos dominios son codificados por el exón 10, a excepción de una pequeña porción de la región rica en serina (Shibuya, et al., 1990).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Se ha demostrado la presencia del IL-2R en células tumorales. Por ejemplo, la subunidad α (p55) del IL-2R está presente en líneas celulares de tipo escamoso, como el carcinoma de seno, así como en queratinocitos (Weidmann, et al., 1992).

Igualmente, existen reportes de que mediante análisis con RT-PCR, se ha demostrado la presencia de las cadenas β (p70) y γ (p64) en líneas celulares de cáncer de mama aunque con una señal de menor intensidad que en un control de células linfoides (Yasumura, et al., 1994).

Por otra parte, ha sido posible observar la presencia de las cadenas α y β en dos líneas celulares de Carcinoma de Cérvix asociadas a HPV, CALO e INBL y además se ha demostrado cómo la Interleucina-2 (IL-2) interactúa con las cadenas alfa (α) y beta (β) de su receptor (IL-2R) para inducir la proliferación de éste tipo de células (Alvarado, 1997).

Se ha demostrado también, que las células de Carcinoma de Cérvix asociadas a HPV tienen la habilidad de modificar las moléculas que expresan en la membrana, como es el caso del IL-2R, moléculas ICAM-1 y clase 1 del MHC, observando que en estadios clínicos avanzados, las células tienden a expresar un pseudoreceptor de alta afinidad con el que pueden utilizar la IL-2 secretada por Linfocitos T Citotóxicos (Rodríguez, 1999).

Rocha, demostró la presencia del IL-2R en líneas celulares de Carcinoma de Cérvix asociadas a HPV, específicamente las cadenas β y γ , las cuales se ensamblan en un IL-2R funcional capaz de realizar transducción de señales de proliferación (Rocha, et al., 2004).

En años recientes se presentó evidencia de que las células de Carcinoma de Cérvix presentan en su superficie el IL-2R y que son capaces de usar la IL-2 exógena de manera funcional para proliferar (Rangel, et al., 2010).

JUSTIFICACIÓN

El Carcinoma de Cérvix es una de las neoplasias con mayor incidencia en la población femenina a nivel mundial solo detrás del cáncer de mama y es considerada dentro de las principales causas de muerte en esta población en países en vías de desarrollo, así como la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres en comunidades de bajos recursos en México. Muertes que causan un gran impacto social ya que en muchas ocasiones son estas mujeres el sostén de la familia. Es por ello que el estudio de su biología y la comprensión de su desarrollo resultan de suma importancia sobre todo para contar con información que nos permita en un futuro poder desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para combatir este tipo de cáncer con mayor eficacia.

HIPÓTESIS

Se ha comprobado que las células de Carcinoma de Cérnix de las líneas CALO e INBL expresan el receptor para interleucina-2 (IL-2R). La subunidad beta de este receptor es la encargada de activar vías de señalización que promueven la proliferación, diferenciación y activación de células linfoides. Mientras que en células de Carcinoma de Cérnix promueve su proliferación en presencia de IL-2 exógena, a través de una vía de señalización distinta a la promovida en células linfoides. Las variaciones en la secuencia de este receptor pudieran explicar esta diferencia. Por tanto, si realizamos la extracción de RNA mensajero (mRNA) de células de Carcinoma de Cérnix y secuenciamos los productos de amplificación, obtenidos a partir de RT/PCR para la cadena beta del IL-2R, encontraremos una mutación en los nucleótidos que explique esta diferencia en la vía de señalización del IL-2R.

OBJETIVOS

Objetivo general

Secuenciar un fragmento de la cadena beta del IL-2R β .

Objetivos particulares

Obtener mRNA a partir de una línea celular de carcinoma de cérvix.

Realizar retrotranscripción (RT) y PCR para obtener una doble hélice de cDNA.

Diseñar primers para la región específica del IL-2R β y realizar PCR, para obtener múltiples copias del amplificado.

Purificar los productos de PCR para su posterior secuenciación.

Secuenciar los productos de PCR por el método Sanger.

Comparar los resultados de la secuenciación con una base de datos para hallar cambios en la secuencia que resulten significativos en la expresión de la proteína.

METODOLOGÍA

Material biológico

El material biológico usado fueron células de Carcinoma de Cérvix de la línea celular INBL, establecida en el Laboratorio de Oncología Celular y conservada desde el año de 1992 en un banco de criopreservación. Se trata de células obtenidas a partir de una biopsia de cérvix, cuyas características son las siguientes: Estadio IV B derivada del virus HPV 18. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37°C, un pH de 7.0-7.2 y una atmosfera húmeda saturante al 10% de CO₂ en una incubadora Sayno Scientific modelo MCO-17AC.

Células de la línea INBL fueron cultivadas en platos de cultivo de 75 mm² durante 72 horas hasta que alcanzaron una confluencia del 80% (fase exponencial de crecimiento). Estas células fueron estimuladas durante 15 minutos con 10 UI/mL de IL-2 recombinante para promover la expresión del IL-2Rβ. Una vez transcurrido este tiempo se realizó la extracción de RNA mensajero por la técnica de Trizol®

Para el análisis del control positivo de la IL-2Rβ se extrajo RNA total de linfocitos de sangre periférica (LSP). Primero se extrajo sangre de voluntarios sanos con tubos vacutainer para posteriormente separar los LSP del resto del paquete celular con el método de Ficol Histopaque®. Posteriormente las células mononucleadas obtenidas se mantuvieron en cultivo durante 24 horas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado al 20% con SFB a una temperatura de 37°C y una atmosfera húmeda saturante al 10% de CO₂. Pasado este tiempo, fueron estimuladas con 10 UI/mL de IL-2 recombinante por 15 minutos para después realizar extracción de RNA.

Extracción de Linfocitos de Sangre Periférica (LSP)

Para la extracción de LSP, se utilizó el método de Ficol Histopaque®, poniendo en tubos de vidrio de 15 mL Histopaque® y después agregando la sangre extraída en proporción 1:1. Se procede a centrifugar a 400G durante 30 minutos sin frenado. Una vez pasado este lapso de tiempo, se obtienen cuatro fases que se separaron de acuerdo a un gradiente de densidad, tal y como se muestra en la siguiente imagen:

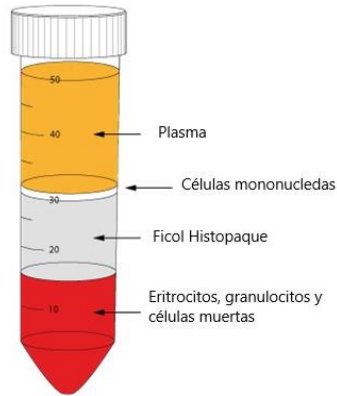


Figura 10: Separación de fases en sangre periférica obtenida con la técnica de Ficol Histopaque®

Con ayuda de una pipeta, se recuperó el halo de células mononucleadas y se colocó en otro tubo de vidrio de 15 mL al cual se le agregó medio RPMI-1640 frío para después centrifugar a 400 Gravedades (G) por 10 minutos para lavar las células mononucleadas de restos de Histopaque®, plasma o eritrocitos. Una vez que el botón celular se tornó de un color blanco, se procedió a cultivarlos durante 24 horas en las condiciones ya especificadas con anterioridad.

Extracción de RNA

Una vez obtenidos los cultivos de INBL y de LSP, se procedió a extraer el RNA total con el método de Trizol®. Para ello, fue necesario hacer lavados con PBS a las placas que contenían a los grupos de estudio con los que se trabajaron: las células estimuladas con IL-2 y las células sin estimular. Una vez efectuado el lavado, se agregó 1 mL de Trizol® para lisar los cultivos, recuperando el lisado en tubos eppendorf de 1.5 mL, colocándolos en hielo para evitar posibles acciones enzimáticas y degradación. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo frío y se agitó vigorosamente con la ayuda de un vórtex hasta que la mezcla cambió de coloración a un rosado pálido. Después de esto, se incubaron las muestras por 15 minutos en hielo para permitir la separación de fases. Transcurrido este lapso de tiempo, se centrifugaron a 13000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos obteniendo las siguientes fases:

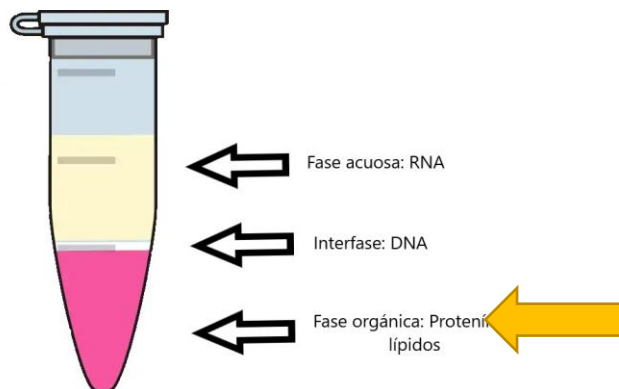


Figura 11: Separación de fases en extracción de RNA total con el método de Trizol®

Posteriormente, con una micropipeta se retiró la fase acuosa de todos los tubos y se transfirió a tubos eppendorf de 2 mL. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío, se mezcló y agitó suavemente, se incubó en hielo por una hora para permitir la precipitación de RNA, para posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos. Al final de la centrifugación se obtuvieron botones blanquecinos y un sobrenadante, el cual fue decantado.

Se agregó 1 mL de etanol al 75% grado molecular frío y se disgregó los precipitados agitando y mezclando con ayuda del vórtex de forma vigorosa. Se incubaron los tubos en hielo por 15 minutos y después se centrifugaron a 9500 rpm durante 5 minutos. Al finalizar la centrifugación, se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se colocaron los tubos boca abajo para permitir el secado de los precipitados. Una vez que estuvieron secos, con una apariencia gelatinosa y transparente, se hidrataron con agua libre de RNAsas.

Finalmente, se preparó un gel de agarosa al 1% con 40 mL de TBE 1X, 0.4 g de agarosa y 4 µL de bromuro de etidio, donde se corrieron alicuotas de 4 µL de las muestras con 4 µL de Buffer Green 5x a 70-80 V en una cámara de electroforesis sumergiendo el gel en TBE 0.5X para observar la integridad de las muestras, las cuales fueron almacenadas posteriormente a -70°C. Se tomaron fotos del gel en un fotodocumentador

Cuantificación de RNA

La cuantificación de las muestras se realizó por espectrofotometría en un biofotómetro Eppendorf BioPhotometer®, realizando primeramente un blanco de 50 µL con agua destilada y después una dilución 2:50 en agua libre de RNAsas de cada muestra. El biofotómetro muestra los resultados de absorbancias, siendo las más relevantes:

- La concentración en µg/µL.
- Relación A260/A230: Indica residuos de fenol usado durante la extracción.
- Relación A260/A280: Indica residuos de fenol y otros reactivos usados durante la extracción.
- A260: Absorbancia de los ácidos nucleicos. Puede utilizarse junto con el factor de densidad óptica del RNA (40µg/mL) para calcular la concentración de la muestra con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{l}/\mu\text{L} = \frac{(\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm})(\text{Factor de dilución:2:50})(\text{Factor de densidad óptica: } 40\mu\text{g/mL})}{1000}$$

Purificación de RNA

Una vez realizada la cuantificación, las muestras debieron purificarse de restos de DNA que pudieran resultar de la extracción. Para ello, se utilizó el kit DNase I de SIGMA®. Se agregaron 6 µg de RNA, 1 µL de buffer de reacción 10x y 1 µL de DNasa incluidos en el kit, llevando el volumen de la mezcla hasta 8 µL con agua libre de nucleasas. El mix se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, para posteriormente detener la acción de la DNasa con 1 µL de

solución STOP incluida en el kit, incubando por 10 minutos a 70°C eliminando con esto, restos de la enzima que pudieran intervenir en la reacción de RT/PCR.

Retrotranscripción/PCR (RT/PCR)

Una vez purificadas, se procedió a preparar un mix para retrotranscripción (RT), usando el kit de InVivoGen® M-MLV Lot. 1461402 de la siguiente manera:

Reactivo	Volúmen (µL)	Concentración
Buffer (5x)	5	1x
Oligo-DT 0.5 (µg/µL)	1.8	0.75 µg
Mix DNTP's (10 mM)	1.25	0.5 mM
M-MLV-RT (200 U/µL)	1	200 U
Muestra	11	6 µg
Agua libre de nucleasas	4.95	
Total	25	

Una vez preparado el mix, este se mezcló perfectamente y se colocó en el termociclador Eppendorf® Mastercycler y se programó con las siguientes especificaciones:

Temperatura de la tapa = 105°C

Tempertura de Retrotranscripción = 42°C durante 1: 00 : 00 hora

Los primers para IL2Rβ fueron diseñados de acuerdo a la secuencia de la variante 1 del RNA mensajero (mRNA) que codifica para dicha proteína, la cual se encuentra en la base de datos Gene de NCBI, disponible en (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando para ello la herramienta en línea Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>), la cual arrojó cinco pares de primers, de los cuales se escogió aquellos con el mayor “score”, que son los siguientes:

<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	Primer_F
Sequence:	GCTGATCAACTGCAGGAACA
Start: 988	Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	Primer_R
Sequence:	TGTCCTCTCCAGCACTTCT
Start: 1193	Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 3.0
Product Size: 206 bp	Pair Any: 6.0 Pair End: 2.0

Una vez que concluyó el tiempo de la RT, se preparó un mix para PCR tanto para IL-2R β como para β -actina de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen (μ L)	Concentración
Buffer Green (5x)	7	1.4x
Mix DNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer 3' (10 μ M)	2.5	1 μ M
Primer 5' (10 μ M)	2.5	1 μ M
GoTaqPol (5 U/ μ L)	0.13	0.65 U
Agua libre de nucleasas	7.37	
Total	20	
cDNA	5	
	25	

Ya preparado el mix, este se mezcló vigorosamente y se introdujo al termociclador en un programa con las siguientes especificaciones:

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización primaria	94° C	00: 05: 00
Desnaturalización secundaria	94° C	00: 00: 45
Hibridación	53° C	00: 00: 45
Elongación primaria	72° C	
X30		00: 02: 00
Elongación secundaria	72° C	00: 07: 00

Al concluir la PCR se elaboró un gel de agarosa al 3% con 1.2 g de agarosa en 40 mL de TBE 1X y 4 μ L de bromuro de etidio, en el cual se corrieron alícuotas de 4 μ L de muestra y 4 μ L de Buffer Green 5x a 100-120V y un marcador de peso molecular, sumergiendo el gel en TBE 0.5X. Posteriormente se tomaron fotos en el fotodocumentador. Adicionalmente, se realizó una reamplificación en las condiciones establecidas con anterioridad para PCR.

Purificación de productos de PCR

Se corrió un gel de agarosa con la totalidad de las muestras y un marcador de peso molecular(CSL-MDNA-50BP) Posteriormente, usando una navaja de bisturí nueva y esteril, se cortaron los segmentos de DNA que fueron visibles gracias al fotodocumentador y se almacenaron en tubos eppendorf de 200 μ L.

Para la purificación se uso el kit Quiaquick® Gel Extraction Kit (cat. nos. 28704) de QuiaGen®. Primero, se añadieron 3 volúmenes de Buffer QG incluido en el kit a un volumen de gel. Para ello, se pesaron tubos eppendorf de 200 μ L vacíos, para posteriormente pesarlos con los trozos de gel en su interior y poder realizar una relación matemática peso-volumen y así añadir el volumen requerido de buffer. Una vez añadido el Buffer QG, se incubó a 50°C por 10 minutos, agitando cada 2 minutos para permitir la disolución del gel. El color amarillo de la solución es un indicador de que el pH se ha mantenido a ≤ 7.5 .

Una vez que el gel se diluyó, se añadió un volumen de isopropanol de grado molecular y se mezcló suavemente con ayuda de una micropipeta para permitir la precipitación del DNA. Posteriormente se colocó una de las columnas del kit en un tubo recolector del mismo, se añadió la muestra y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto, desechando el sobrenadante una vez concluida la centrifugación. Se agregaron 500 μ L de Buffer QG y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm.

Posteriormente se añadieron 70 μ L de Buffer PE, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm por un minuto. Se centrifugó una vez más para eliminar residuos de buffer. Después, se colocó la columna de centrifugación en un tubo eppendorf limpio y estéril de 1.5 mL y se añadieron 50 μ L de Buffer EB (Tris-Cl 10mM pH 8.5) directamente al centro de la columna para eluir el DNA, luego se incubó el tubo a temperatura ambiente por 4 minutos y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm. Por último, se corrió un gel de agarosa al 3%, cargando 5 μ L de DNA purificado más 5 μ L de Buffer Green 5x y una escalera de pares de bases para corroborar la integridad del DNA purificado. Igualmente, se cuantificó en el biofotómetro para determinar la concentración del DNA obtenido. Todo esto se hizo siguiendo el inserto incluido en el kit de purificación.

Secuenciación

Las muestras fueron secuenciadas en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala utilizando el método de Sanger.

RESULTADOS

Gel de integridad de RNA total

Se extrajo RNA total de linfocitos de sangre periférica (LSP) y de células de Carcinoma de Cérnix de la línea celular INBL mediante el método de Trizol®, para posteriormente correr un gel de agarosa al 1%. Se pueden observar las subunidades 28s, 18s y 5s del RNA ribosomal en LSP e INBL. La presencia de estas tres subunidades nos demuestra la integridad del RNA.

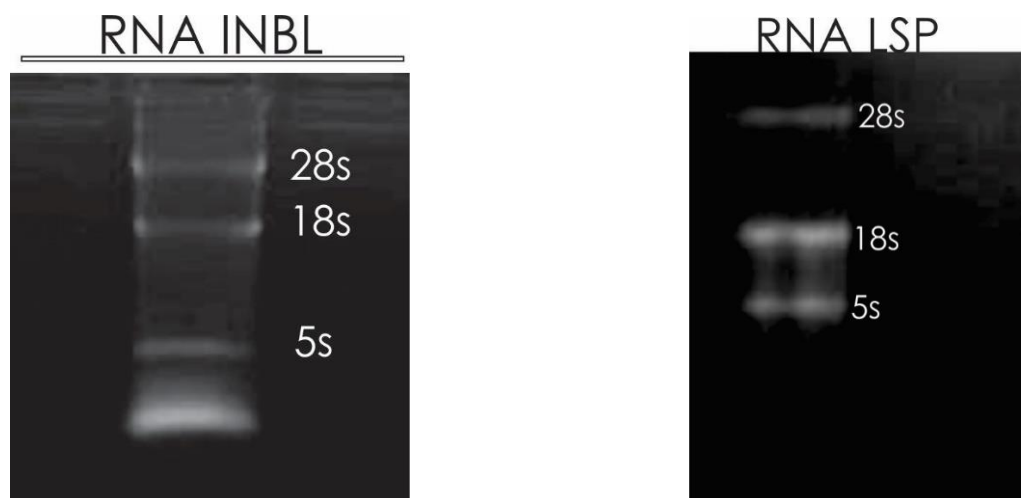


Figura 12: Prueba de integridad de extracción de RNA. Se muestran las 3 subunidades ribosomales 28s, 18s y 5s del mRNA. A la izquierda se observa el producto de la extracción de RNA en células de Carcinoma de Cérnix de la línea INBL. A la derecha, se aprecia el producto de la extracción de RNA en Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) que se utilizó como control positivo de la técnica.

Amplificación por PCR de IL-2R β en células de Carcinoma de Cérnix

Una vez que se obtuvo el RNA total de los LSP y de las células INBL se realizó una RT y posteriormente una PCR, con primers para β -actina como control positivo de la técnica y primers para IL-2R β . Se observa un producto de amplificación para β -actina de 250 pares de bases en LSP y en INBL. Para el caso de IL-2R β se observa un producto de amplificación de 207 pares de bases en INBL. La expresión de IL-2R β en INBL es relativamente baja.

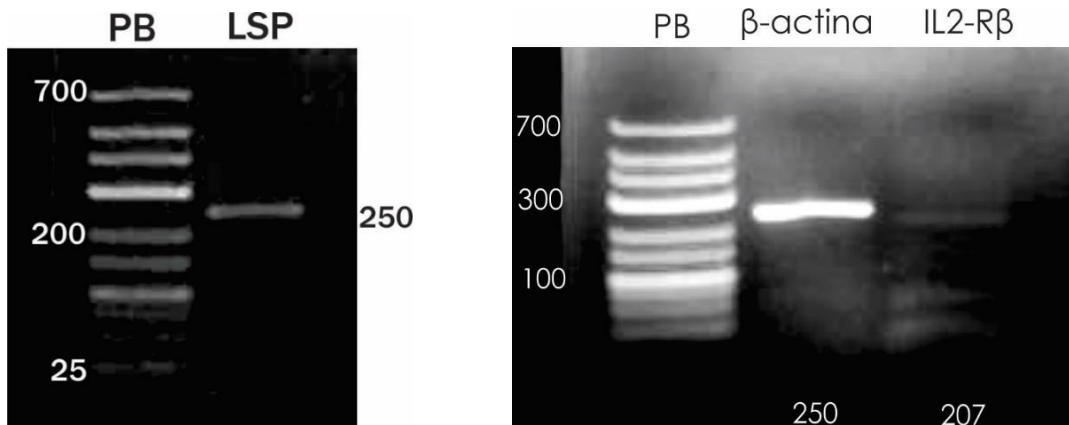


Figura 13: Gel de electroforesis en agarosa de productos de PCR. A la izquierda se observa el producto de PCR en LSP con primers específicos para β -Actina comparada con una escalera de pares de bases (GeneRuler®), la cual sirvió como control positivo de la técnica de PCR. A la derecha se observan los productos de PCR de la línea celular de Carcinoma de Cérvix asociada a HPV INBL con primers específicos para β -actina e IL-2R β comparado con una escalera de pares de bases (GeneRuler®).

Reamplificación del producto de PCR correspondiente al IL-2R β en INBL

Debido a que la expresión de IL-2R β en INBL es baja, se procedió a reamplificar el producto de PCR para aumentar la cantidad de amplicones. La reamplificación del IL-2R β se realizó bajo las mismas condiciones por cuadruplicado. Se obtuvo un producto de 207 pares de bases correspondiente a IL-2R β y un subproducto adicional con un tamaño de aproximadamente 150 pares de bases en cada una de las repeticiones. Se puede observar que la reamplificación de IL-2R β aumentó el número de amplicones, sin embargo, se generó un subproducto que posiblemente corresponde a variantes de IL-2R β .

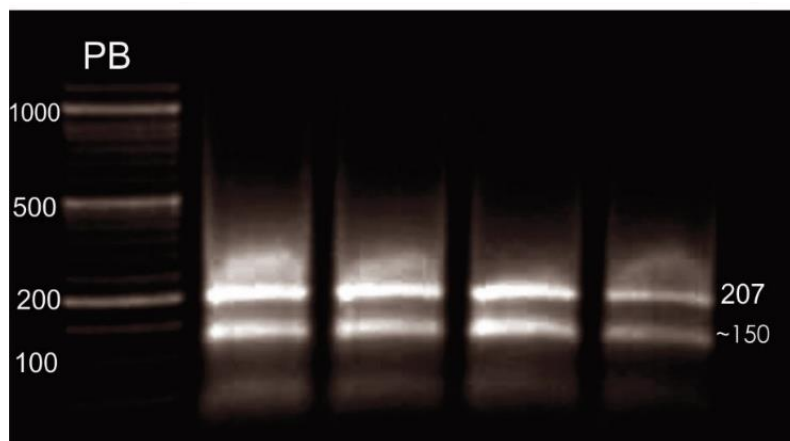


Figura 14: Gel de electroforesis en agarosa de productos reamplificados por cuadruplicado mediante PCR de células de Carcinoma de Cérvix asociado a HPV de la línea celular INBL con primers específicos para IL-2R β comparados con una escalera de pares de bases (GeneRuler®). Se aprecia la banda correspondiente al IL-2R β con 207 pares de bases de longitud y la banda que corresponde al subproducto de 150 pares de bases aproximadamente.

Purificación de productos de PCR

Las muestras de IL2-R β reamplificadas por PCR fueron purificadas con el kit QuiaQuick de Quia-Gen® siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto la banda de interés, correspondiente a IL2-R β con una longitud de 207 pares de bases como el subproducto de aproximadamente 150 pares de bases fueron procesados de la misma forma. Una vez purificados los productos, se realizó un gel de electroforesis para comprobar la presencia de éstos. En ambos casos, se observa una banda que corresponde al tamaño de IL-2R β y al subproducto de manera independiente, siendo la primera de mayor intensidad.

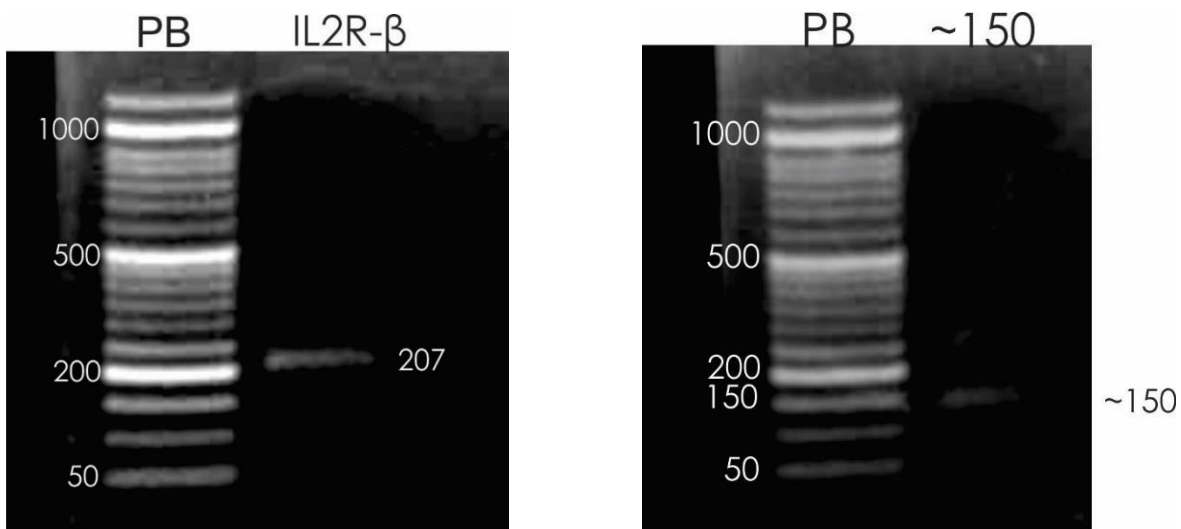


Figura 15: Gel de electroforesis en agarosa de productos purificados con el kit QiaQuick de QiaGen®. A la izquierda se observa el producto de PCR correspondiente a IL-2R β de 207 pares de bases de longitud comparado con una escalera de pares de bases (GeneRuler®). A la derecha, se observa el subproducto de PCR correspondiente a IL-2R β de aproximadamente 150 pares de bases de longitud comparado con una escalera de pares de bases (GeneRuler®).

Secuenciación de productos de PCR purificados con el primer IL-2R β left

Los productos obtenidos por PCR y que posteriormente fueron purificados, se secuenciaron a través del método de Sanger. Se utilizaron los dos primers de la PCR para la secuenciación, los cuales se etiquetaron como “IL-2R β right” e “IL-2R β left”. Como resultado de la aplicación de esta técnica, se obtuvieron dos series de cromatogramas, donde se muestra en la parte superior, la expresión de cada base en la cadena del amplificado. Para el primer etiquetado como IL-2R β left, se obtuvo lo siguiente.



Figura 16: Cromatograma de la cadena secuenciada con el primer etiquetado como "IL-2R β left". A la derecha, se observa el inicio de la cadena. En la segunda imagen, se observa la continuación de la cadena secuenciada.

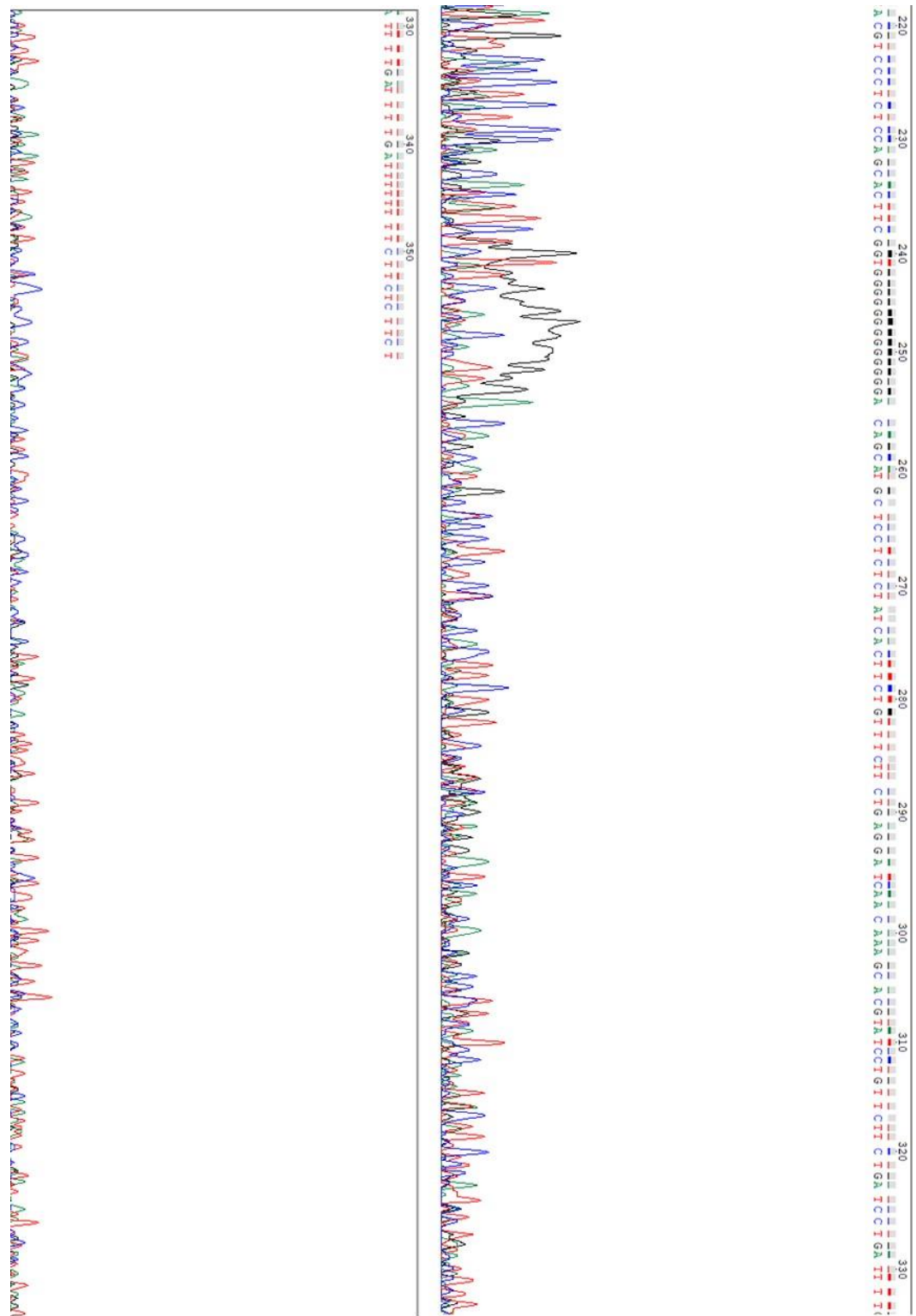


Figura 17: Cromatograma que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2Rβ secuenciado con el primer "IL-2Rβ left" (Continuación). A la derecha, se muestra la continuación de la cadena, respecto a la figura anterior, A la izquierda se muestra el final de la cadena secuenciada por el primer ya mencionado.

Los cromatogramas nos muestran que al inicio, la secuenciación del primer etiquetado como IL-2R β left no es tan fina, mostrando picos de fluorescencia muy intensos. La señal se estabiliza en la secuenciación media del amplicón, para luego perder intensidad y disminuir gradualmente. Los cromatogramas nos muestran la secuencia del primer IL-2R β left, la cual inicia con el triplete GCT y termina la secuencia con el triplete TCT. La secuenciación por medio del primer IL-2R β left nos arroja una secuencia de nucleótidos que corresponde al tamaño del producto de amplificación.

Análisis de la secuencia obtenida por secuenciación tipo Sanger del primer IL-2R β left

De manera posterior a la PCR y a la purificación, se secuenciaron los productos obtenidos para analizarlos con la herramienta BLAST de NCBI (National Center for Biotechnological Information, 2018) con los parámetros preestablecidos por la misma. Como resultado de este análisis se obtuvo que la secuencia coincide en un 96% de su estructura con la variante 3 del RNA mensajero (mRNA) del IL-2R β , al correrse con el primer etiquetado como “IL-2R β left”. Para el primer etiquetado como “IL-2R β right” por otra parte, se encontró un 91% de homologías con la misma variante del gen. Los cambios en la secuencia arrojados por los análisis fueron los siguientes:

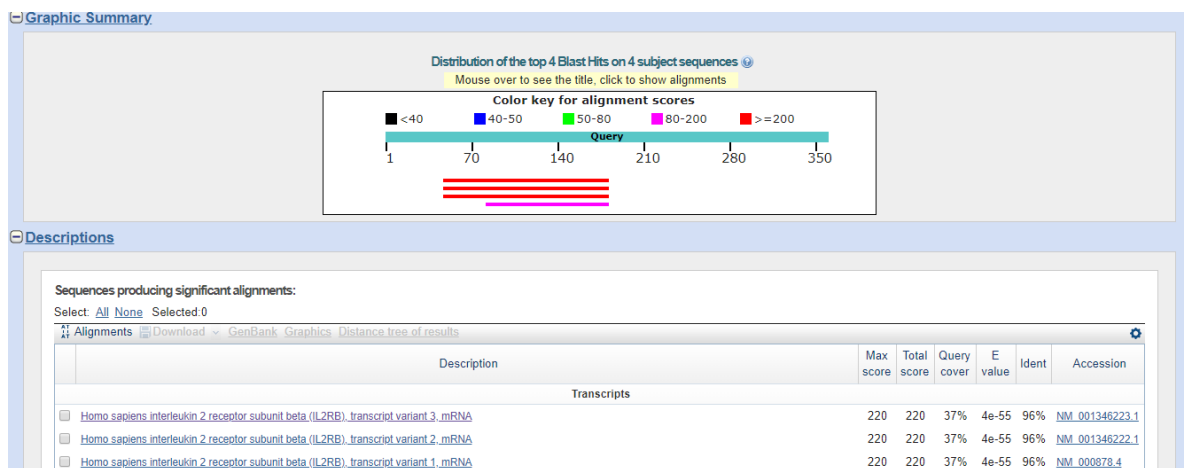


Figura 18: Porcentaje de homología del producto secuenciado con el primer “IL-2R β left”. Se muestra un 96% de homología con la variante 3 de la IL-2R β humana, así como el mismo porcentaje de identidad para las variantes 2 y 1 de la misma cadena. En la parte superior se aprecia el score de alineamiento, en una cantidad mayor o igual a 200 pares de bases en las posiciones ~70 al ~150, mientras que en las posiciones ~75 a ~150 existe un score de 80 a 200 pares de bases con 220 scores en total para cada uno.

Igualmente, la herramienta nos muestra los cambios que se presentan en la cadena secuenciada respecto a la secuencia original registrada en la base de datos de la misma y con la que presenta mayor homología.

Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 3, mRNA
 Sequence ID: [NM_001346223.1](#) Length: 4051 Number of Matches: 1

Range 1: 998 to 1131 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
220 bits(119)	4e-55	129/134(96%)	0/134(0%)	Plus/Plus
Query 48	TTTCCCTCATGAGCTCAAGCATGGAGGAAACGTCCAGAAGTGGCTCTCTTCGCCCTTCC	107		
Sbjct 998	TTTCCCAACTGAGCTCAGAGCATGGAGGAGACGTCCAGAAGTGGCTCTCTTCGCCCTTCC	1057		
Query 108	CCTCATCGTCCTTCAGCCCTGGCGGCCTGGCACCTGAGATCTCGCCACTAGAAGTGCTGG	167		
Sbjct 1058	CCTCATCGTCCTTCAGCCCTGGCGGCCTGGCACCTGAGATCTCGCCACTAGAAGTGCTGG	1117		
Query 168	AGAGGGACAAGTGTG	181		
Sbjct 1118	AGAGGGACAAGTGTG	1131		

Figura 19: Cambios encontrados en el transcrito reportado para la variante 3 del mRNA de la IL-2R β en comparación a la secuencia obtenida con el primer "IL-2R β left". Se aprecian, resaltados en rojo, cambios en las posiciones 1004, 1006, 1015, 1027 y 1128

La figura anterior muestra un cambio de una adenina por una timina en la posición 1004, el cambio de una citosina por una adenina en la posición 1006, y los cambios de una guanina por una adenina en las posiciones 1015, 1027 y 1128.

Secuenciación de productos de PCR purificados con el primer IL-2R β right

De la misma manera, se secuenció la segunda parte de la cadena utilizando el primer etiquetado como "IL-2R β right", de la cual se obtuvo la siguiente serie de cromatogramas:



Figura 20: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β right". A la derecha, se aprecia el primer cronograma con el inicio de la secuencia. En el centro, se observa la continuación de la secuencia. Por último, a la izquierda se aprecia el último de los cronogramas con el fin de la secuencia obtenida con el primer ya especificado.

Los cromatogramas nos muestran que al inicio de la secuenciación del primer etiquetado como IL-2R β right no es tan fina, mostrando picos de fluorescencia muy intensos. La señal se estabiliza en la secuenciación media del amplicón, para luego perder intensidad y disminuir gradualmente. Los cronogramas nos muestran la secuencia del primer IL-2R β right, la cual inicia con el triplete GCT y termina la secuencia con el triplete TTT. La secuenciación por medio del primer IL-2R β right nos arroja una secuencia de nucleótidos que corresponde al tamaño del producto de amplificación.

Análisis de la secuencia obtenida por secuenciación tipo Sanger del primer IL-2R β right

De igual forma que con los resultados anteriores, éstos fueron introducidos en la base de datos BLAST (National Center for Biotechnological Information, 2018) para su análisis, confirmando la homología de la cadena obtenida con la variante 3 del IL-2R β humano en un 91%.

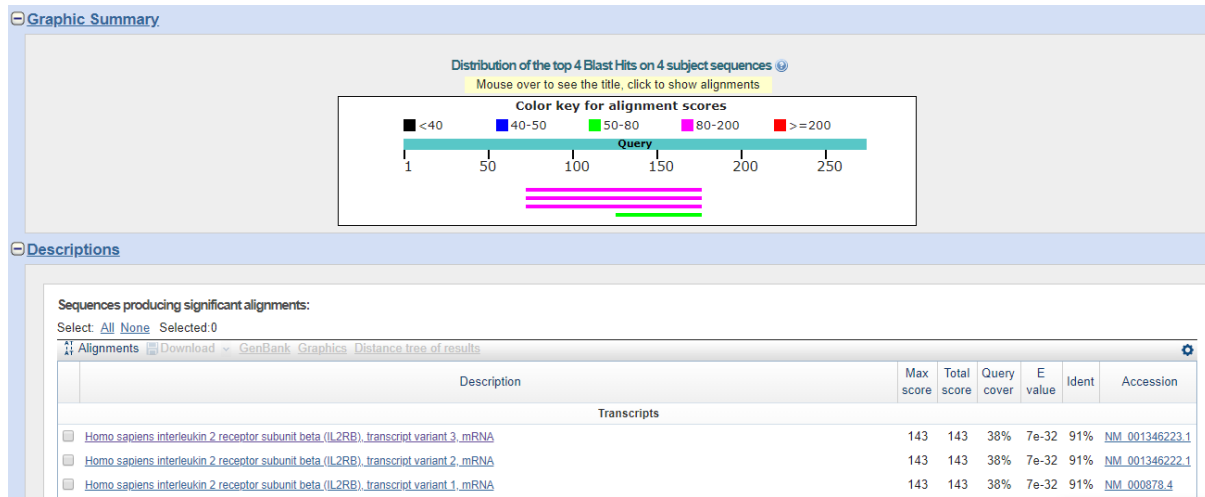


Figura 21: Porcentaje de homología del producto secuenciado con el primer "IL-2R β right". Se aprecia un 91% de homología con la variante 3 del IL-2R β humano. En la parte superior se aprecia la cantidad de scores presentes en la cadena secuenciada respecto a la cadena reportada. Se observan de 80 a 200 scores en las posiciones ~75 a ~170, mientras que en las posiciones ~125 a ~175 se observan de 50 a 80 scores solamente con un total de 143 scores cada uno.

Para esta segunda cadena, la herramienta también muestra los cambios presentes en ella con respecto a la cadena original reportada para la variante 3 del IL-2R β humano previamente reportada en la base de datos.

Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 3, mRNA
 Sequence ID: [NM_001346223.1](#) Length: 4051 Number of Matches: 1

Range 1: 916 to 1019 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
143 bits(77)	7e-32	96/105(91%)	2/105(1%)	Plus/Minus
Query 73	TGCTCGAAGCTCTTGGGAAAACAACTCGAGGGGTCTGGGATGATACACTTCAGGACC	131		
Sbjct 1019	TGCTCTGAGCTCAGTGGGAAAAGAACTCGAGGGGTCTGGGGTCTACACTTCAGGACC	960		
Query 132	TTCTTCAGCCATGGCCCCGGTGTTCCTGCAGTTGATCAGCAATGTA	176		
Sbjct 959	TTCTTCAGCCATGGCCCCGGTGTTCCTGCAGTTGATCAGCAAGTA	916		

Figura 22: Cambios encontrados en el transcrito reportado para la variante 3 del mRNA de la IL-2R β en comparación a la secuencia obtenida con el primer "IL-2R β right". Se aprecian, resaltados en color rojo, cambios en las posiciones 1014, 1013, 1007, 1006, 996, 992, 977, 974 y 918.

En la figura anterior es posible observar en la posición 1014 el cambio de una timina por una guanina. Inmediatamente después, en la posición 1013, el cambio de una guanina por una adenina; igualmente se observa la adición de una adenina en la posición 1007 y el cambio de una guanina por una timina en la posición 1006. En la posición 996, una citosina cambia por una guanina, mientras que en la posición 992, una timina sustituye a una adenina; en la posición 977 una guanina a una adenina y en la 974 una timina a una adenina. Finalmente, en la posición 918 hay la delección de una timina.

Análisis del transcrito resultante de los productos de secuenciación en BLAST

La región amplificada por los primers que se diseñaron, traduce los aminoácidos de las posiciones 263 a 345 de la IL-2R β , la cual corresponde a los dominios transmembrana y a una parte del citoplasmático en dicha proteína. Al analizar la secuencia en BLAST (National Center for Biotechnological Information, 2018), se obtuvieron los resultados siguientes.

El producto obtenido por PCR y secuenciado por Sanger transcribe un aminoácido con un 85% de identidad con el precursor de la IL-2R β humano, tal y como se muestra a continuación:

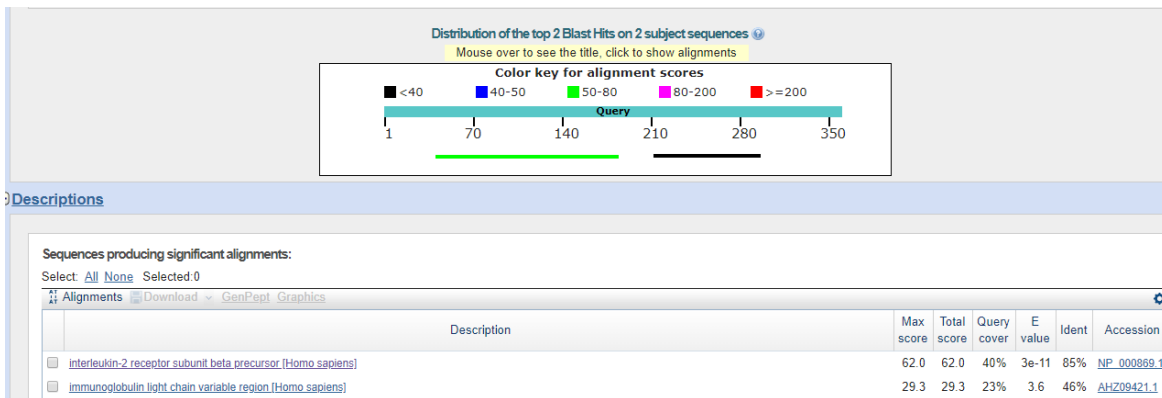


Figura 23: Porcentaje de identidad del transcrito secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2Rβ left". Se observa que el transcrito presenta un 85% de identidad para el precursor del IL-2Rβ humano y un 46% de identidad para la región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina humana. En la parte superior, se logra observar la cantidad de scores en la cadena de aminoácidos; se aprecian de 50 a 80b scores en las posiciones ~60 a ~190, mientras que en las posiciones 210 a ~285 se aprecian menos de 40 scores.

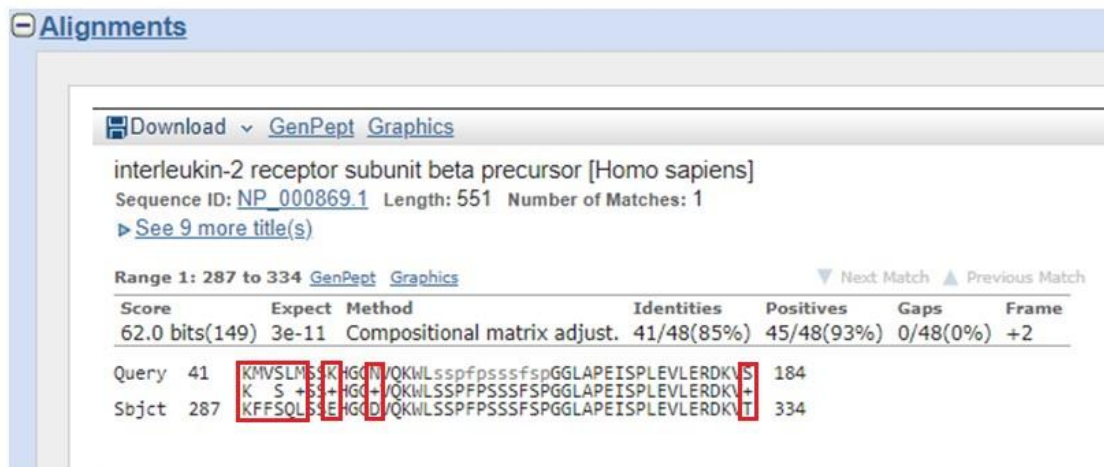


Figura 24: Aminoácidos traducidos por la secuencia obtenida con el primer etiquetado como "IL-2Rβ left". Se aprecian, resaltados en color rojo, cambios en las posiciones, 288, 289, 291, 292, 295, 299 y 334 en comparación a la cadena original de aminoácidos de la proteína.

En la imagen de arriba se puede apreciar que la cadena de aminoácidos traducida abarca de las posiciones 287 a la 334 en la proteína. En ella se puede apreciar algunos cambios en la misma. Por ejemplo, dos fenilalanina sustituyen a una metionina y a una valina en las posiciones 288 y 289 respectivamente. Así mismo, en las posiciones 291 y 292 una leucina y una metionina son sustituidas por una glutamina y una leucina respectivamente. También es posible ver un ácido glutámico sustituyendo a una lisina en la posición 295. En la posición 299, un ácido aspártico sustituye a una asparagina. Por último, una treonina sustituye a una serina en la posición 334.

No obstante, tanto este aminoácido como los anteriores, una valina y una lisina que son iguales a la ya reportadas no aparecen en el marco de lectura de la secuencia que se amplificó previamente y que traduce para la expresión de la IL-2R β .

Por otro lado, con la secuencia obtenida con el primer etiquetado como "IL-2R β right" se obtuvo un 77% de identidad con la secuencia de aminoácidos del IL-2R β , teniendo además otros scores con otras proteínas.

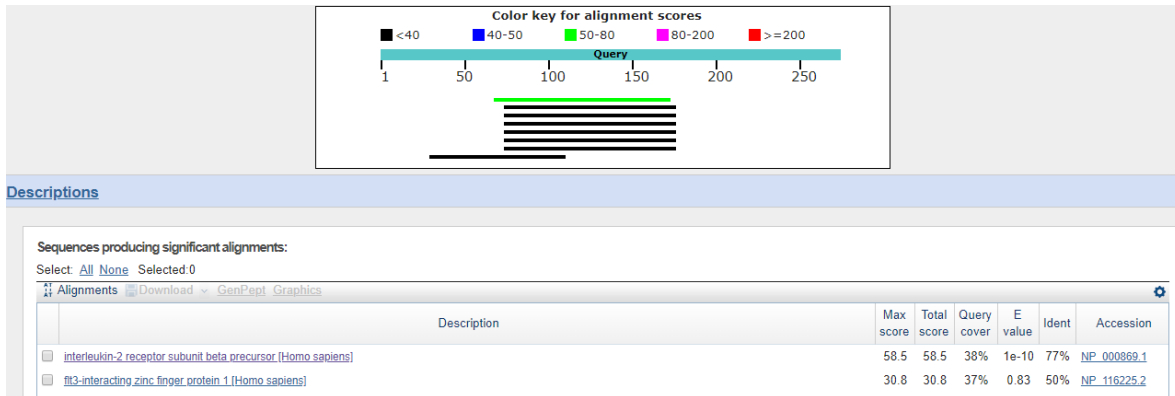


Figura 25: Porcentaje de identidad del transcrito obtenido con el primer etiquetado como "IL-2R β right". Se observa un 77% de identidad con el precursor de la IL-2R β humano y un 50% de identidad para la proteína 1 fit-3. De igual forma que con la cadena anterior, se aprecian diversos scores a lo largo de la cadena de aminoácidos; de 50 a 80 scores en las posiciones ~60 a ~160 y menos de 40 scores en las posiciones ~65 a la posición ~165 y de la ~30 a la posición ~105.

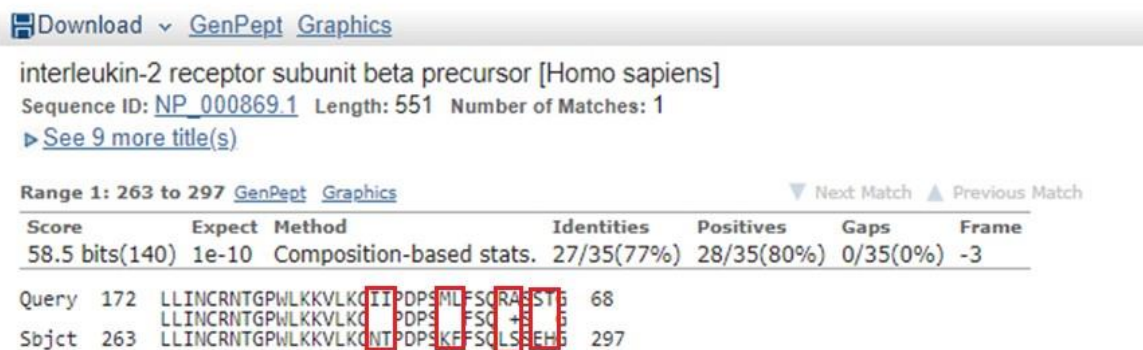


Figura 26: Aminoácidos traducidos por la secuencia obtenida con el primer etiquetado con el primer "IL-2R β right". Se observa, resaltados en rojo cambios en las posiciones, 281, 282, 287, 288, 292, 293, 295 y 296.

Al igual que en el caso anterior, es posible observar algunos cambios en la cadena de aminoácidos. Esta secuencia abarca de las posiciones 263 a 297 de la proteína, comenzando por el hecho de que la leucina del inicio no entra en el marco de lectura de los aminoácidos que traducen para la expresión de la proteína IL-2R β . En las posiciones 281 y 282, dos isoleucinas cambian por una asparagina y una treonina. Por otro lado en las posiciones 287 y 288, una metionina y una leucina son sustituidas por leucina y fenilalanina respectivamente. En la posición 292, una leucina sustituye a una arginina e inmediatamente después, en la posición 293, una serina reemplaza a una alanina. Por último, en las posiciones 295 y 296 un ácido glutámico y una histidina sustituyen a una serina y a una treonina.

Repetición de secuencias purificadas obtenidas con PCR

Se realizaron dos repeticiones del experimento, las cuales fueron secuenciadas los días 11 de Enero del 2019 y 24 de Enero del 2019 respectivamente, bajo las mismas condiciones, obteniendo los siguientes resultados. Para la cadena secuenciada con el primer etiquetado como "IL-2R β left" el día 11 de Enero de 2019 se obtuvieron los siguientes cromatogramas, en los cuales se observa una gran cantidad de secuencias interferentes a lo largo del amplicón a diferencia de la primera vez en que las mismas muestras fueron secuenciadas, sin tener siquiera un codón de inicio o un codón de terminación.

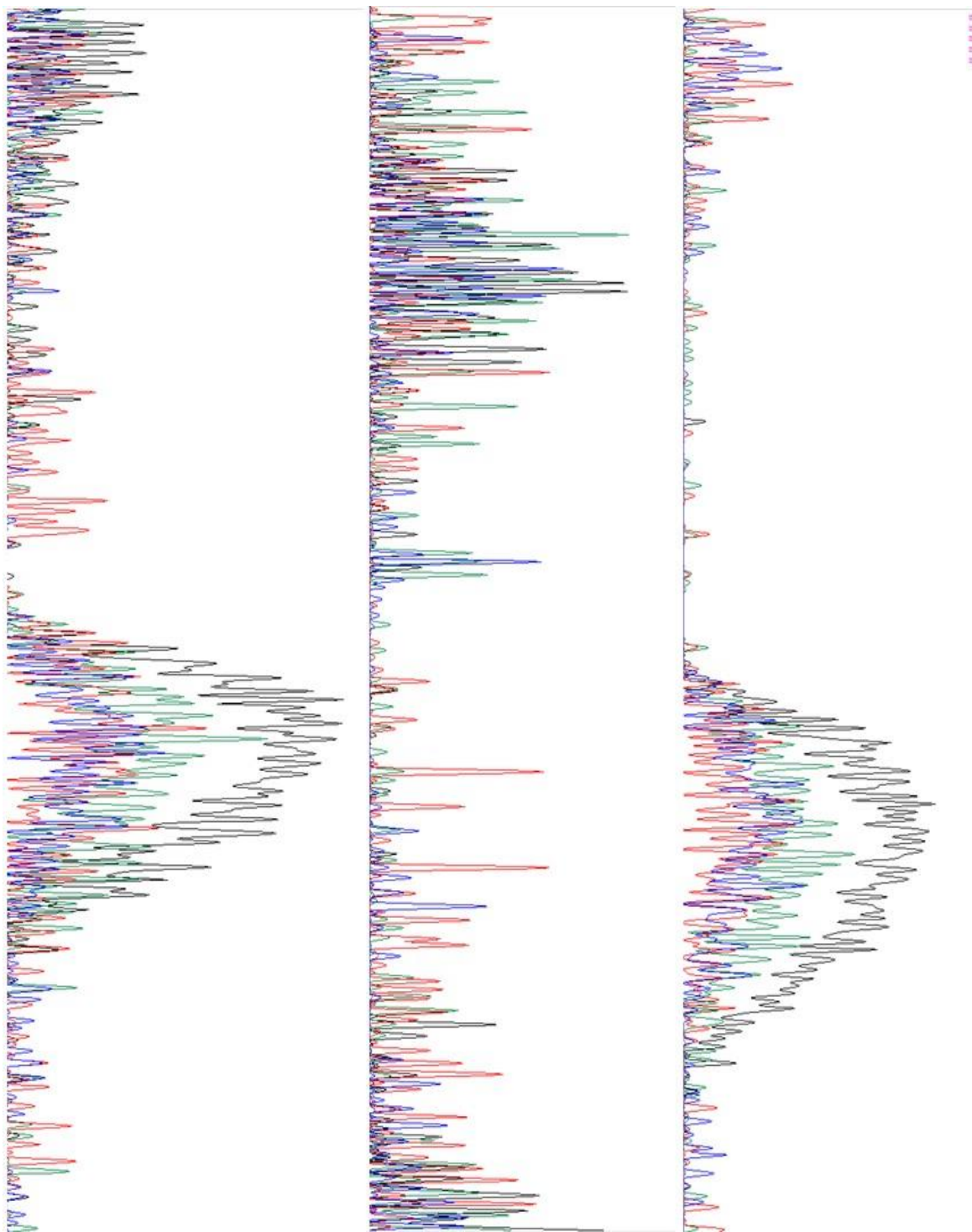


Figura 27: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β left". Repetición del día 11/01/2019. A la derecha, se observa el inicio de la secuencia, donde se aprecia una gran cantidad de secuencias interferentes desde el inicio de la misma. Al centro, se observa la continuación de la secuencia. A la izquierda se muestra la tercera parte de la secuencia.

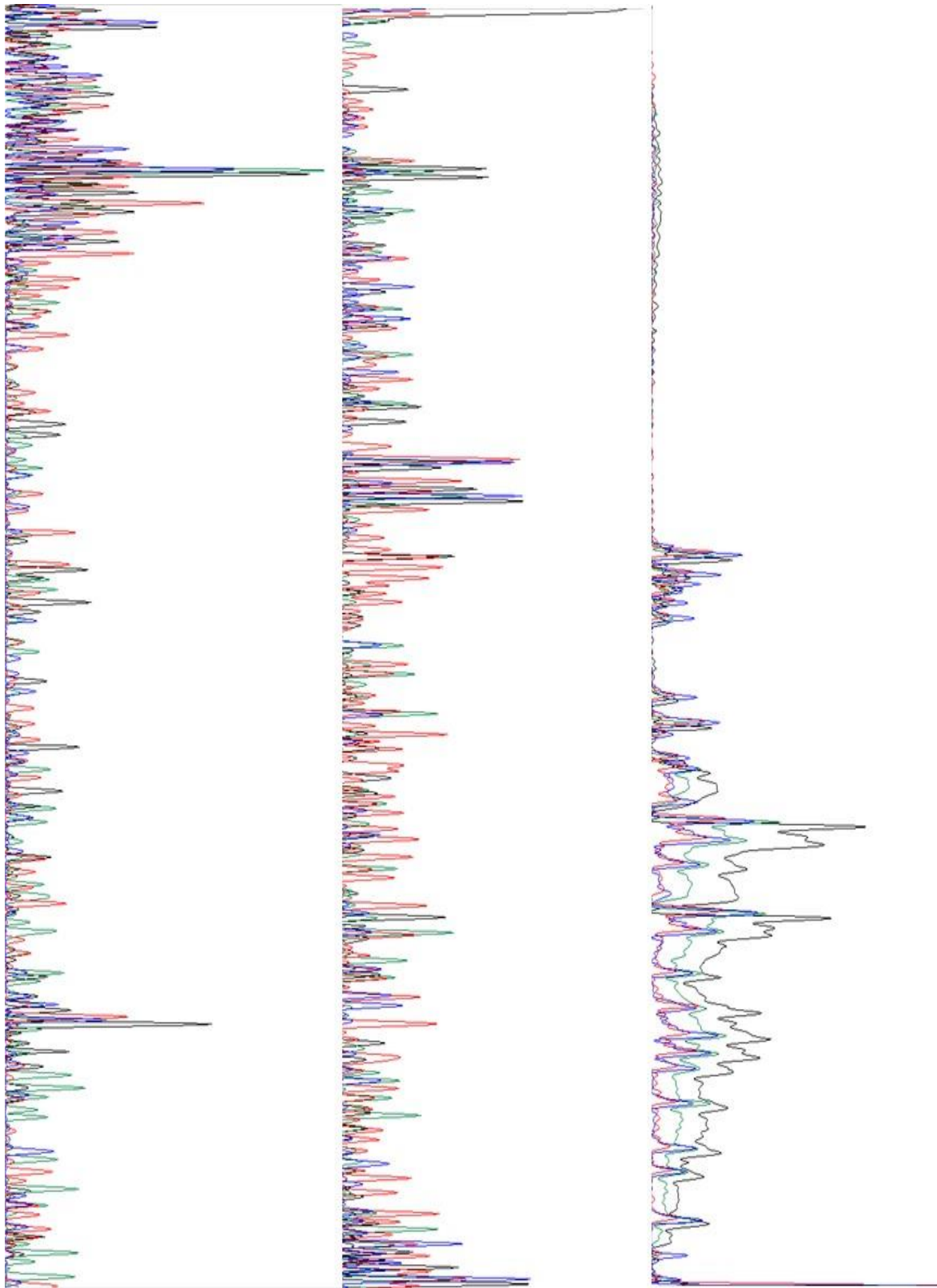


Figura 28: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β left". Repetición del día 11/01/2019 (Continuación). A la derecha, al centro y a la izquierda se observa la continuación de la secuencia, donde se observa secuencias interferentes en toda la secuencia.

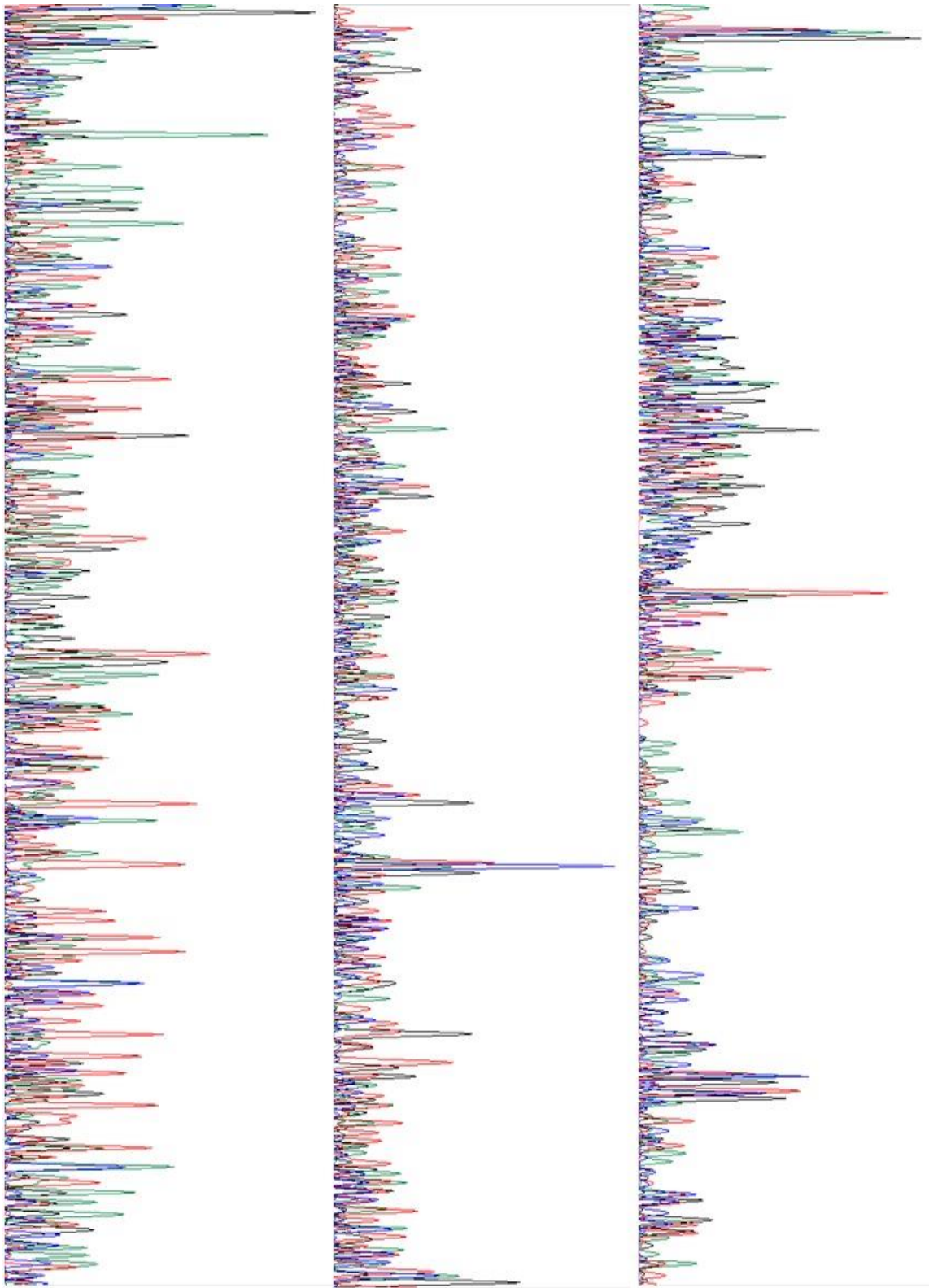


Figura 29: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β left". Repetición del día 11/01/2019 (Continuación). A la derecha, al centro y a la izquierda se observa la continuación de la secuencia, donde se observa secuencias interferentes en toda la secuencia.

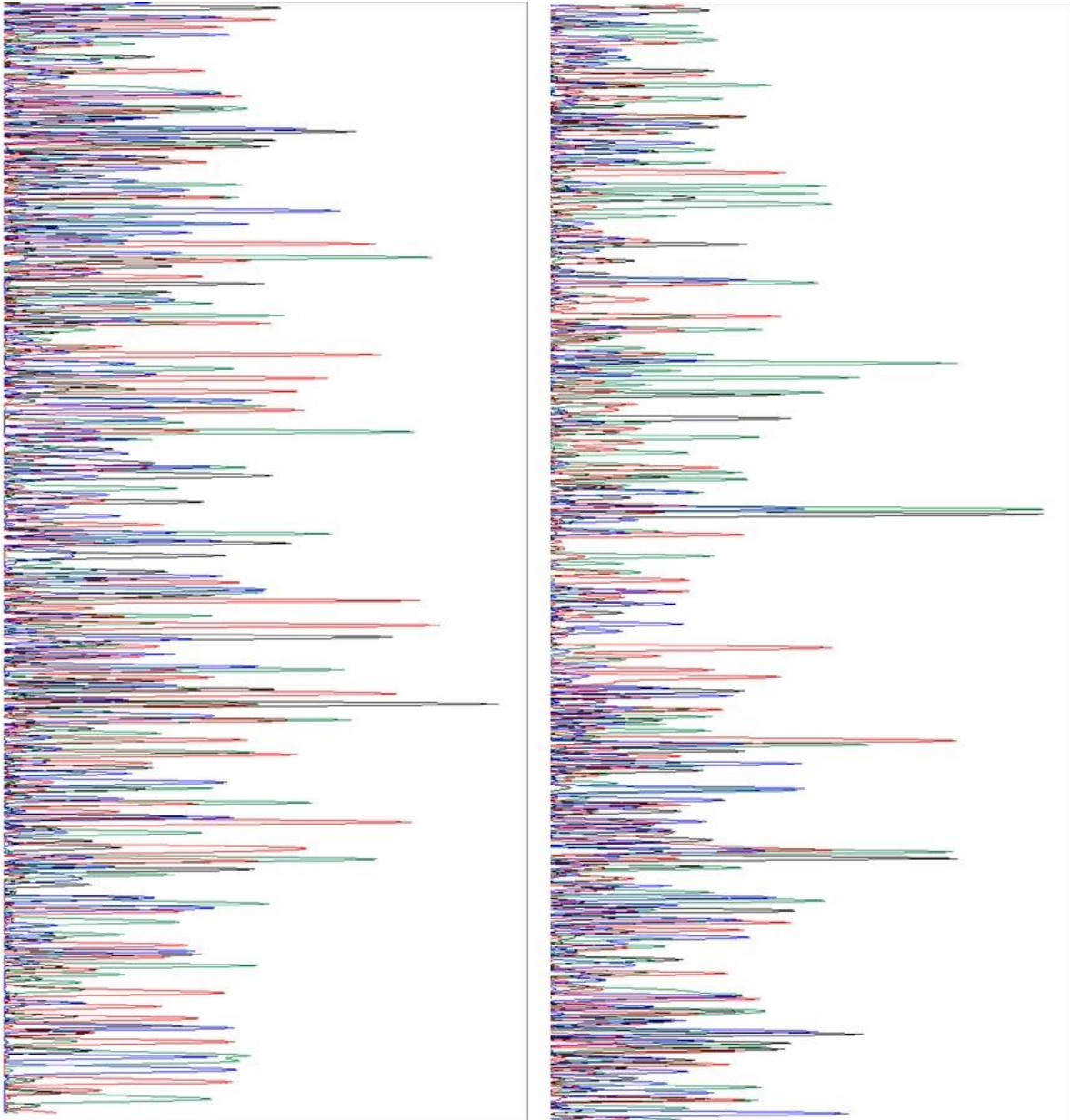


Figura 30: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β left". Repetición del día 11/01/2019 (Continuación). A la derecha, e izquierda se observa la continuación de la secuencia, donde se observa secuencias interferentes en toda la secuencia hasta su final.

De igual forma, la cadena secuenciada con el primer etiquetado como "IL-2R β right" secuenciado el día 11 de Enero de 2019 muestra una gran cantidad de secuencias interferentes a lo largo de toda la cadena, tal y como ilustran los siguientes cromatogramas, donde al igual que con el primer "IL-2R β left" se aprecia la ausencia de codones de inicio y de terminación.

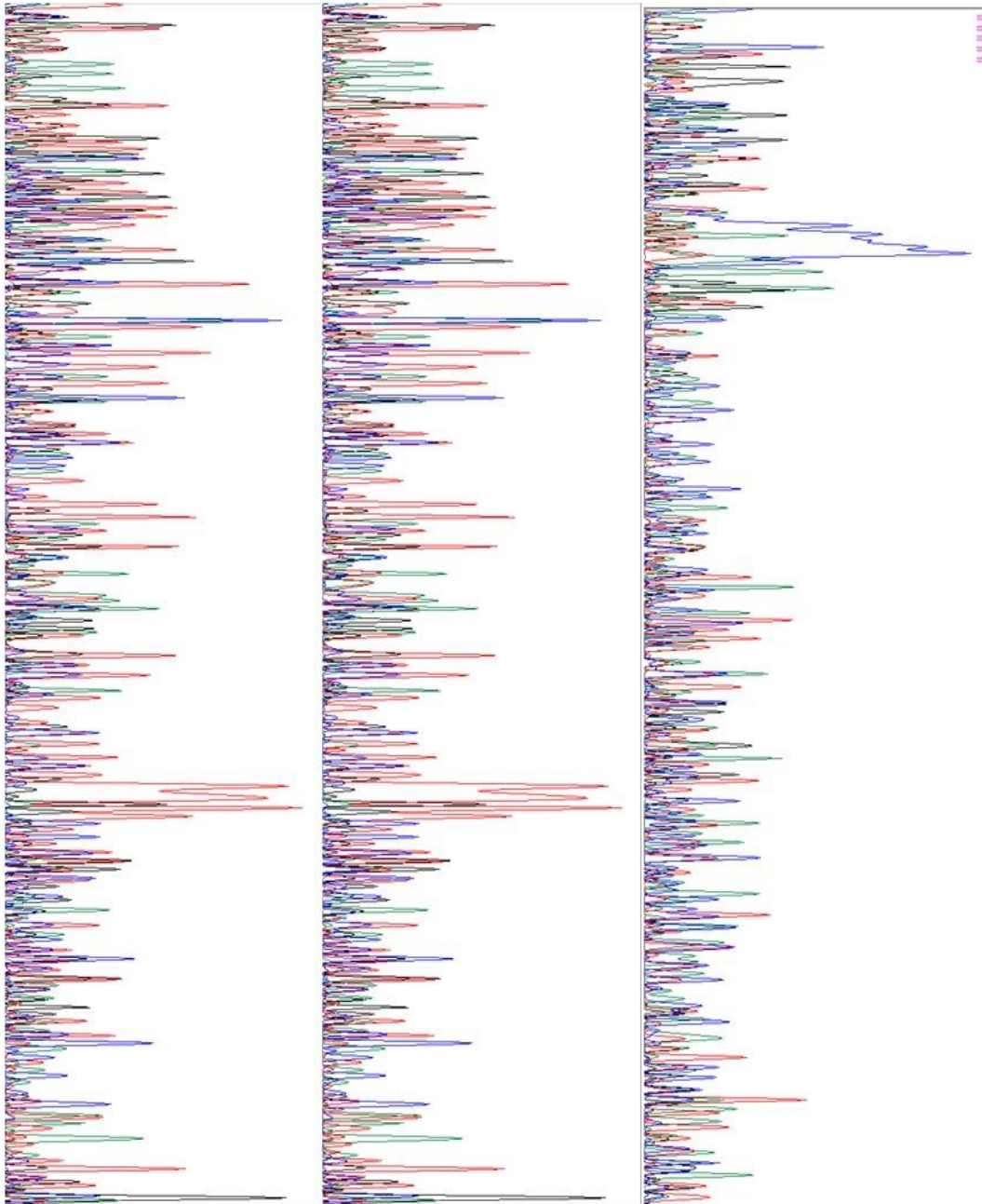


Figura 31: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer "right". Repetición del día 11 de Enero de 2019. A la derecha, se observa el inicio de la secuencia con una gran cantidad de secuencias interferentes, que continúan al centro y posteriormente a la izquierda, en la segunda y tercera parte del cromatograma.

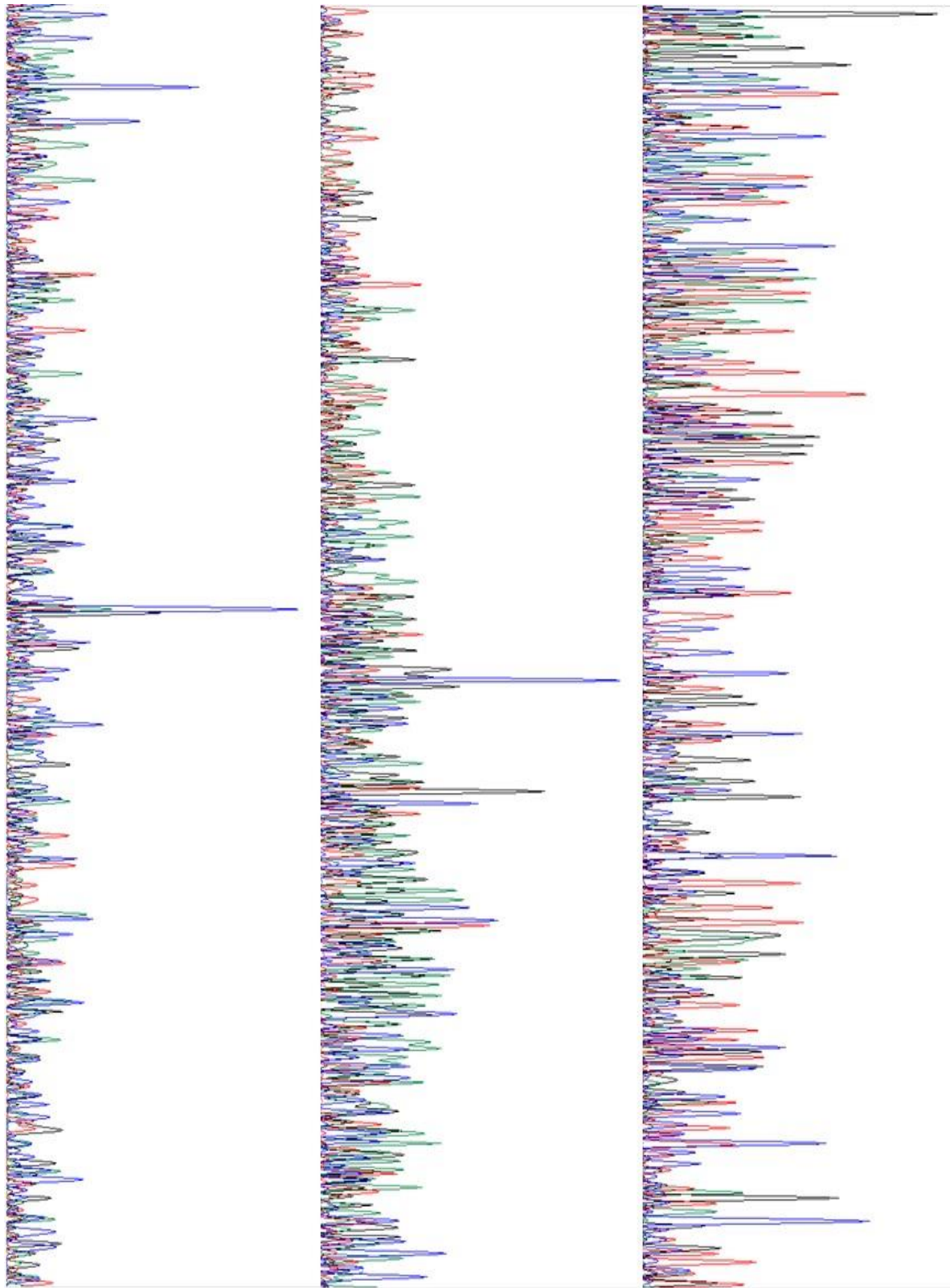


Figura 32: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer "right". Repetición del día 11 de Enero de 2019. A la derecha, en la continuación de la figura anterior se observa una gran cantidad de secuencias interferentes, que continúan al centro y posteriormente a la izquierda del cromatograma.

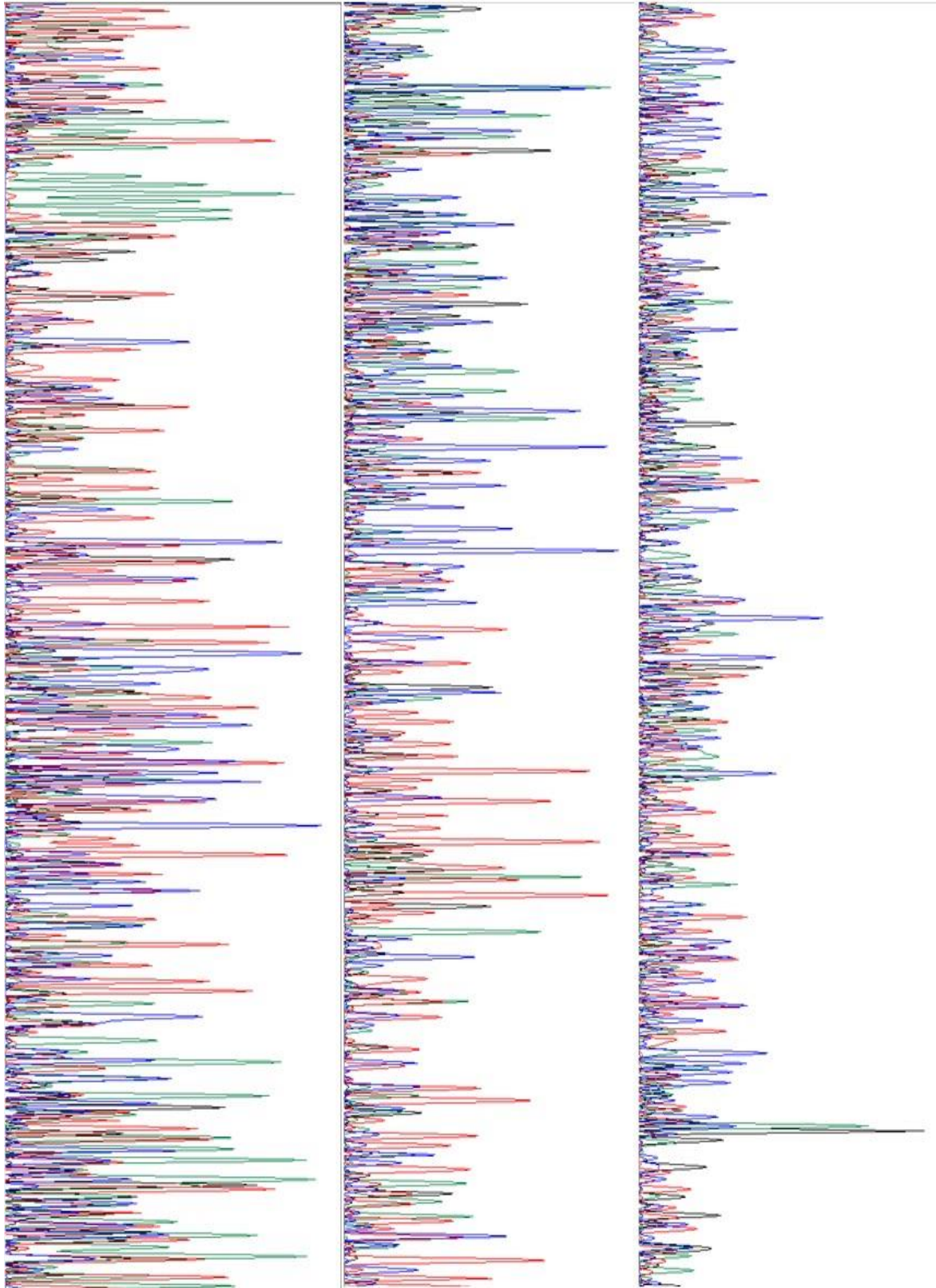


Figura 33: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer "right". Repetición del día 11 de Enero de 2019. A la derecha, en la continuación de la figura anterior se observa una gran cantidad de secuencias interferentes, que continúan al centro y posteriormente a la izquierda del cromatograma.

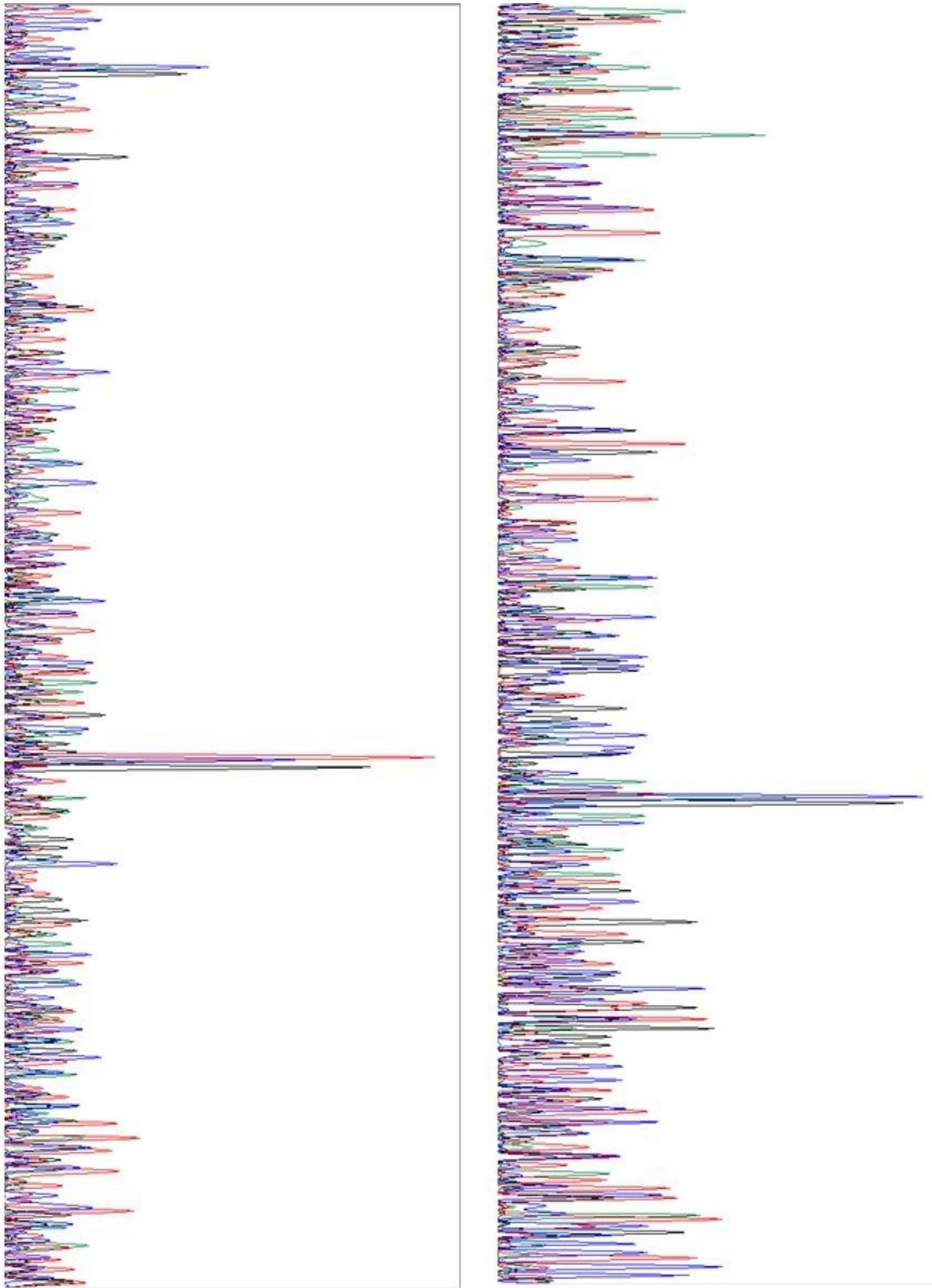


Figura 34: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer "right". Repetición del día 11 de Enero de 2019. A la derecha, en la continuación de la figura anterior se observa una gran cantidad de secuencias interferentes, que continúan a la izquierda del cromatograma.

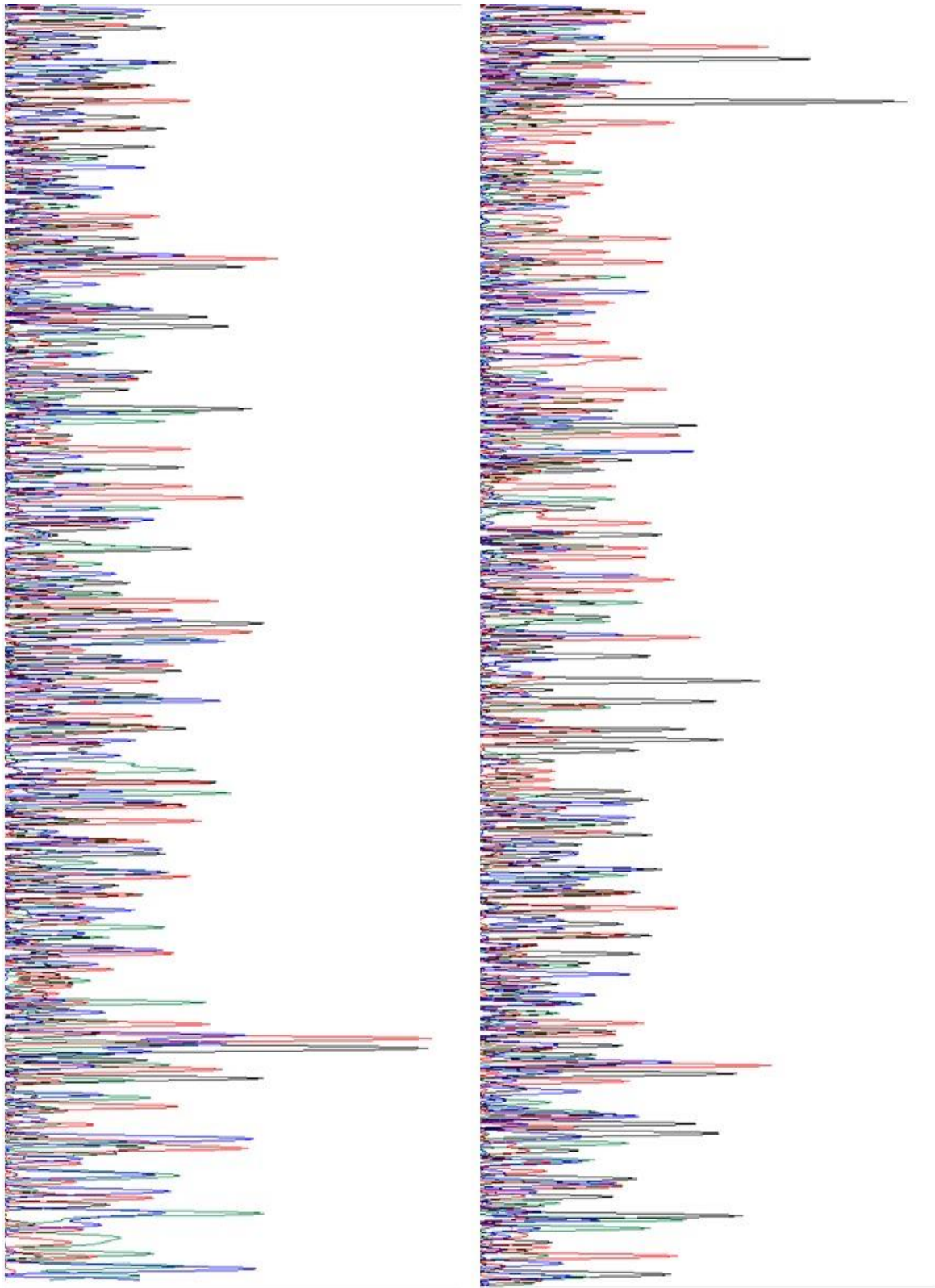


Figura 35: Cromatogramas que muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer "right". Repetición del día 11 de Enero de 2019. A la derecha, en la continuación de la figura anterior se observa una gran cantidad de secuencias interferentes, que continúan a la izquierda hasta el final del cromatograma.

Posteriormente, se secuenciaron los productos de PCR una vez más el día 24 de Enero del 2019. En donde, únicamente la cadena secuenciada con el primer etiquetado como "IL-2R β right" arrojó resultados satisfactorios que se muestran en los siguientes cromatogramas, iniciando de manera no muy fina con el codón GCC, volviéndose más estable conforme la secuenciación progresa hasta detenerse en el codón AGC. La señal de fluorescencia continúa después del codón de terminación, mostrando una gran cantidad de secuencias interferentes a lo largo del amplicón.

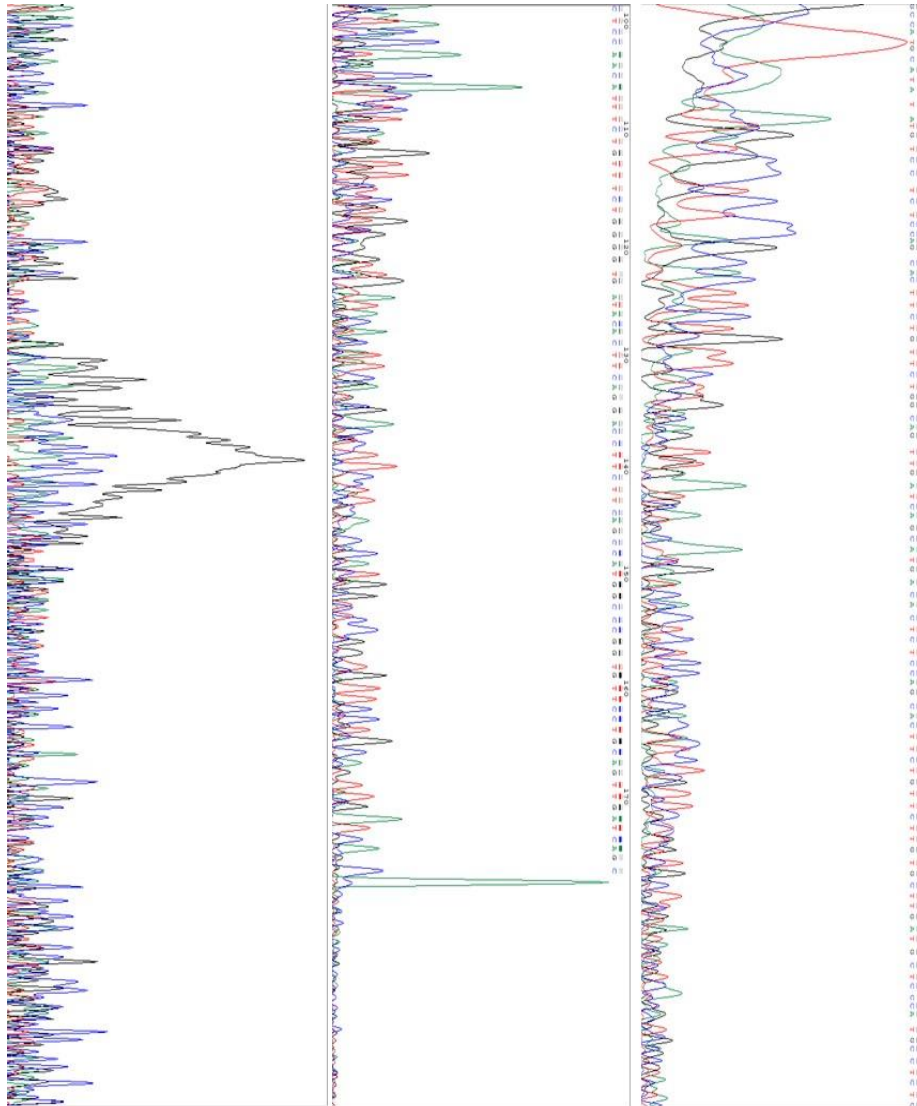


Figura 36: Cromatograma que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de IL-2R β secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β right". Repetición del día 24 de Enero del 2019. Se aprecia a la derecha el inicio de la secuencia con las bases nitrogenadas que la conforman, secuencia que continúa en la figura del centro y posteriormente a la izquierda, donde termina de manera brusca dando lugar a un gran conjunto de secuencias interferentes como las observadas en el experimento del día 11 de Enero.

Análisis de las repeticiones de secuenciación con BLAST

Como se aprecia en las repeticiones de la secuenciación de los días 11 y el 24 de Enero del 2019 se puede observar que el transcrito secuenciado el día 24 de Enero y etiquetado como “IL2Rβ right” fue el único de las dos muestras del cual se obtuvo una secuencia satisfactoria, esto debido que cuando fue secuenciado ya llevaba aproximadamente tres meses almacenado. Al analizar dicha secuenciación con la herramienta BLAST se obtuvieron los resultados siguientes.

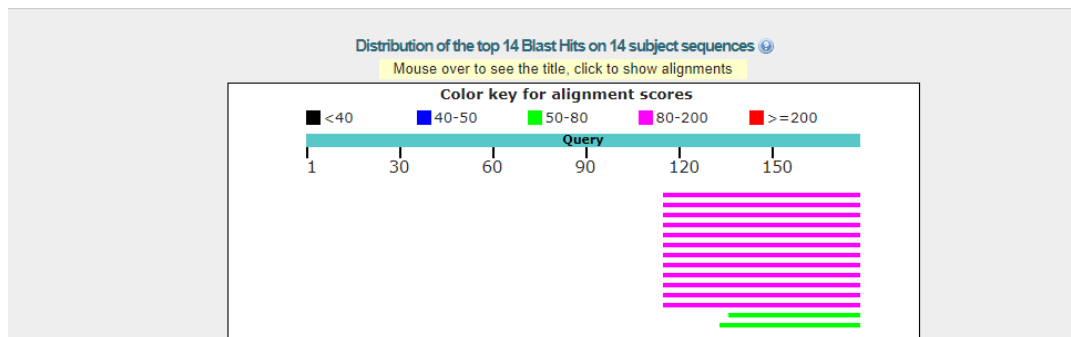


Figura 37: Cantidad de scores presentes en la cadena secuenciada con el primer etiquetado como “IL-2Rβ”. Repetición del día 24 de Enero del 2019. Se logra observar que en las posiciones ~120 a ~150, el transcrito presenta alrededor de 80 a 200 scores, mientras que en las posiciones ~130 a ~150 presenta de 50 a 80 scores.

La figura anterior muestra la cantidad de homologías encontradas en la proteína traducida por la secuencia que se obtuvo por PCR. Se muestran de 80 a 200 alineamientos en las posiciones 120 a la posición 150 y de 50 a 80 alineamientos en las posiciones 130 a 150.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 1, mRNA	111	111	35%	2e-22	98%
Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 3, mRNA	111	111	35%	2e-22	98%
Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 2, mRNA	111	111	35%	2e-22	98%

Figura 38: Porcentaje de homología del producto secuenciado con el primer etiquetado como “IL-2Rβ”. Se observa un 98% de homología de nuestro transcrito con la secuencia correspondiente a la variante 1 del IL-2Rβ humano, al igual que para la variante 3 y la variante 2, con un total de 11 scores en cada una de ellas.

La figura anterior muestra el porcentaje de homología comparando el transcrito obtenido con la secuencia reportada en la base de datos de la herramienta BLAST. El transcrito corresponde a un 98% con el mRNA que traduce para la variante 3 del IL-2Rβ humano con un total de 11 scores.

Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 1, mRNA
 Sequence ID: [NM_000878.5](#) Length: 4034 Number of Matches: 1

Range 1: 914 to 976 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
111 bits(60)	2e-22	62/63(98%)	0/63(0%)	Plus/Minus
Query 115	TCTGGGGTGATACACTTCAGGACCTTCTTCAGCCATGGCCCGGTGTTCTGCAGTTGATC	174		
Sbjct 976	TCTGGGGTGTTACACTTCAGGACCTTCTTCAGCCATGGCCCGGTGTTCTGCAGTTGATC	917		
Query 175	AGC 177			
Sbjct 916	AGC 914			

Figura 39: Cambios encontrados en el transcrito reportado para la variante 3 del mRNA de la IL-2Rβ en comparación a la secuencia obtenida con el primer etiquetado como "IL-Rβ right". Se aprecia un cambio en la posición 267.

En esta repetición se puede apreciar que hay algunos cambios en la secuencia de mRNA que traduce para la expresión del IL2-Rβ. Por ejemplo, se puede observar el cambio de una adenina por una timina en la posición 967.

Al introducir el transcrito en BLAST, como secuencia de aminoácidos transcrita se puede comprobar de igual forma que efectivamente el transcrito pertenece a la variante 1 del IL2R-β, como se muestra a continuación.

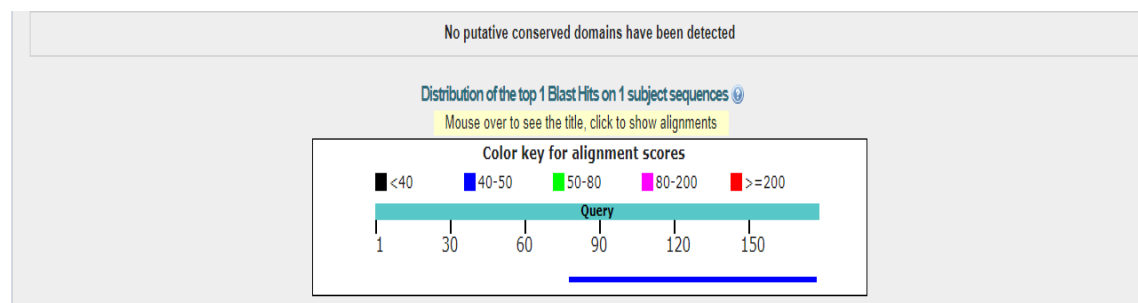


Figura 40: Distribución de scores en la secuencia de aminoácidos del transcrito obtenido a través de PCR, secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2Rβ right" de la repetición del día 24 de Enero del 2019. Se aprecian de 40 a 50 scores en las posiciones ~80 a ~180 de la cadena de aminoácidos.

Download v GenPept Graphics

interleukin-2 receptor subunit beta precursor [Homo sapiens]

Sequence ID: [NP_000869.1](#) Length: 551 Number of Matches: 1

[▶ See 9 more title\(s\)](#)

Range 1: 264 to 296 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
47.0 bits(110)	6e-07	Composition-based stats.	21/33(64%)	23/33(69%)	0/33(0%)	-2
Query	176	LINCRNTGPWLKKVLKICITPETEMLERHGSIKH	78			
		LINCRNTGPWLKKVLK TP+	S +H			
Sbjct	264	LINCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSLSSEH	296			

Figura 41: Cambios en la cadena de aminoácidos del transcrito secuenciado con el primer etiquetado como "IL-2R β right". Se aprecian cambios en la cadena de aminoácidos en las posiciones 281, 284, 285 a 292, 294 y 295.

En la repetición del transcrito obtenido a partir de la secuencia de mRNA con el primer etiquetado como "IL-2R β right" también es posible observar cambios en la secuencia de aminoácidos. Se aprecia un cambio de una asparagina por isoleucina en la posición 281, así como la adición de un ácido aspártico en la posición 284 y los cambios consecutivos prolina por treonina, de una serina por un ácido glutámico, de una lisina por una metionina, de una fenilalanina por una leucina, de una fenilalanina por un ácido glutámico, de una serina por una arginina, de una glutamina por una histidina y de una leucina por glicina en las posiciones 285 a 292. Posteriormente, una serina por una isoleucina en la posición 294 y la adición de un ácido glutámico en la posición 295.

Exons An exon Another exon Residue overlaps splice site

Markup loaded

● Variants are filtered by consequence type

```
MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDQALQDTSCQ
VHAWPDRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTIVDIVTLRVLCREGVVRVMA
IQDFKPFENLRMLAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEE
APLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT
IPWLGHLLVGLSGAFGFIIILVYLLINCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSLSSEHGGDV
QKWLSSPFPSSSFPSPGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLSCT
NQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCT
FPSRDDLLLFSPSLLGGSPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVP
DLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQ
ELQGQDPHTLV
```

Figura 42: Comparativa entre la secuencia de aminoácidos obtenida en BLAST y la secuencia de aminoácidos previamente reportada. Tal y como se muestra, la secuencia obtenida coincide con exactitud con la secuencia de aminoácidos previamente reportada, a pesar de los cambios encontrados, lo que sugiere se trata de cambios que no afectan a la estructura y por tanto a la funcionalidad de la proteína.

Comparando la secuencia obtenida con la secuencia de aminoácidos reportada como típica para el IL-2R β se obtiene que coincide aminoácido a aminoácido sin ningún cambio significativo con la secuencia reportada previamente en la base de datos, tal y como se muestra en la imagen anterior.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En este trabajo, se obtuvo un producto de 207 pares de bases de longitud, ubicado en una pequeña parte del intrón 8 y el intrón 9, así como una pequeña parte del intrón 10, desde la posición 988 hasta la posición 1193 del gen que traduce para dicha proteína, tal y como lo esclareció el análisis en la plataforma Ensembl (Ensembl, 2018), siendo la siguiente secuencia de nucleótidos el producto obtenido:

```
5' GCTGATCAACTGCAGGAACACCGGGCCATGGCTGAAGAAGGTCCTGAAGTGTAACACCCC
AGACCCCTCGAAGTTCTTTTCCCAGCTGAGCTCAGAGCATGGAGGAGACGTCCAGAAGTG
GCTCTCTTCGCCCTTCCCCTCATCGTCCTTCAGCCCTGGCGGCCTGGCACCTGAGATCTC
GCCACTAGAAGTGCTGGAGAGGGACA 3'
```

Se comprobó que la secuencia obtenida, por PCR, corresponde a la cadena beta del receptor para Interleucina-2 (IL-R β) en la línea de Carcinoma de Cérvix INBL. El producto de PCR fue secuenciado y después analizado en una base de datos. El análisis dando como resultados que el producto traducido corresponde a la variante 3 del mRNA del IL2R β con una homología de más de 90%. Éste análisis mostró algunas variaciones en la región secuenciada, que después de ser analizadas resultaron ser típicas de la misma. No obstante, también se evidenció que existen variaciones que aún no están reportadas como típicas en regiones que se encuentran localizadas fuera del marco de lectura de la secuencia de interés, esto último debido probablemente a errores en la secuenciación o que pudieron presentarse desde la PCR.

La cadena β del receptor para Interleucina-2 es de vital importancia para linfocitos T, linfocitos B, células NK y monocitos, aunque también se ha descrito su presencia en leucemias, esto debido a que al expresarse junto con la cadena α y unirse con su ligando (IL-2), desencadena una cascada de señalización que induce la proliferación en las células que expresan el receptor. Se ha confirmado la presencia de la subunidad α de este receptor en cultivos de células escamosas de cáncer, en biopsias de tumores de este tipo y queratinocitos (Weidmann, et al., 1992). Por su parte, Yasumura y colaboradores demostraron, mediante RT/PCR que las subunidades β y γ de este receptor están presentes en células de carcinoma escamoso de mama, que contribuyen a la señalización tanto negativa como positiva sobre las células que expresan estas dos cadenas, sin estar esclarecida (Yasumura, et al., 1994). En 1997 Alvarado, demuestra la presencia de la cadena β del IL2R- β en dos líneas celulares de Carcinoma de Cérvix asociadas a HPV (CALO e INBL), aclarando la participación de la IL-2 para inducir la proliferación de éstas células (Alvarado, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que las células de carcinoma de cérvix asociadas a HPV modifican la expresión de otras moléculas en su membrana, como el IL-2R, moléculas ICAM-1 y clase 1 del MHC. Asimismo, se ha observado que en estadios clínicos avanzados, las células de carcinoma de cérvix expresan un pseudoreceptor de alta afinidad con el que pueden utilizar la IL-2 secretada por Linfocitos T Citotóxicos. También muestran una

disminución en la expresión de antígenos de clase II en presencia de IL-2, para evitar ser reconocidas por células del sistema inmunitario. El aumento de la expresión de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) les permite adquirir la capacidad de invadir otros órganos (Rodríguez, 1999). Igualmente se ha demostrado la presencia de las cadenas β y γ del IL-2R en líneas celulares de Carcinoma de Cérvix asociadas a HPV (Rocha, et al., 2004). En 2010 Rangel y colaboradores aclaran el papel del IL-2R en células de Carcinoma de Cérvix y propone que el IL-2R presente en las líneas INBL y CALO funciona como un factor autócrino de proliferación de manera similar al papel que desempeña en las células de tipo linfoide (Rangel, et al., 2010).

Comparando los cambios observados en la secuencia original, de la cadena beta del RIL-2, reportada en Ensembl (Ensembl, 2018), es posible apreciar que los cambios en las posiciones 918, 974 y 977 no se encuentran dentro del rango del amplificado, esto probablemente se debe a errores que puede llegar a cometer la enzima transcriptasa al adherir los nucleótidos a la secuencia molde (Oliva, et al., 2004). Por su parte, en la posición 918 está reportado que puede presentarse una citosina, en la posición 974, se reporta una mutación “sinsentido”, mientras que en la posición 977 se encuentra de manera normal una timina. Por otra parte, los cambios que están en las posiciones 992 y 996 pueden prestarse a sinonimias, mientras que el cambio en la posición 1004 puede prestarse también una mutación “sinsentido”. Por otro lado, la citosina que cambia por adenina en la posición 1006, genera un cambio por una base sinónima, que no afectaría la traducción de la proteína. Los cambios en las posiciones 1013, 1014 y 1015 no se encuentran reportados, al igual que aquellos que se encuentran en las posiciones 1006, 1007 y 1027. Por último, el cambio que se encuentra en la posición 1128 se puede prestar a mutaciones “sinsentido”; este tipo de mutaciones dan lugar a un codón de terminación, como puede ser UGA, UAG y UAA, lo que provoca que la traducción de la proteína resultante termine antes de lo esperado, situación que puede derivar en una proteína más corta y no funcional (Biesecker, s.f.). Sin embargo, como se puede observar en la figura 19, esto no ocurre, por lo que la funcionalidad de la proteína no se ve afectada.

Se sabe que la cadena beta del receptor para Interleucina-2 (IL-2R β) es una proteína de 551 aminoácidos con la siguiente estructura:

```
MAAPALSWRLPLLILLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRW
NQTCCELLPVSQASWACNLILGAPDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMAPISLQVVH
VETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGE
FTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIIIVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFS
QLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGY
FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLGGPS
PPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPGLGPPTGVPDLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVS
FPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV
```

Proteína dividida en distintos dominios de acuerdo a la estructura que presenta el receptor. Estos dominios, según la base de datos UNIPROT (UNIPROT, 2018) son los siguientes:

Dominio topológico. Que abarca las posiciones 27-240. Se encuentra de manera extracelular.

AVNGTSQFTCFYNSRANISCVWSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILGAPDS
QKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRMLAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFE
ARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTKPAALGKDT

Un dominio transmembrana, del cual ya se había hablado en la sección de resultados, el cual abarca de las posiciones 241-265 con estructura helicoidal.

IPWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLI

Un dominio topológico, mencionado en la sección de resultados. Ubicado en las posiciones 266-551. Es un dominio citoplasmático.

NCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQ
QDKVPEPASLSSNHSALTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQPLSG
EDDAYCTFPSRDDLLLFPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPGLPPTPGVPDLVDF
QPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV

Al analizar la posible traducción obtenida del DNA amplificado y secuenciado se obtuvo una coincidencia de más del 90% con la cadena de aminoácidos del IL-2R β en su región transmembrana y una parte de su región citoplasmática, porcentaje que al no ser del 100% sugiere que existen cambios en la proteína y que probablemente afecten la conformación de la misma, dando como resultado una alteración en la cascada de señalización que desencadena este receptor (Rocha, et al., 2004). Posiblemente esta diferencia se debe a la presencia de mutaciones en la subunidad beta (β) de tal manera que puede activar o inhibir cinasas diferentes.

No obstante, al comparar la cadena de aminoácidos que resulta de traducir la secuencia que se amplificó mediante PCR en una base de datos, se obtiene que la secuencia obtenida es la secuencia típica reportada para la variante 3 del transcrito de mRNA de dicha proteína.

Al empalmar ambos resultados, se obtiene una secuencia completa de aminoácidos, la cual coincide con la secuencia que se esperaba obtener en un inicio sin cambio alguno a pesar de lo observado con anterioridad, adicionando cuatro aminoácidos (marcados en rojo) como ya se ha indicado, que a pesar de no entrar en el marco de lectura de la secuencia amplificada, sí forman parte de este receptor:

263

LLINCRNTGPWLKKVLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVT

345

Como ya se ha mencionado, de acuerdo a (UNIPROT, 2018), el amplificado obtenido traduce para los dominios transmembrana y una parte del dominio citoplasmático de la proteína en su variante 3, la cual según la base de datos Gene (National Center for Biotechnology Information, 2018), a pesar de traducir para la misma proteína al igual que las variantes 1 y 2, posee un exón alternativo en el extremo 5' UTR y representa el uso de un promotor de repetición largo (LTR) en sentido ascendente y una secuencia de exones que da como resultado una expresión placentaria específica.

Lo anterior nos permite explicar que no existe un cambio que resulte significativo en la secuencia del dominio transmembrana del IL-2R β , lo que indica que no existen modificaciones en su estructura y por lo tanto en la vía de señalización que media esta subunidad. Sin embargo, estos resultados nos llevan a especular sobre la presencia de mutaciones en otras regiones de la secuencia, como pueden ser aquellas que traducen para los dominios citoplasmático y extracelular, los cuales podrían provocar cambios en la conformación del receptor así como en la manera en la que se une con su ligando.

CONCLUSIONES

A través de la secuenciación de un producto de PCR para IL-2R β , fue posible identificar que este corresponde a un fragmento de la secuencia que traduce para la expresión de la variante 3 del IL-2R β humano, con mayor exactitud a un fragmento que traduce para la expresión de la región intermembrana y un fragmento de la región citoplasmática de dicho receptor. El posterior análisis de esta secuencia con una base de datos arrojó como resultado que no existen cambios significativos en dicha secuencia que pudiera alterar la traducción de la proteína en comparación con la estructura presente en las células T. Por tanto, proponemos que la región del receptor que probablemente presente los cambios que alteran su funcionalidad y permiten la proliferación de las células de Carcinoma de Cérvix, se encuentren en la región citoplasmática, ya que es ahí desde donde se desencadena la cascada de señalización que induce la proliferación de este tipo de células.

PERSPECTIVAS

Caracterización completa del genoma del receptor para IL-2 en células de Carcinoma de Cérvix para poder conocer la ubicación exacta de la alteración que produce esta anomalía, para dilucidar la relación de este receptor linfoide y el Carcinoma de Cérvix.

REFERENCIAS

Abbas, A. & Litchman, A. & P. S., 2015. *Inmunología celular y molecular*. Octava ed. Barcelona: Elsevier España.

Acosta, J., 2012. *Estudio de estabilidad in vivo en ratones atímicos de la cepa nunu de un producto antineoplásico conformado por IL-2 en un sistema nanoacarreador*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

ACS, 2014. *Cáncer de cuello uterino (cervical): American Cancer Society*. [En línea]

Available at: <http://www.cancer.org>

[Último acceso: Septiembre 2018].

ACS, 2016. *¿Qué es el cáncer?: American Cancer Society*. [En línea]

Available at: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>

[Último acceso: Septiembre 2018].

Aguilar, E., 2014. *Dilucidación de la vía apoptótica ejercida por IL-2 en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Aguirre, M., Quintana, R. & Brandan, N., 2002. Citoquinas. En: *Cátedra de Bioquímica*. Chaco: Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Química, pp. 1-3.

Albertson, D., 2006. Gene amplification in cancer. *Trends in genetics*, 22(8), pp. 447-455.

Alvarado, J., 1997. *Presencia de la cadena alfa y beta para Interleucina-2 (RIL-2) en células tumorales de Carcinoma Cérvico Uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por Interleucina-2 (IL-2) en estas células tumorales: Un posible mecanismo de escape inmunológico*. México, D. F.(México, D. F.): s.n.

American Cancer Society, 2018. *Do we know what causes Cervical Cancer?*. [En línea]

Available at: <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/causes-risks-prevention/what-causes.html>

[Último acceso: Noviembre 2018].

Batista Duharte, A., 2003. *Función del sistema inmune en defensa contra tumores malignos: Biblioteca Virtual en Salud*. [En línea]

Available at: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_2_03/san11203.htm

Biesecker, L., s.f. *National Human Genome Research Institute*. [En línea]

Available at: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Mutacion-sin-sentido>

[Último acceso: 20 Septiembre 2019].

Brandan, N., Aquino, J. & Codutti, A., 2007. Respuesta inmunitaria. *Cátedra de Bioquímica*, p. 8.

Bray, F. et. al. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A cancer Journal for Clinicians*, 12 Septiembre, 00(00), pp. 1-31.

- Cancer Quest, 2018. *Cancer Quest: Mutación*. [En línea]
Available at: <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/mutacion>
[Último acceso: Diciembre 2018].
- Coussens, L. & W. Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, pp. 860-867.
- Ensembl, 2018. *Ensembl*. [En línea]
Available at: <http://www.ensembl.org>
- González, M., Arteaga, M., Ruíz, A. & Weir, J., 2007. Interleucina 2 y su receptor soluble en cirugía. *Revista Cubana de Cirugía*, pp. 1-8.
- Grivennikov, S., Florian, G. & Michael, K., 2010. Immunity, Inflammation and Cancer. *Cell*, pp. 883-899.
- Hanahan, D. & Weinberg, R., 2011. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, pp. 646-674.
- Herrington, M., 2018. Nonsense mutation and Supression. *John Wiley & sons*, pp. 1-10.
- Liou, G.-Y. & S. P., 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radicals Research*, pp. 1-31.
- Ly, P. S. C. D., 2017. Interrogating cell division errors using random and chromosome-specific missegregation approaches. *Cell Cycle*, pp. 1252-1258.
- Mitchell, T. & J. S., 2005. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology*, pp. 301-312.
- Mitch, L., 2017. Cervical cancer analysis reveals new mutations. *Cancer Discovery*, p. 344.
- National Cancer Institute, 2018. *National Cancer Institute*. [En línea]
Available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/somatic-mutation>
[Último acceso: Diciembre 2018].
- National Cancer Institute, 2018. *NCI Dictionary of Cancer Terms: Gene deletion*. [En línea]
Available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/gene-deletion>
- National Center for Biotechnological Information, 2018. *Basic Local Alignment Search Tool*. [En línea]
Available at: <https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>
- National Center for Biotechnology Information, 2018. *Gene: IL2RB interleukin 2 receptor subunit beta [Homo sapiens (human)]*. [En línea]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3560>
- National Center for Biotechnology Information, 2016. *Homo sapiens interleukin 2 receptor subunit beta (IL2RB), transcript variant 1, mRNA*. [En línea].
- National Human Genome Research Institute, 2018. *Talking Glossary of genetic terms: Frameshift mutation*. [En línea]
Available at: <https://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=68>
- National Library of Medicine, 2018. *What is a gene mutations and how gene mutations occur?*. [En línea]
Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation>
[Último acceso: Diciembre 2018].

- O'Connor, C., 2008. Human chromosome translocation and cancer. *Nature Education* , p. 56.
- Oliva, R., Ballesta, F. & Oriola, J. & C. J., 2004. *Genética médica*. Tercera ed. Barceona: Publicacions I Edicions de la Universitat Barcelona.
- Online Medical Investigation Current Research, 2018. *Hereditary Genetics: Current Research*. [En línea] Available at: <https://www.omicsonline.org/scholarly/hereditary-mutation-journals-articles-ppts-list.php> [Último acceso: Diciembre 2018].
- Orr, B., Godek, K. & Compton, D., 2015. Aneuploidy. *Current Biology*, pp. 1-11.
- Pierce, B., 2006. Capítulo 10 - DNA: Naturaleza química de los genes - Estructuras especiales del DNA y del RNA. En: *Genética: Un enfoque conceptual*. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Sao Paulo: Editorial Médica Panamericana, p. 282.
- Pierce, B., 2006. *Genética: Un enfoque conceptual*. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, So Paulo: Editorial Médica Panamericana.
- Pray, L., 2008. Transposons: The jumping genes. *Nature Educaation*, p. 204.
- Rangel, R. et. al. 2010. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, pp. 273-277.
- Rebollo, A. & Silva, A., 1994. Estructura y función del receptor de IL-2. *Revista de Inmunología*, pp. 39-47.
- Rocha, L. et. al. 2004. Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta and gamma chains signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2 , or by exogenous IL-2 via JAK/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling*, pp. 1239-1247.
- Rodríguez, L., 1999. *Presencia del Receptor para IL-2 en Células de Carcinoma de Cérvix: Efecto de la IL-2 sobre la expresión de moléculas ICAM-1 y del complejo mayor de histocompatibilidad*, México, D. F. : Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Ruprecht, K. et. al. 2008. Endogenous retroviruses and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 3366-3382.
- Scott, R. & M. C., 2005. Missense mutations in cancer predisposing genes: Can we make sense of them?. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, pp. 123-127.
- Secretaría de Salud, 2015. *Información Estadística. Estadísticas de cáncer de mama y cáncer cérvicouterino: Secretaría de Salud*. [En línea] Available at: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>
- Sharma, S., Bell, D. & Settleman, J. & H. D., 2007. Epidermal growth factor receptor. *Nature Reviews*, Volumen VII, pp. 169-181.
- Shibuya, H. et al. 1990. The human interleukin-2 receptor β -chain gene: genomic organization, promoter analysis and chromosomal assignment. *Nucleic Acid Research*, pp. 3697-3703.
- UNIPROT, 2018. *UNIPROT*. [En línea] Available at: <https://www.uniprot.org>

Untergssen, A. et. al. 2007. *Primer3Plus*. [En línea]

Available at: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>

[Último acceso: 2016].

Weaver, B. & C. D., 2008. The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell*, pp. 431-433.

Weidmann, E. et. al. 1992. Receptors for Interleukin 2 on Human Squamous Cell Carcinoma Cell Lines and Tumor in situ. *Cancer Research*, pp. 5863-5970.

Wright, A. et. al. 2013. Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer*, pp. 3776-3783.

Yasumura, S. et. al. 1994. Expression of Interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by Interleukin 2. *International Journal of Cancer*, pp. 225-234.