



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE STAT3 EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES PDK1, HIF1 α
Y GLUT1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX EN RESPUESTA AL ESTÍMULO
CON IL-2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO ROJAS MERCADO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHAVEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA
FEZ ZARAGOZA, UNAM

CD. MX.

JULIO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PARTICIPACIÓN DE STAT3 EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES PDK1, HIF1 α
Y GLUT1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX EN RESPUESTA AL ESTÍMULO
CON IL-2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO ROJAS MERCADO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
FES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHAVEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA
FEZ ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.

JULIO, 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
OFICIO CPCB/445/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de abril de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ROJAS MERCADO RODRIGO** con número de cuenta **519020634** con la tesis titulada **“Participación de STAT3 en la regulación de los genes PDK1, HIF1 α y GLUT1 en células de cáncer de cérvix en respuesta al estímulo con IL-2”**, realizada bajo la dirección del **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Secretario: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de mayo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales

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

Al Programa de becas para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado (CVU: 959475)

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (L9 planta baja, UMIEZ) y fue financiado por el CONACYT (proyecto CB253262).

A la Doctora Isabel Soto Cruz por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, así como aconsejarme tanto en lo profesional y lo personal, y estar conmigo a lo largo de todo el camino.

Al comité tutor, Doctora Adriana Gutiérrez Hoya y Doctora Rebeca López Marure, por sus consejos y ayuda en todo momento para poder realizar el proyecto, además de apoyarme para crecer como investigador y persona

Agradecimientos

Al Doctor Arturo Valle Mendiola por los consejos y enseñanzas para realizar mi proyecto en tiempo y forma. Además, de apoyarme tanto moral como profesionalmente.

A la Doctora Carolina Barrientos Salcedo por ayudarme a encontrar el camino y apoyarme profesionalmente y personalmente.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio 9 de la planta baja de la UMIEZ, FES Zaragoza por ayudarme en todo lo que necesite y apoyarme siempre.

Dedicatorias

A mi madre Rosa Esther Mercado Viveros quien nunca ha perdido la fe en mí y siempre ha estado conmigo para levantarme en todos mis tropiezos. Por ser el pilar de mi vida y la mejor amiga que una persona necesita. Por hacerme la persona que soy ahora.

A mi padre Rodrigo Rojas Vázquez por siempre darme una mano de apoyo cuando me desvié del camino y por aconsejarme siempre para ayudarme a crecer tanto personal como profesionalmente. Por ayudar a forjar la persona que soy ahora.

A la Doctora Carolina Barrientos Salcedo por ser otro pilar en mi vida, por ser la persona que me inició en el mundo de la investigación y ayudarme a crecer como persona. Por estar conmigo siempre que la necesité e impulsarme en todos los aspectos de mi vida.

A mi abuela Severiana Viveros García quien me educó y me crio, y aunque ya no está con nosotros todos los días la recordamos y dedicamos nuestros logros a ella.

A mi hermana Romina Lili Rojas Mercado quien siempre ha estado conmigo desde el inicio de mi vida, y por ser el tercer pilar de mi vida. Por crecer juntos como personas y profesionistas.

A toda mi familia y amigos quienes siempre han estado ahí para apoyarme y levantarme cuando lo necesite.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	4
El cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano.....	4
La interleucina 2 y el receptor de interleucina 2.....	8
Vía de señalización JAK-STAT.....	10
STAT3.....	11
Eje central de obtención de energía celular.....	13
Efecto Warburg y reprogramación metabólica.....	16
Factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α).....	18
Cinasa de la piruvato deshidrogenasa (PDK1).....	19
Transportador de glucosa 1 (GLUT1).....	19
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Material y métodos.....	23
Material biológico.....	23
Ensayo de proliferación.....	23
Evaluación de fosforilación de STAT3.....	24
Evaluación de la expresión génica.....	25

Evaluación de la producción de ATP.....	27
Software y análisis estadístico.....	28
Resultados.....	28
Discusión.....	42
Conclusiones.....	52
Perspectivas.....	53
Bibliografía.....	54
Anexos.....	62

Índice de Figuras

Figura 1. Virus del papiloma humano.....	6
Figura 2. Papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular.....	7
Figura 3. Representación esquemática del receptor de IL-2.....	8
Figura 4. Modelo de la vía de señalización de IL-2R.....	9
Figura 5. Papel de STAT3 en la progresión y mantenimiento tumoral.....	12
Figura 6. Visión general de la glucólisis.....	15
Figura 7. STAT3 actúa como mediador central del metabolismo celular a través de los mecanismos dependientes de HIF-1 α	17
Figura 8. Proliferación de células de SiHa.....	29
Figura 9. Proliferación de células INBL.....	29
Figura 10. Proliferación de linfocitos.....	30
Figura 11. Fosforilación en tirosina 705 de STAT3 después del tratamiento con 10 UI/mL de IL-2.....	31
Figura 12. Fosforilación en tirosina 705 de STAT3 después del tratamiento con 100 UI/mL de IL-2.....	33
Figura 13. Expresión de STAT3.....	35
Figura 14. Expresión de HIF-1 α	35
Figura 15. Expresión de PDK1.....	36
Figura 16. Expresión de GLUT1.....	36
Figura 17. Expresión de STAT3.....	37
Figura 18. Expresión de HIF-1 α	38
Figura 19. Expresión de PDK1.....	39
Figura 20. Expresión de GLUT1.....	39
Figura 21. Producción de ATP en células INBL.....	41

Figura 22. Efecto del tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 sobre STAT3 y el efecto Warburg.....	49
Figura 23. Efecto del tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 sobre STAT3 y el efecto Warburg.....	49

Abreviaturas

CaCu: Cancer Cervicouterino

GLUT1: Transportador de Glucosa 1

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 alfa

IL-2: Interleucina 2

IL-2R: Receptor de Interleucina 2

PDK1: Cinasa de la piruvato deshidrogenasa 1

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

VPH: Virus del papiloma humano

Resumen

En México, el cáncer de cuello uterino es la tercera causa de muerte por cáncer en la mujer. El cáncer cervicouterino, se asocia a la infección por el virus de papiloma humano, que modifica a las células para adquirir características transformadas como proliferación descontrolada y reprogramación de su metabolismo energético para mantener un crecimiento rápido y descontrolado. Esta característica de las células tumorales de mostrar un elevado radio de glucolisis mientras continúan creciendo aún bajo condiciones de normoxia se correlaciona con el incremento de la expresión de enzimas glucolíticas y de transportadores de glucosa. Es importante señalar que la vía JAK/STAT está ligada a la proliferación en células de cáncer de cérvix por lo que la activación de las proteínas STAT3 y STAT5 mediante fosforilación es importante para iniciar la función de éstas. Por tanto, en este trabajo se evaluará el papel de STAT3 sobre la expresión de genes clave en el cambio metabólico que presentan las células tumorales.

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 aumenta la activación de STAT3 y así su actividad como factor de transcripción aumentando la transcripción de los genes PDK1, HIF-1 α y GLUT1, además de aumentar su proliferación y generación de ATP en células de cáncer cervicouterino con genotipo VPH 18. Sin embargo, el tratamiento con 100 UI/mL de IL-2 disminuye la activación de STAT3 y la transcripción de los genes PDK1, HIF-1 α y GLUT1, así como su proliferación, pero el ATP aumenta sugiriendo una recuperación de la actividad mitocondrial.

Todo esto sugiere el papel fundamental de STAT3 como factor de transcripción sobre algunos genes clave en el efecto Warburg y necesarios para continuar con el ciclo celular y aumentar la proliferación celular. Además, el aumento de PDK1, HIF-1 α y GLUT1 demuestra la importancia de estos genes para el mantenimiento y la progresión tumoral, además de que estos genes son de los principales reguladores de las vías de obtención de energía de la célula transformada.

La información generada en este proyecto sugiere que STAT3 puede ser un blanco para el tratamiento de este cáncer.

Abstract

In Mexico, cervical cancer is the third leading cause of cancer death in women. Cervical cancer is associated with human papillomavirus infection, which modifies cells to acquire transformed characteristics such as uncontrolled proliferation and reprogramming of their energy metabolism to maintain rapid and uncontrolled growth. This characteristic of tumor cells showing a high glycolysis ratio while continuing to grow even under normoxic conditions is correlated with increased expression of glycolytic enzymes and glucose transporters. It is important to note that the JAK / STAT pathway is linked to proliferation in cervical cancer cells, so the activation of the STAT3 and STAT5 proteins by phosphorylation is important to initiate their function. Therefore, in this work we will evaluate the role of STAT3 on the expression of key genes in the metabolic change that tumor cells present.

Our results suggest that treatment with 10 IU / mL of IL-2 increases the activation of STAT3 and thus its activity as a transcription factor by increasing the transcription of the PDK1, HIF-1 α and GLUT1 genes, cell proliferation and ATP generation. However, treatment with 100 IU / mL of IL-2 decreases the activation of STAT3 and the transcription of the PDK1, HIF-1 α and GLUT1 genes, as well as their proliferation, but ATP increases, suggesting a recovery of mitochondrial activity.

Altogether, these results suggest the fundamental role of STAT3 as a transcription factor on some critical genes in the Warburg effect necessary to continue the cell cycle and increase cell proliferation. Furthermore, the increase in PDK1, HIF-1 α and GLUT1 demonstrates the importance of these genes for tumor maintenance and progression, in addition to the fact that these genes are the main regulators of the energy-obtaining pathways of the transformed cell.

The information generated in this project suggests that STAT3 may be a target for the treatment of this cancer.

Introducción

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación descontrolados de células transformadas y puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Las células normales se dividen de manera ordenada y éstas mueren cuando se han desgastado o se dañan y nuevas células toman su lugar. Por otra parte, en el cáncer, las células crecen de manera descontrolada y generan nuevas células que desplazan a las células normales. Esto causa problemas en el área del cuerpo en la que comenzó el cáncer, el tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Al cáncer se le considera un grupo de enfermedades heterogéneas debido a que las mutaciones que pasan de una célula a las células hijas no siempre son las mismas.^{1,2}

Recientemente, se han propuesto características que se encuentran presentes en todos los tumores y en su progresión; entre las que se encuentran señales de proliferación sostenida, evasión de supresores de crecimiento, evasión del sistema inmune, inmortalidad replicativa, inflamación, invasión y metástasis, angiogénesis, inestabilidad genómica y mutaciones, resistencia a la muerte celular. También se ha propuesto como una característica del cáncer la reprogramación del metabolismo para obtener energía.² En este proyecto, en particular, se exploraron las características tumorales que incluyen la desregulación de las vías de señalización que implican la obtención de la energía.²

El cáncer cervicouterino y el virus de papiloma humano

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el cuarto cáncer con mayor frecuencia en mujeres de todo el mundo y la mayoría de los casos ocurren en países en vías de desarrollo. En México es un problema de salud pública, ya que junto con el cáncer de mama representa la principal causa de muerte en mujeres.^{3,4} La infección por el virus del papiloma humano (VPH) ha sido reconocida como un factor etiológico para el desarrollo del CaCu. Se han descrito más de 120 tipos de VPH y aproximadamente una tercera parte de ellos son capaces de infectar el epitelio del tracto genital. Otros tumores relacionados con el VPH son del canal anal, vagina,

vulva, pene y oral, de tal manera que se ha estimado que el VPH es responsable del 5,2% de todos los cánceres en el mundo.^{3, 4, 5}

Los VPH tienen tropismo por las células epiteliales. Así, pueden producir infecciones tanto de piel como de mucosas. Los virus que son capaces de infectar las mucosas se dividen en genotipos de alto y bajo riesgo, de acuerdo a si su infección puede conducir o no al desarrollo de cáncer. Dentro de los VPH de alto riesgo se encuentran los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67, 68 y 70, entre los cuales los tipos 16 y 18 son los de mayor prevalencia en lesiones malignas de cérvix.^{4, 5}

El VPH presenta una estructura de aproximadamente 8.000 pares de bases, destacando una región temprana (E), una región tardía (L), una región de control largo (LCR) y 8 regiones de lectura abierta (ORF) (Figura 1).^{4, 5}

El potencial oncogénico de los VPH de alto riesgo se debe a las oncoproteínas E6 y E7 que son las responsables de romper el control del ciclo celular, interactuando directa o indirectamente con proteínas cruciales para el mantenimiento del ciclo celular, como pRB y p53, además de iniciar una serie de alteraciones que conducen a la transformación celular.^{4, 5}

La expresión de los oncogenes virales es regulada por proteínas celulares y virales, como la proteína viral E2, que actúa como factor transcripcional. La proteína E2 forma homodímeros que reconocen de manera específica las secuencias palindrómicas ACCGNNNCGGT, localizadas en la región larga de control (LCR) del genoma viral; su unión a este sitio induce la transcripción de E6 y E7 (Figura 1).⁵

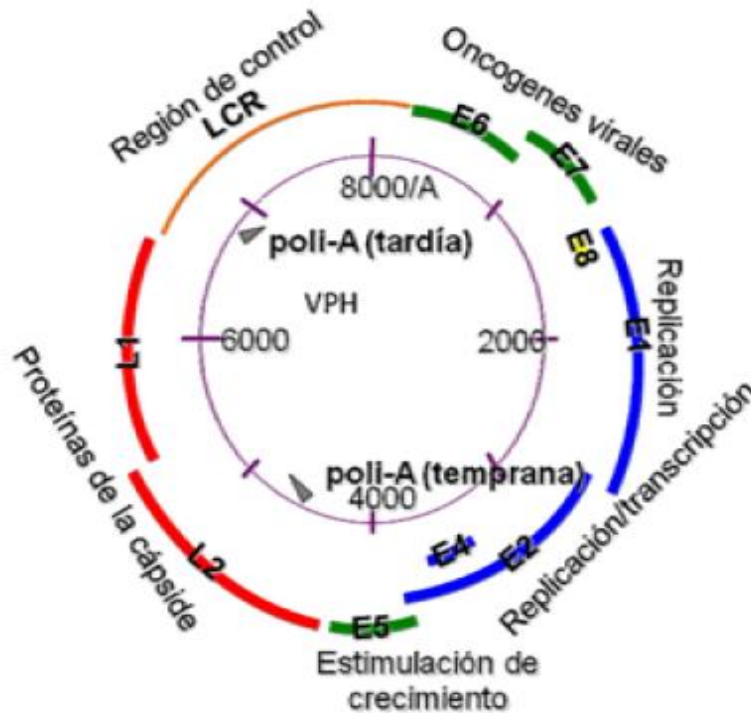


Figura 1. Virus del papiloma humano. LCR (Long Control Region) encargada de regulación de la expresión génica y replicación viral. E6 y E7 son considerados oncogenes ya que sus proteínas se unen a p53 y pRb, respectivamente. E5 está relacionado con el crecimiento puesto que tiene la capacidad de activar las vías MAPK y PI3K. E1 y E2 son genes de expresión temprana necesarios para la replicación y transcripción del genoma viral. E4 es necesario para el ensamblaje y liberación viral. L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside. Tomado de **Zaldívar Lelo de Larrea (2012).**⁴

La proteína E6 se une a p53 lo que la hace blanco de ubiquitinación y posteriormente su degradación, así se evita la transcripción de p21 la cual regula la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S al inhibir el complejo CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina A/E.^{4,6}

Por otra parte, la proteína E7 promueve la inhibición de pRb. La proteína pRb mantiene control del ciclo celular al ejercer una acción supresora sobre la familia del factor de transcripción E2F, que cuando se encuentra libre promueve la expresión de numerosos genes involucrados en la progresión de la fase G1 a la

fase S del ciclo celular. La proteína pRb se une a E2F y forma un complejo (pRb/E2F) que mantiene secuestrado este factor de transcripción durante la fase G1 del ciclo celular. La interacción de E7 con pRb conduce a la disociación del complejo pRb/E2F, a la degradación subsecuente de pRb y a la activación prematura de E2F, lo que motiva que se encienda la transcripción de numerosos genes requeridos por la célula para entrar a la fase S (Figura 2).^{4, 5}

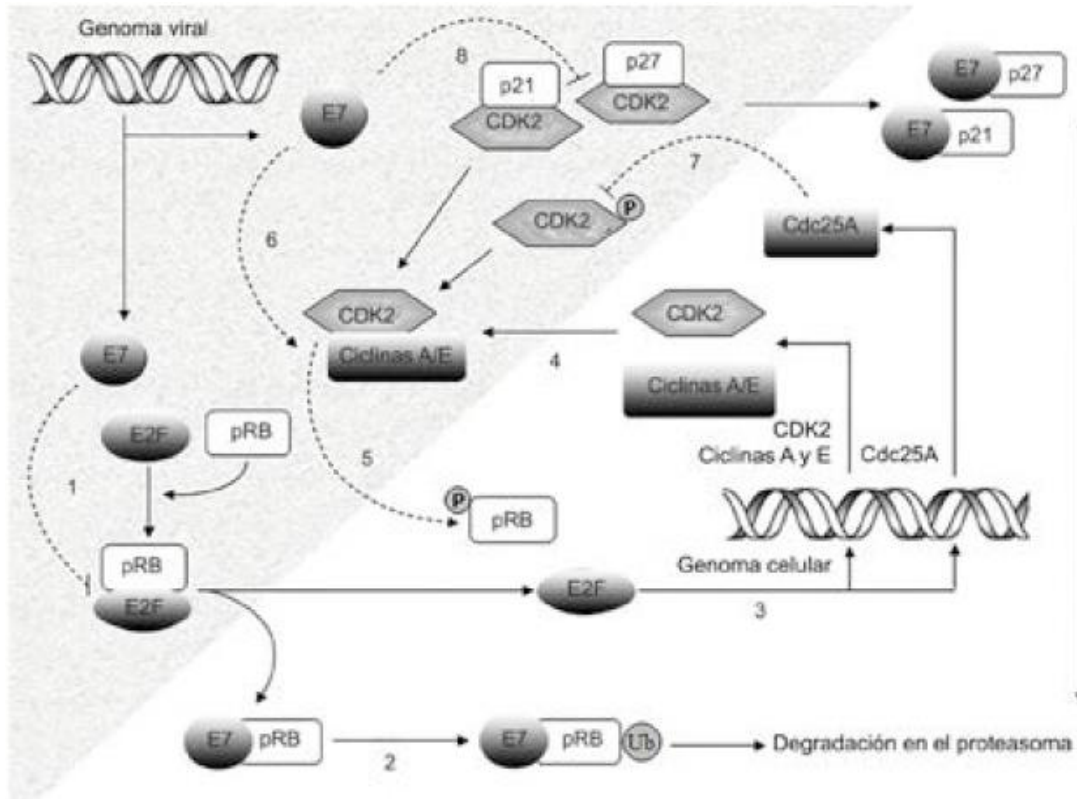


Figura 2. Papel de la proteína E7 en la alteración del ciclo celular. La proteína E7 inhibe la formación de complejos entre pRb y E2F o disocia los complejos pRb/E2F previamente formados. La proteína pRb permanece unida a E7 y es marcada con ubiquitina para ser degradada en el proteasoma. La liberación del factor de transcripción E2F activa la transcripción de genes que promueven el inicio de la fase S del ciclo celular. Entre estos se encuentran los genes de ciclinas y de las cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Tomado de **Vallejo-Velázquez (2015).**⁵

La interleucina 2 y el receptor de interleucina 2

Otra de las características de estas células transformadas es la expresión aberrante de algunas proteínas que les confieren ventajas de proliferación y sobrevivencia. Por ejemplo, se ha demostrado que las células de cérvix sanas no expresan el receptor de la IL-2 (IL-2R). Sin embargo, Rangel y colaboradores en 2010 demostraron que las células tumorales de cérvix expresan las tres subunidades del IL-2R, además Lagunas Cruz y colaboradores en 2019 demostraron la presencia de un receptor funcional para la IL-2.^{6,7}

El IL-2R está formado por tres subunidades denominadas en función de su peso molecular: p55 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ). La unión específica de las diferentes subunidades forma el receptor de baja afinidad (p55), afinidad media (p70/p64) y alta afinidad (p55/p70/p64) (Figura 3).^{8,9}

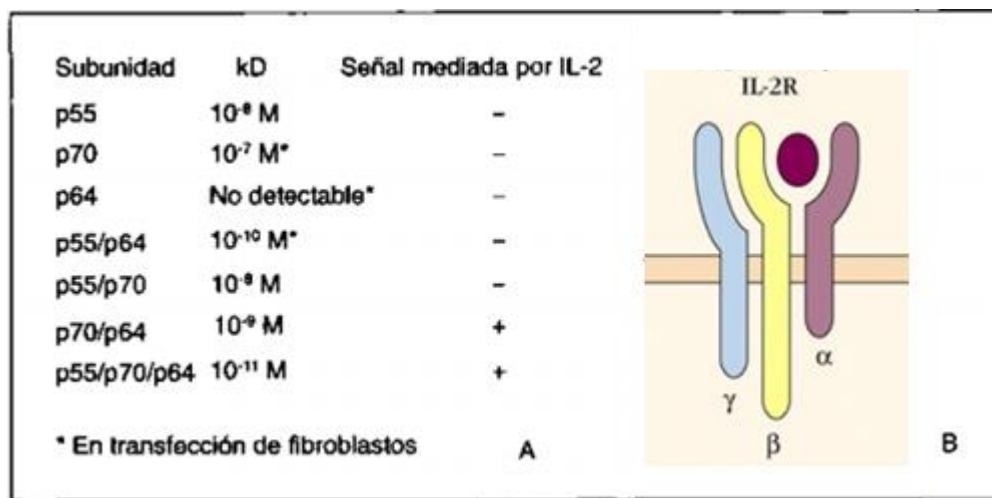


Figura 3. Representación esquemática del receptor de IL-2 unido a su ligando (B) y sus diferentes formas y afinidades (A). Modificado de **Rebollo-Silva (1994)**.⁸

Para que el IL-2R pueda llevar a cabo su función biológica se requiere de la señalización iniciada al formar un complejo con su ligando, la interleucina 2 (IL-2). La IL-2 es una citocina involucrada en la regulación de la respuesta inmune, un potente activador de la proliferación y función de los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK).^{8,9,10}

El gen que codifica la IL-2 tiene 3663 bases con 3 intrones y está localizado en el cromosoma 4 del humano. La proteína tiene un peso molecular aproximado de 15-18 kDa, el cual depende del grado de glicosilación.^{9, 10, 11}

La IL-2 es considerada como un factor de crecimiento, y al interactuar con su receptor (IL-2R) inicia una compleja cascada de señalización la cual está ligada con diversos efectos biológicos. Como se mencionó anteriormente, este receptor cuenta con tres subunidades las cuales no tienen actividad enzimática pero sirven como andamio para proteínas con actividad de cinasa de tirosina (PTK). Dos de las PTKs más importantes involucradas en la activación dependiente de la IL-2 son las Janus cinasas 1 (JAK1) y 3 (JAK3); Zhou y colaboradores en 2000 demostraron que en las células T después de la exposición a la IL-2, se activa la JAK3 seguida de una subsecuente fosforilación en la JAK1. Después de su fosforilación y activación tienen la capacidad de reclutar, fosforilar y activar a los transductores de señal y activadores de la transcripción 1, 3 y 5 (STAT por sus siglas en inglés) (Figura 4).^{8, 10, 11, 12}

A diferencia de la activación canónica de la vía JAK-STAT en linfocitos, Valle-Mendiola y colaboradores en 2014, demostraron que en células de CaCu se encuentra presente JAK1 pero sin una aparente activación; por otra parte, demostraron que JAK3 se encuentra constitutivamente activa, la cual puede reclutar y activar a las STATs (Figura 4).^{9, 10, 13}

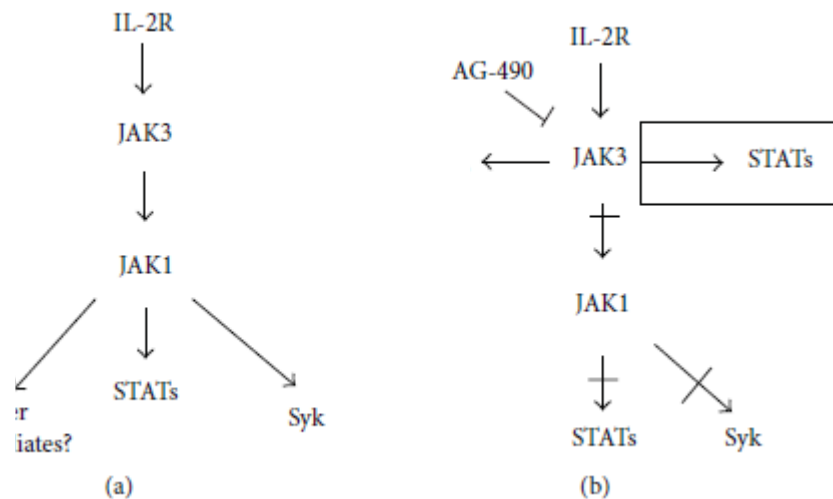


Figura 4. Modelo de la vía de señalización de IL-2R. (a) Zhou et al. propusieron el modelo para células sanas. (b) Modelo propuesto por Valle et al. para las células con cáncer de cérvix. Tomado de **Valle-Mendiola (2016)**.¹³

Vía de señalización JAK-STAT

La vía JAK-STAT es una ruta de señalización que consiste en una serie de fosforilaciones consecutivas, a la cual se le atribuyen varios efectos biológicos a partir de diferentes receptores como los receptores de las citocinas IL-2, IL-6 e IL-10. Por otra parte, se sabe que la desregulación de esta vía se asocia con la tumorigénesis y la progresión tumoral como está reportado en cáncer de mama, colon y ovario.^{14, 15}

Se ha reconocido que el primer paso en el proceso de señalización a través de citocinas es la interacción ligando-receptor con la subsecuente heterodimerización de las subunidades del receptor, cuyas regiones citoplasmáticas tienen acopladas moléculas de señalización. El siguiente paso, de gran importancia, es la transfosforilación y activación de las JAKs asociadas al receptor, una vez activadas son capaces de fosforilar en residuos de tirosina a las cadenas del receptor, creando sitios de unión para los dominios homólogos a Src2 (SH2) de las STATs, así como para otras moléculas.^{14, 15, 16, 17}

Las STATs son reclutadas por el receptor fosforilado, para que a su vez sean fosforiladas por las JAKs. Las proteínas STATs después de ser fosforiladas, se dimerizan y forman homodímeros y/o heterodímeros que traslocan al núcleo donde su acción efectora se basa en la modificación de la transcripción génica. Para permitir que las STATs migren hacia el núcleo, una secuencia de aminoácidos en las STATs, llamada señal de localización nuclear (NLS), se une a proteínas llamadas importinas. Una vez que el dímero STAT (unido a las importinas) ingresa al núcleo, una proteína llamada Ran (asociada con GTP) se une a las importinas, liberándolas del dímero STAT. El dímero STAT queda libre en el núcleo.^{14, 15, 16, 17}

Las proteínas STAT son factores de transcripción latentes que son activados por la fosforilación en un residuo de tirosina, típicamente en respuesta a ligandos extracelulares y regulan muchos aspectos celulares.¹⁸

Se han descrito siete proteínas STAT en los mamíferos, las cuales incluyen STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a/b y STAT6. Dentro de esta familia STAT3 es el factor de transcripción relevante para este proyecto.^{18, 19}

STAT3

STAT3 es un factor de transcripción que se considera como un oncogen, y se encuentra regulado bajo condiciones fisiológicas normales. Puede ser activado por una gran variedad de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10, etc.), receptores (receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)) y oncogenes que incluyen c-Src. Se ha reportado que se encuentra constitutivamente fosforilado en el residuo de tirosina 705 en diversos tipos de cánceres como cáncer de mama, páncreas, riñón, ovario, colon, entre otros.^{20, 21, 22}

El gen que codifica para STAT3 se localiza en el cromosoma 17q21.2. El gen tiene 24 exones y codifica para una proteína de 770 aminoácidos, con un peso de 88 KDa. Se describen tres isoformas:

- La isoforma 1, o canónica, de 770 aminoácidos.
- La isoforma 2, que pierde el aminoácido 701, pero conserva los aminoácidos 705 y 727 necesarios para la fosforilación y, con ello, la actividad de la proteína.
- La isoforma 3, o beta, que se caracteriza por tener un extremo carboxilo terminal más corto, pierde 45 aminoácidos conservando solo el 705 y pierde el 727, lo que permite la formación de dímeros, pero altera la actividad transcripcional completa.^{23, 24, 56}

La activación de la señalización de STAT3 promueve crecimiento, metástasis, quimioresistencia, escape del sistema inmune, entre otros. Una vez que alguno de los reguladores río arriba de STAT3 se activa, éste es fosforilado y activado, se

dimeriza y trasloca a núcleo, donde activa la transcripción de los genes blanco que regulan la proliferación celular, antiapoptosis, migración, e invasión (Figura 5), considerándose estas funciones como parte de la activación y efectos canónicos de STAT3.^{21, 22, 23}

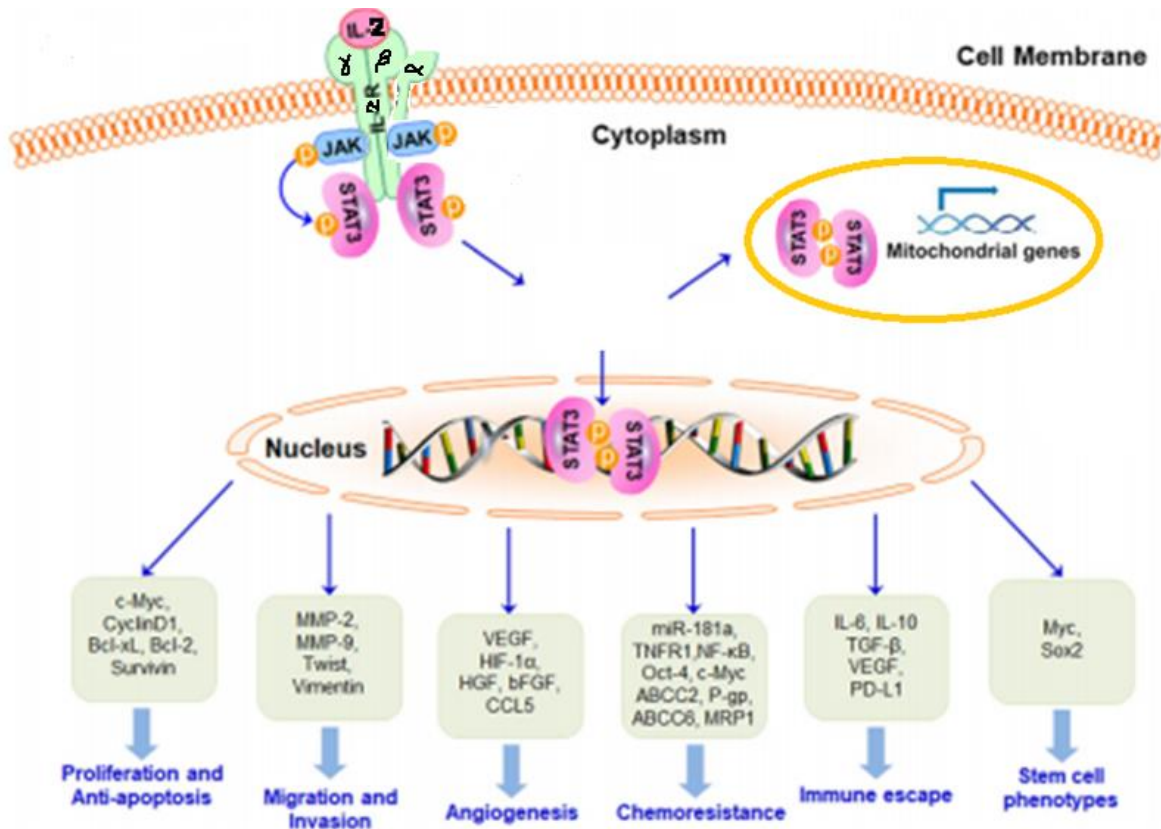


Figura 5. Papel de STAT3 en la progresión y mantenimiento tumoral. Modificado de Qin (2019).²²

Por otra parte, existen reportes que indican que STAT3 puede tener algunas funciones no canónicas entre las que se encuentran la interacción con GRIM19, un componente del complejo I de la cadena de transporte de electrones (ETC). Para traslocar a mitocondria STAT3 debe ser fosforilado en un residuo de serina específico (Ser727). Además, dentro de la mitocondria, STAT3 puede interactuar con los complejos I y II de la ETC y así contribuir a la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la caspasa 3, de esta manera STAT3 protege a la célula.^{23, 24}

Por otra parte, STAT3 puede interactuar con la ciclofilina D en la matriz mitocondrial y previene la apertura del poro mitocondrial (MPTP), lo cual evita la apoptosis mediada por calcio, citocromo C y necrosis.²⁴

Tomando en cuenta esto, evaluamos el papel de la activación de STAT3 después del tratamiento con la IL-2 y su efecto sobre algunos genes clave que confieren resistencia, supervivencia y proliferación a células tumorales de CaCu.

Por lo que, dentro de este proyecto, la actividad de STAT3 relevante es su papel en la desregulación de las vías energéticas celulares.

Eje central de obtención de energía celular

Todas las células tumorales y normales necesitan energía y para este propósito, utilizan moléculas, las cuales son degradadas y por lo tanto las células obtienen la energía necesaria para sus funciones esenciales. El eje central del metabolismo energético de células normales consiste en glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria, por lo que la glucosa es el combustible principal para proporcionar energía a todas las células.^{23, 24}

Por tanto, la principal vía de obtención de energía es la oxidación completa de la glucosa mediante la glucólisis y otros procesos metabólicos tales como el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, culminando en la producción de ATP mediante la ATP sintasa.²⁴

Muchas enzimas de la vía glucolítica juegan roles significativos en procesos no glucolíticos como la regulación transcripcional, la cual ayuda a las células tumorales para lidiar con otras demandas celulares. Por lo tanto, todas las enzimas que pertenecen a esta vía se encuentran desreguladas en condiciones de cáncer (Figura 6).^{24, 25}

Por otra parte, la vía de las pentosas fosfato, una vía metabólica paralela a la glucólisis, provee a la célula con NADPH así como de ribosa-5-fosfato, molécula precursora de síntesis de nucleótidos. Como en la glucólisis, la mayoría de las enzimas de esta vía se encuentran desreguladas en cáncer.²⁴

El ciclo de Krebs genera precursores para la producción de aminoácidos así como otras moléculas fundamentales que proveen energía, macromoléculas y balance redox a la célula. Estas características son importantes para las células en etapas proliferativas, que como en células tumorales o linfocitos T activados, requieren un suministro continuo de metabolitos pequeños para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Entonces, la función aberrante de este ciclo se ve implicada en una variedad de patologías, además de que muchas enzimas de este ciclo se ven desreguladas en cáncer.^{24, 25, 26}

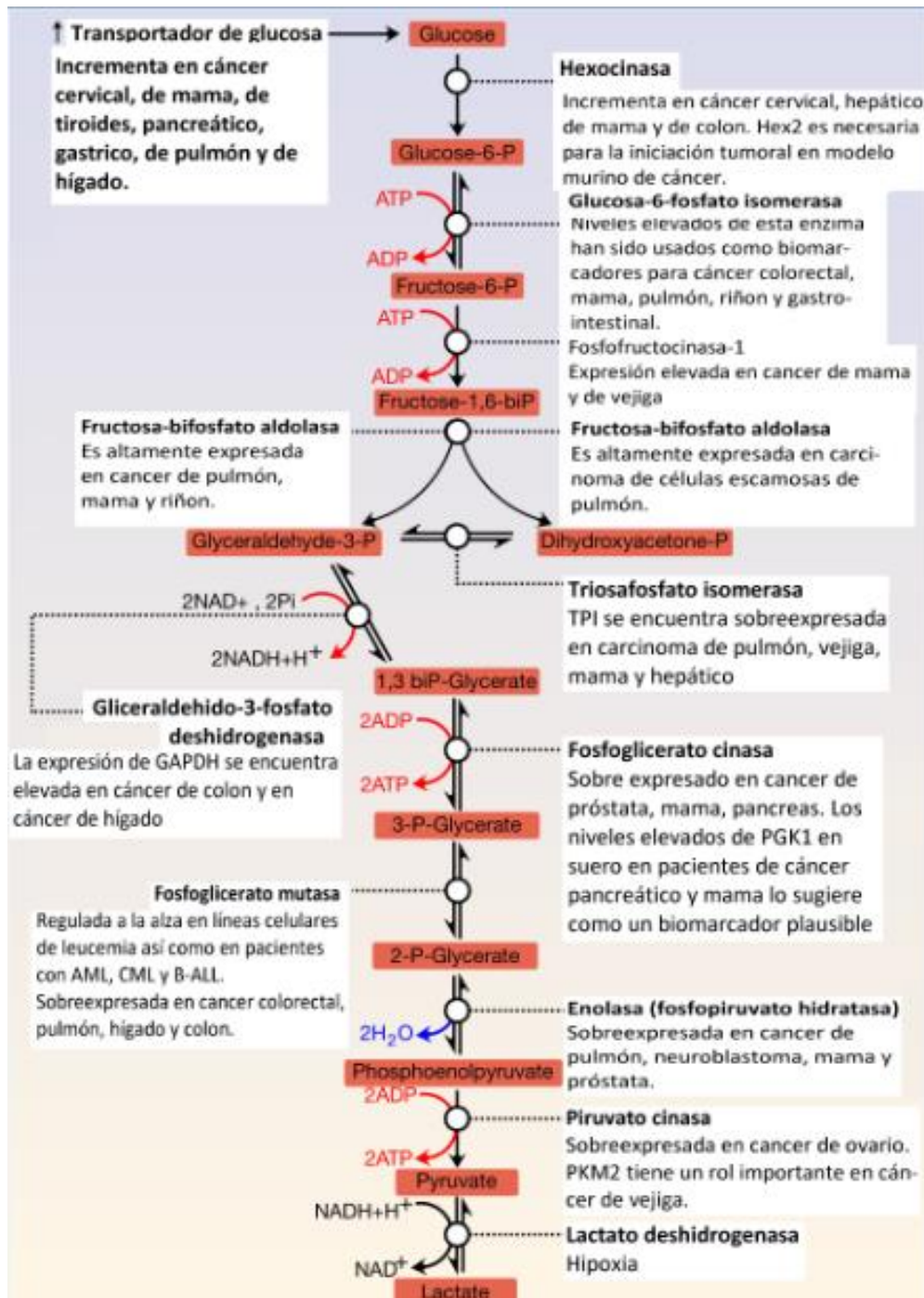


Figura 6. Visión general de la glucólisis. Los pasos principales de regulación de esta vía son la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato; fructosa-6-fosfato a fructosa-1-6-bifosfato; y la formación de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato. Todas las enzimas de la glucólisis están desreguladas en cáncer. **Modificado de Valle-Mendiola & Soto-Cruz (2020).**²⁴

Efecto Warburg y reprogramación metabólica

Las células tumorales reprograman su metabolismo energético para cubrir sus altas demandas bioenergéticas para mantener un crecimiento rápido y descontrolado. Por ejemplo, las células diferenciadas normales emplean la fosforilación oxidativa para generar la energía y la biomasa necesarias para los procesos celulares; sin embargo, la mayoría de las células cancerosas presentan cambios fundamentales en el metabolismo de nutrientes y dependen de la glucólisis aeróbica, llamado efecto Warburg.^{25, 26, 27}

En tejido normal, aproximadamente 10% de la energía de la célula se genera por glucólisis, mientras que la respiración aeróbica que tiene lugar en la mitocondria contribuye con 90%. Sin embargo, en tejidos tumorales, aproximadamente el 50% de la energía celular, en forma de ATP, se genera por glucólisis, y la energía restante es generada en la mitocondria, este cambio se mantiene aun cuando el O₂ presente es suficiente para mantener la función mitocondrial (glucólisis anaerobia). Esta característica de las células tumorales de mostrar un elevado radio de glucólisis mientras continúan creciendo aún bajo condiciones de normoxia se correlaciona con el incremento de la expresión de enzimas glucolíticas y de transportadores de glucosa, estos cambios pueden deberse a la activación del factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α) y STAT3 (Figura 7).^{28, 29}

Factor inducido por hipoxia 1 α (HIF-1 α)

HIF-1 α es un molécula de suma importancia que se encuentra sobre expresada en muchos tipos de cáncer, este factor de transcripción forma heterodímeros que consisten en una subunidad dependiente de oxígeno (subunidad α) y una subunidad independiente de oxígeno (subunidad β). La subunidad α trasloca al núcleo bajo condiciones normales y su degradación es mediada por el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), el cual contiene residuos específicos de prolina (Pro402 y Pro564) que son hidroxilados en concentraciones normales de oxígeno por prolihidroxilasas (PHDs) lo que la hace blanco de ubiquitinación y degradación.^{24, 30}

Este factor de transcripción es capaz de regular el cambio metabólico a glucólisis aerobia en células bajo condiciones de hipoxia o de normoxia. Además, muchos de los genes regulados por el HIF-1 α están relacionados con el metabolismo de la glucosa, por lo que esta proteína estimula la glucólisis debido a la activación de transportadores de glucosa y de enzimas glucolíticas.^{30, 31, 32, 33}

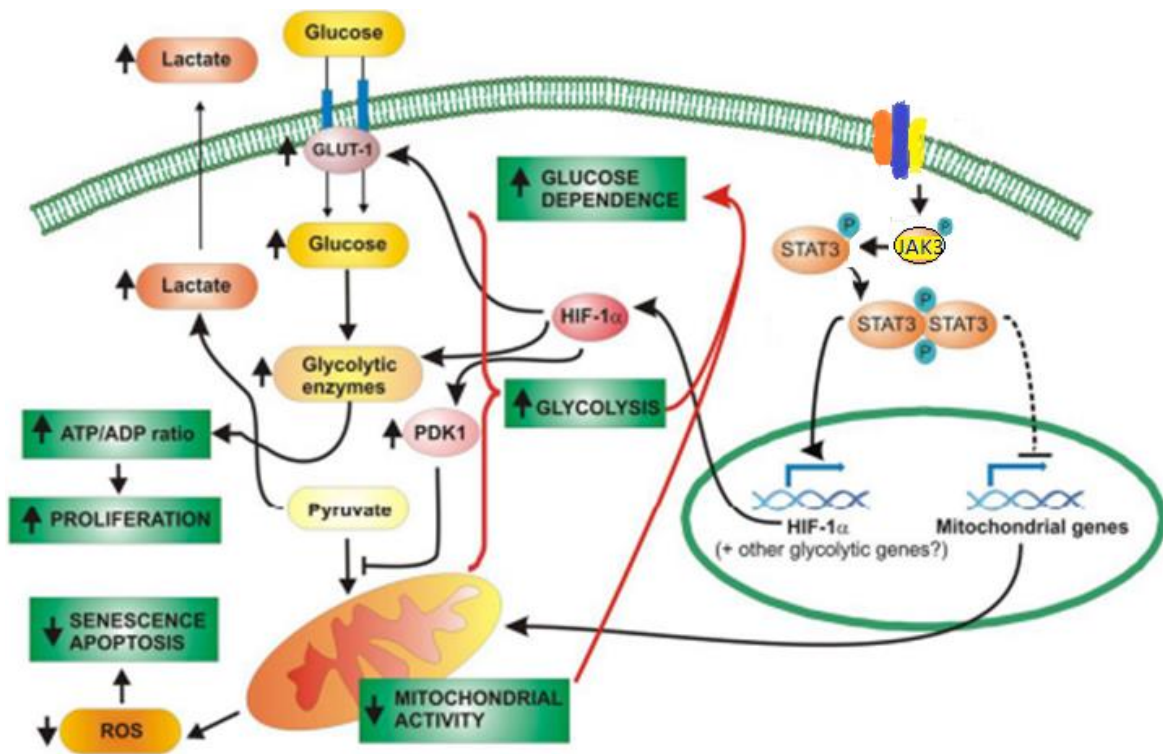


Figura 7. STAT3 actúa como mediador central del metabolismo celular a través de los mecanismos dependientes de HIF-1 α . Modificado de **Demaria (2010).**²³

La activación del factor de transcripción de HIF-1 α en condiciones de normoxia ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer (colon, páncreas, ovario, mama, etc), esto lleva a la modificación de la transcripción de ciertas enzimas clave en la glucólisis como PDK1 y GLUT1-4 (Figura 7), la modificación de la expresión de las enzimas glucolíticas da como resultado una adaptación metabólica, que como se mencionó, se denomina efecto Warburg. Tomando en cuenta esto, en este proyecto se propone, que la transcripción de la enzima cinasa de la piruvato

deshidrogenasa 1 (PDK1), además de transportadores de glucosa (GLUT1-4) se ve modificada después de la activación de la vía JAK3/STAT3.^{23, 30, 33}

Cinasa de la Piruvato Deshidrogenasa (PDK1)

El complejo mitocondrial de la piruvato deshidrogenasa (PDC) descarboxila irreversiblemente al piruvato para convertirlo en acetil coenzima A, por tanto une a la glucólisis con el ciclo del ácido tricarboxílico o ciclo de Krebs y define un paso crítico en la producción de energía de la célula.^{34, 35}

La piruvato deshidrogenasa forma parte del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (subunidad E1) que actúa conjuntamente con la dihidrolipoamida acetiltransferasa (subunidad E2), y la dihidrolipoamida deshidrogenasa (subunidad E3) en forma de seis homodímeros. La unión entre estas enzimas tiene como finalidad el correcto desarrollo de las reacciones conjuntas de vital importancia en el metabolismo energético de la célula.^{34, 35, 36}

El complejo piruvato deshidrogenasa es regulado por fosforilación mediado por una cinasa. La cinasa de la piruvato deshidrogenasa (PDK) en especial la PDK1, fosforila la subunidad E1 α del complejo piruvato deshidrogenasa y lo inactiva. Por lo que, la PDK1 es una enzima glucolítica importante que se puede fosforilar e inactivar a la piruvato deshidrogenasa y por tanto suprimir la descarboxilación oxidativa del piruvato, evitando así que éste entre al ciclo de Krebs. Se conocen cuatro isoformas de PDK (1 a 4) en humanos.^{36, 37}

Al ser una enzima glucolítica clave, la sobreexpresión de PDK1 se ha observado en diversos tumores, además de estar comúnmente asociada con proliferación de células cancerígenas, así como metástasis y resistencia a la quimioterapia. Por otra parte, se le considera una enzima clave en la reprogramación conocida como efecto Warburg al evitar la oxidación completa de la glucosa, desviando el producto de esta oxidación a la producción de lactato.^{25, 37, 38, 39}

Transportador de glucosa 1 (GLUT1)

La captación y consumo de glucosa es importante para la supervivencia de células normales y malignas. La captación acelerada de glucosa distingue a las células tumorales de las células normales sanas, de hecho una de las formas de detección de cáncer es la captación de glucosa.^{40, 41}

Entre las moléculas encargadas de esta función se encuentran los transportadores de glucosa (GLUT), una familia de 14 miembros divididos en 3 clases. El miembro de interés para este proyecto es el transportador de glucosa 1. Cabe destacar que GLUT4 es el receptor que se expresa normalmente en células de epitelio cervical.⁴²

Como se mencionó, GLUT1 es el captador basal de la glucosa y comúnmente se encuentra aumentada su expresión en cáncer de cérvix, además de que se le asocia con otras enfermedades. Aunado a esto se ha demostrado que la expresión de GLUT1 se ve aumentada conforme avanza las lesiones provocadas por el CaCu.^{6, 41, 42}

El transportador de glucosa 1 (GLUT1) regula el transporte de glucosa a través de la membrana celular y no solo es el paso que limita el radio de glucólisis sino que también se le considera el primer paso de la misma.^{39, 40, 41, 42}

Además, la transcripción de los captadores de glucosa (GLUT1 y 4) en CaCu también se ve aumentada, por lo que en este estudio se propone que la activación de la vía JAK3/STAT3 aumenta la expresión de los captadores de glucosa, en específico de GLUT1.^{37, 39, 40, 41, 42}

Planteamiento del problema

El CaCu es un problema de salud pública en México, ya que representa la segunda causa de muerte en mujeres, después del cáncer de mama. Las células transformadas dependen de la activación de diferentes vías de señalización para mantener su fenotipo maligno, generar energía y proliferar.

Se ha demostrado que las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL expresan las tres subunidades del receptor de la IL-2. Además, se ha analizado la activación de la vía JAK-STAT en respuesta a la unión de la IL-2 a su receptor. Se ha demostrado que tanto JAK3 como STAT3 y STAT5 se encuentran fosforiladas de manera constitutiva y que responden al tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2, aumentando su fosforilación. Esto induce un aumento en la proliferación de las células de carcinoma de cérvix. Por el contrario, el tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2 induce una disminución en su fosforilación y en la proliferación de las células de CaCu.

Una de las vías implicadas en estos procesos es la vía JAK-STAT, la cual se encuentra activa de manera constitutiva en CaCu, por lo que es de nuestro interés analizar si la proteína STAT3 está implicada en la regulación de genes, tanto nucleares como mitocondriales, involucrados en el metabolismo energético.

Hipótesis

La activación de STAT3 regula la expresión de los genes HIF-1 α , GLUT-1 y PDK-1 involucrados en el metabolismo energético, en respuesta a 10 UI de la IL-2 la expresión aumenta, mientras que con 100 UI la expresión de estos genes se ve disminuida, en células de carcinoma de cérvix.

Objetivos

Objetivo General

Determinar el papel de la STAT3 en la regulación del metabolismo energético en líneas de carcinoma de cérvix en respuesta a la IL-2 que activa la vía JAK-STAT.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la IL-2 sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer de cérvix INBL y SiHa.
2. Determinar el efecto de la IL-2 sobre la fosforilación en la tirosina 705 de la STAT3.
3. Analizar el efecto del tratamiento con la IL-2 sobre la expresión de los genes PDK-1, GLUT-1 y HIF-1 α y en la producción del ATP en células de cáncer de cérvix.

Material y Métodos

Material Biológico

La línea celular SiHa (VPH-16), derivada de carcinoma de células escamosas, grado II, fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular INBL (VPH-18) derivada de carcinoma invasivo de células escamosas en estado IVB, fue establecida en el laboratorio de Diferenciación Celular de la FES Zaragoza.^{54, 55} Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Microlab, México) suplementado con 5% o 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA). Todas las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

Como control positivo se utilizaron linfocitos de sangre humana, ya que los linfocitos utilizan el efecto Warburg de manera normal para proliferar eficientemente después de la exposición a IL-2, los cuales se obtuvieron mediante separación por gradiente con Ficoll. Se obtuvo sangre periférica de donadores aparentemente sanos. En un tubo falcon de 15 mL se colocaron cuatro mL de Ficoll, posteriormente con cuidado se agregaron cuatro mL de sangre total. Las células se centrifugaron durante 30 minutos a 400 g. Se extrajo el anillo blanco que corresponde a las células mononucleares, para cultivarlos en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino durante 24 horas para permitir que las células adherentes se adhieran a la caja de cultivo. Posteriormente, se obtuvieron los sobrenadantes con los linfocitos, a continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 400 g. Los linfocitos se colocaron en una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 y 48 horas. Todo esto en presencia de 10 UI/mL o 100 UI/mL de la IL-2.

Ensayo de proliferación

La proliferación se evaluó con cristal violeta, para tal fin se sembraron 5×10^3 células/pozo en una placa de 96 pozos de las líneas de cáncer de cérvix SiHa e INBL, y linfocitos. Se incubaron en presencia o ausencia de 10UI/ml o de 100 UI/mL de la IL-2 durante 24 y 48 horas. Se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos. Posteriormente, se agregó el cristal violeta al 0.1%

durante 20 minutos. Se agregó ácido acético al 10% para solubilizar el colorante. Se lavó con agua corriente. Se midió la absorbancia en un lector de placas a 590 nm.

Evaluación de fosforilación de STAT3

Para evaluar la fosforilación se sembraron 3×10^6 células de las líneas de cáncer de cérvix SiHa e INBL, se incubaron en presencia o ausencia de 10UI/mL o de 100 UI/mL de la IL-2 durante 5, 15 y 35 minutos, además de un control negativo sin tratamiento.

Después de transcurrido el tiempo se procedió a lisar las células con 1 mL de buffer de lisis (Anexo), se incubó durante 15 minutos a 4 °C, para centrifugar durante 15 minutos a 13, 000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína mediante el método de Lowry, un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas, utilizando un kit comercial (Dc Protein Assay, Biorad, USA).

Se preparó una curva estándar mediante la realización de un stock con concentración conocida de 100 mg de albúmina y se disolvieron en 1 mL de buffer de lisis. A partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones: 70 μ L de buffer y 30 μ L de albúmina, 85 μ L de buffer y 15 μ L de albúmina, 95 μ L de buffer y 5 μ L de albúmina y 99 μ L de buffer con 1 μ L de albúmina.

La muestra se preparó con 200 μ L del reactivo B (Anexo) en una placa de 96 pozos, se agregaron 20 μ L de reactivo A (Anexo) en cada pozo, después se agregaron 5 μ L de cada una de las muestras. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a 590 nm. Las concentraciones fueron calculadas mediante una curva estándar.

Finalmente, la muestra de proteínas se mezcló con 80 μ L de buffer de Laemli y 20 μ L de DTT; y se hirvieron durante 5 minutos.

La electroforesis se realizó con geles de SDS-PAGE con gel concentrador al 4.5% y gel separador al 10% (Anexo). Los geles se polimerizaron por la adición de

0.05% de persulfato de amonio (Sigma Chemical, Co. USA) y tetrametileno-diamina (TEMED) (Sigma Chemical, Co USA). Se cargaron 25 µg de proteína en geles de poliacrilamida, y se separaron las proteínas en una cámara de electroforesis vertical (Atto, Japón) a 80 V durante 35 minutos en el gel concentrador, y a 125 V durante 90 minutos en el gel separador.

Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa según el método de Kyhse-Andersen en una cámara de transferencia semiseca (Nova Blot, GE. USA) a corriente constante de 125 mA durante una hora utilizando buffer de transferencia.

Las membranas se incubaron durante 16 horas en caseína al 1% (Biorad, USA) para asegurar el bloqueo, después se incubó la membrana con anti-STAT3 (Santa Cruz, USA), mientras que la otra membrana se incubó con anti-pY705 STAT3 (Santa Cruz, USA). Ambas membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios en una proporción de 1 a 1000 con caseína al 1% (Biorad, USA) durante 3 horas.

Se realizaron 5 lavados de 5 minutos con TBS tween, seguidos de 3 lavados con TBS de 5 minutos.

El anticuerpo secundario, goat anti-mouse acoplado a peroxidasa (Santa Cruz, USA), fue incubado durante 45 minutos en una proporción de 1 a 10,000 con caseína al 1% durante 45 minutos. Se realizaron cinco lavados de cinco minutos con TBS tween, seguidos de tres lavados con TBS de cinco minutos.

Se agregaron tres ml del reactivo A que contiene peróxido y tres mL del reactivo B que contiene luminol para revelar las proteínas por medio de quimioluminiscencia. (Pierce, USA)

Evaluación de la expresión génica

Se sembraron 1×10^6 células de las líneas de cáncer de cérvix SiHa e INBL, se incubaron en presencia o ausencia de 10UI/ml o de 100 UI/mL de la IL-2 durante 30 minutos, 6, 10, 24 y 48 horas para extraer mRNA y analizar el efecto de la

citocina sobre la expresión de los genes STAT3, PDK-1, GLUT-1 y HIF-1 α mediante PCR punto final.

Para la extracción de RNA se utilizó el método TRIzol, se agregaron 1 mL de TRIzol y 200 μ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se dejó incubar durante 10 minutos en hielo, para después centrifugar durante 15 minutos a 13,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 400 μ L de isopropanol, para incubar toda la noche a -20°C, se centrifugó durante 15 minutos a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y se agregó 1 mL de etanol. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar restos de guanidina, después se centrifugó a 8,500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco se hidrató en 40 μ L de agua libre de nucleasas, y se dejó en hielo durante 5 horas.

Una vez obtenido el RNA con la técnica ya estandarizada, se cuantificó mediante un biospectrómetro (BioRad, USA) y se revisó la calidad del RNA mediante el cociente 260/280

Se utilizaron 3 μ g de RNA para retrotranscribir a una temperatura de 37°C durante una hora para la síntesis de cDNA.

Se utilizaron 3 μ g de cDNA para evaluar los niveles de STAT3, HIF-1 α , GLUT1, PDK1; como gen de referencia se utilizó β -actina. Los oligos utilizados fueron:

Gen	Primer Sentido	Primer Antisentido
STAT3	TAGAGACCCACTCCTTGCCA	TTGTACCACAGGATGGACGC
HIF-1 α	CCGCTGGAGACACAATCATATC	GTA CTTCCTCAAGTTGCTGGTC
PDK1	ACGCTGGGTAATGAGGATTTG	GAGGTCTTGGTGCAGTTGAATA
GLUT1	GGACAGGCTCAAAGAGGTTATG	AGGAGGTGGGTGGAGTTAAT
β -actina	TCTTCCAGCCTTCCTTCCT	TGTTGGCGTACAGGTCTTTG

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 92°C de desnaturalización durante 5 minutos, 58°C de alineamiento durante 1 minuto, 72°C de elongación durante 1 minuto y 95°C durante 1 minuto, y estas condiciones se repitieron durante 29 ciclos, aunado a una fase de elongación extra de 58°C durante 2 minutos y 72°C por 3 minutos.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante una hora a 80V. Su utilizó bromuro de etidio para visualizar las bandas en el fotodocumentador (Biorad, USA).

Evaluación de la producción de ATP

Para evaluar la producción de ATP se utilizaron 1×10^4 de células en cultivo utilizando el Kit ATP Assay Kit (Sigma Aldrich, USA). A las células se les retiró el medio y se trataron con 100 μ l de tampón de liberación de nucleótidos durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se añadieron 10 μ l de enzima de control de ATP en el lisado celular. La muestra se dejó incubar durante 1-2 minutos y se leyó en un luminómetro (Biorad, USA).

Software y análisis estadístico

Para evaluar la expresión de los genes STAT3, HIF-1 α , PDK1 y GLUT1 y la fosforilación de STAT3 se utilizó densitometría mediante el programa ImageJ.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad versión 5.2. Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos se utilizó la prueba T de Student. (*)= $P \leq 0.05$, (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$.

Resultados

La proliferación de las líneas celulares SiHa e INBL aumenta con el tratamiento de 10 UI/ml de la IL-2, mientras que con 100 UI/ml de la IL-2 disminuye

Para determinar el efecto de la IL-2 sobre la proliferación celular se cultivaron las líneas celulares SiHa e INBL en presencia de la IL-2 durante diferentes tiempos. Los resultados muestran que la proliferación de ambas líneas celulares de CaCu aumenta un ~35% con el tratamiento de 10 UI/ml de la IL-2 desde las 24 hasta las 72 horas con respecto a los controles. Por el contrario, cuando las células son estimuladas con 100 UI/ml de la IL-2 la proliferación en ambas líneas celulares se ve disminuida en ~20% a partir de las 48 hasta las 72 horas con respecto a los controles (Figuras 8 y 9).

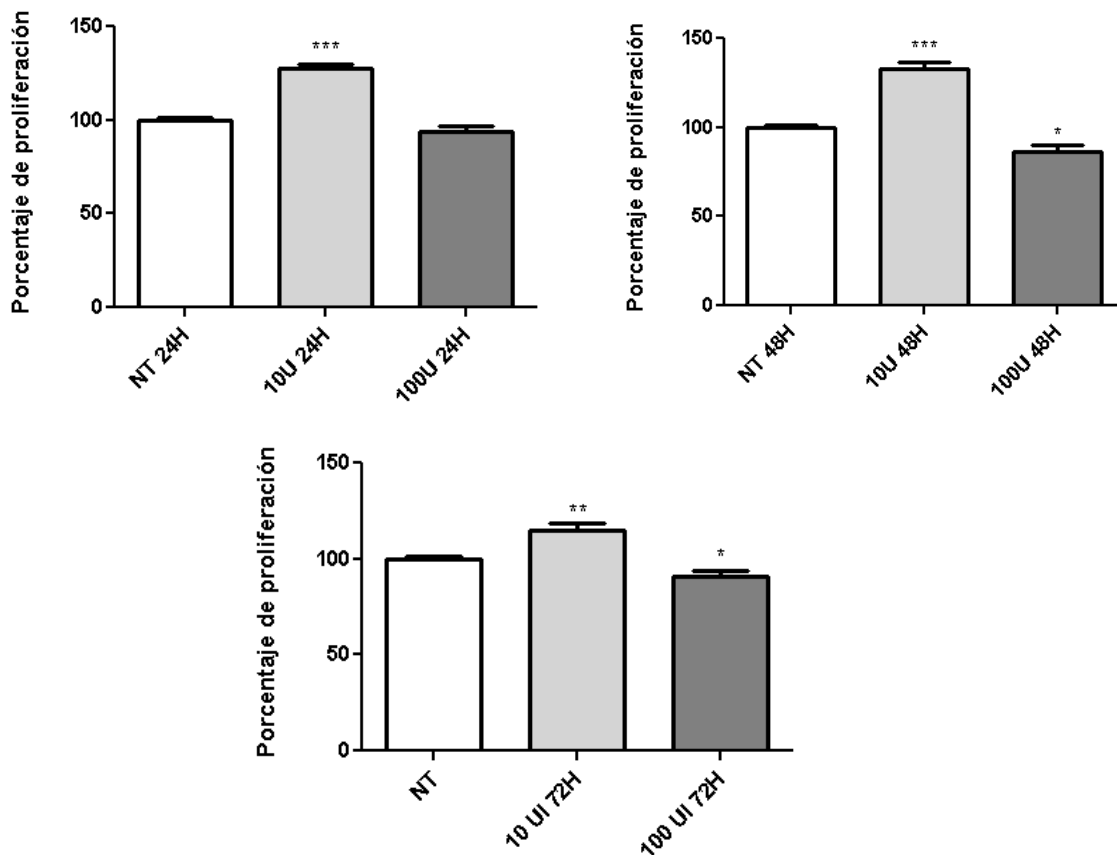


Figura 8. Proliferación de células SiHa. El tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2 sobre la línea SiHa aumenta la proliferación, mientras que disminuye con 100 UI/ml de la IL-2, con respecto a los controles. (*)= $P \leq 0.05$, (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

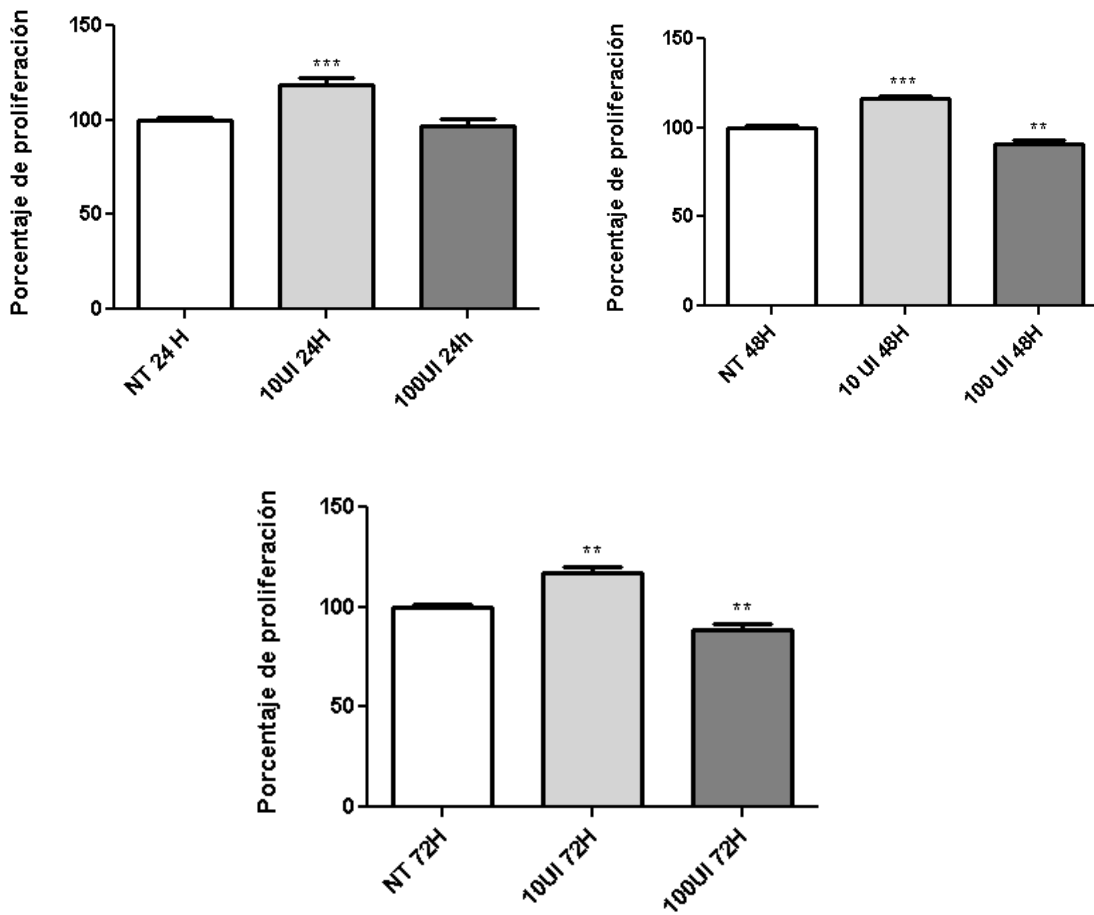


Figura 9. Proliferación de las células INBL. El tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2 sobre la línea INBL aumenta la proliferación, mientras que disminuye con 100 UI/ml de la IL-2, con respecto a los controles. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

Por otra parte, se utilizaron linfocitos de donadores sanos como control positivo, ya que los linfocitos utilizan el efecto Warburg para proliferar eficientemente

después de la exposición a IL-2. En las gráficas podemos observar que el tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2 no genera cambio significativo en la proliferación. Por el contrario, el tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2 aumenta la proliferación en ~40% desde las 24 hasta las 48 horas después del tratamiento con respecto a los controles (Figura 10).

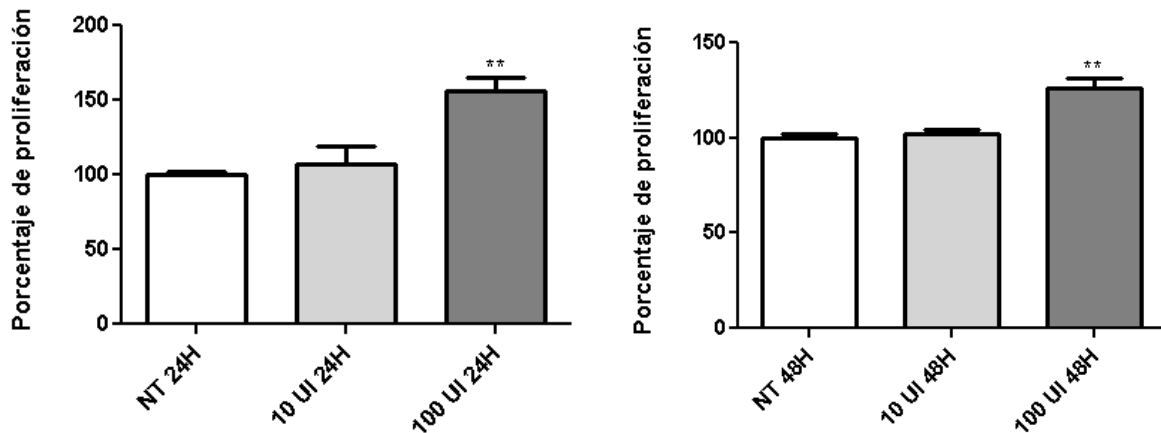


Figura 10. Proliferación de linfocitos. El tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2 sobre el control positivo de linfocitos no afecta la proliferación, mientras que aumenta con 100 UI/ml de la IL-2. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

La fosforilación de STAT3 aumenta en las líneas celulares SiHa e INBL después del tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2

Para determinar la actividad de la proteína STAT3 analizamos la fosforilación en tirosina 705 de la proteína STAT3, para tal fin se incubaron las líneas celulares SiHa e INBL en presencia de 10 UI/ml de la IL-2 durante diferentes tiempos.

Los resultados muestran que la fosforilación en la tirosina 705 aumenta de forma exponencial desde los 5 hasta los 35 minutos. Se observa un máximo de fosforilación a los 35 minutos en las líneas celulares SiHa e INBL (Figura 11).

Cabe destacar que la proteína STAT3 no se encuentra fosforilada de forma constitutiva en la línea celular SiHa (VPH 16), mientras que en la línea celular INBL (VPH 18) la fosforilación de STAT3 si es constitutiva (Figura 11A).

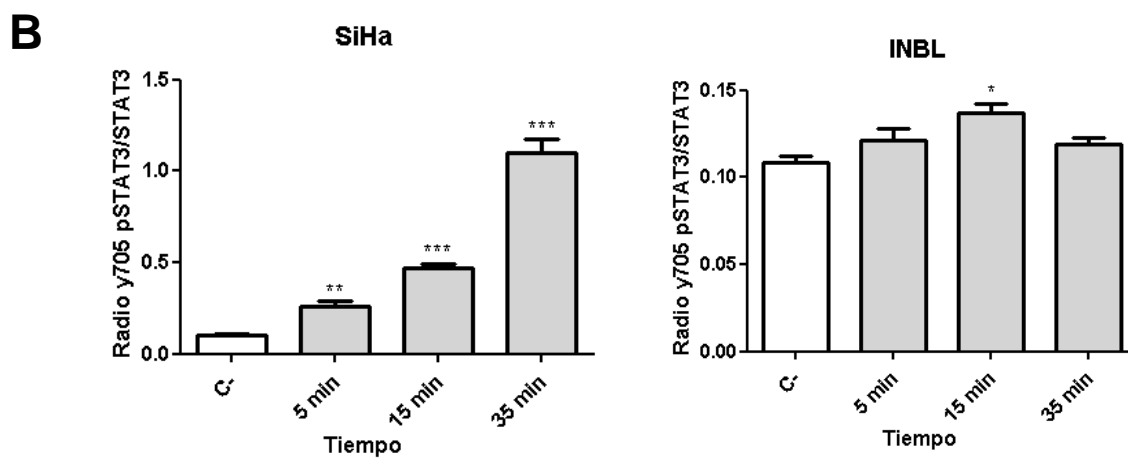
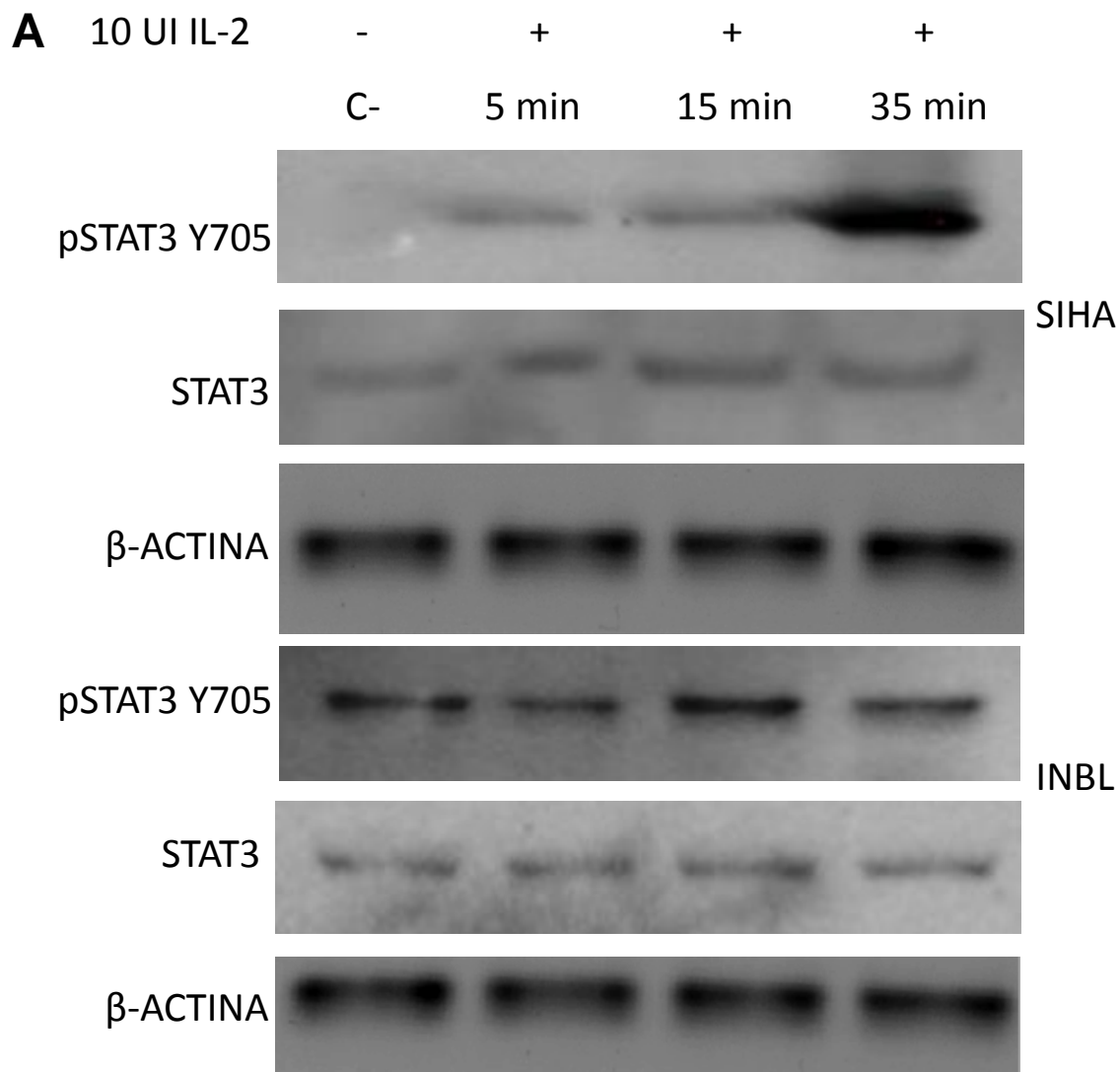


Figura 11. Fosforilación en tirosina 705 de STAT3 después del tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2. A) Western Blot para fosforilación de STAT3 en líneas

celulares SiHa (arriba) e INBL (abajo). B) Radio de fosforilación de STAT3 en líneas celulares SiHa (izquierda) e INBL (derecha) (*)= $P \leq 0.05$, (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. C-=Control negativo, sin tratamiento con IL-2

La fosforilación de STAT3 disminuye en las líneas celulares SiHa e INBL después del tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2

Para analizar la fosforilación en tirosina 705 de la proteína STAT3, se incubaron las líneas celulares SiHa e INBL en presencia de 100 UI/ml de la IL-2 durante diferentes tiempos.

Los resultados muestran que la fosforilación en tirosina 705 disminuye de forma exponencial desde los 5 hasta 35 minutos. Se observa una disminución de fosforilación a los 35 minutos en la línea celular INBL (Figura 12).

Cabe destacar que la proteína STAT3 no se encuentra fosforilada de forma constitutiva en la línea celular SiHa (VPH 16), mientras que en la línea celular INBL (VPH 18) la fosforilación de STAT3 si es constitutiva (Figura 12A).

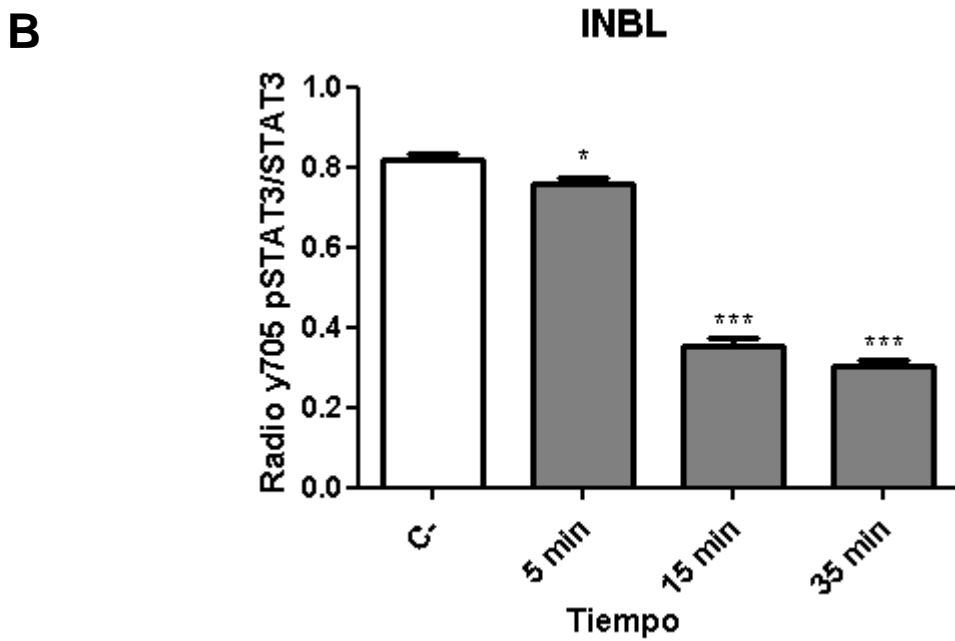
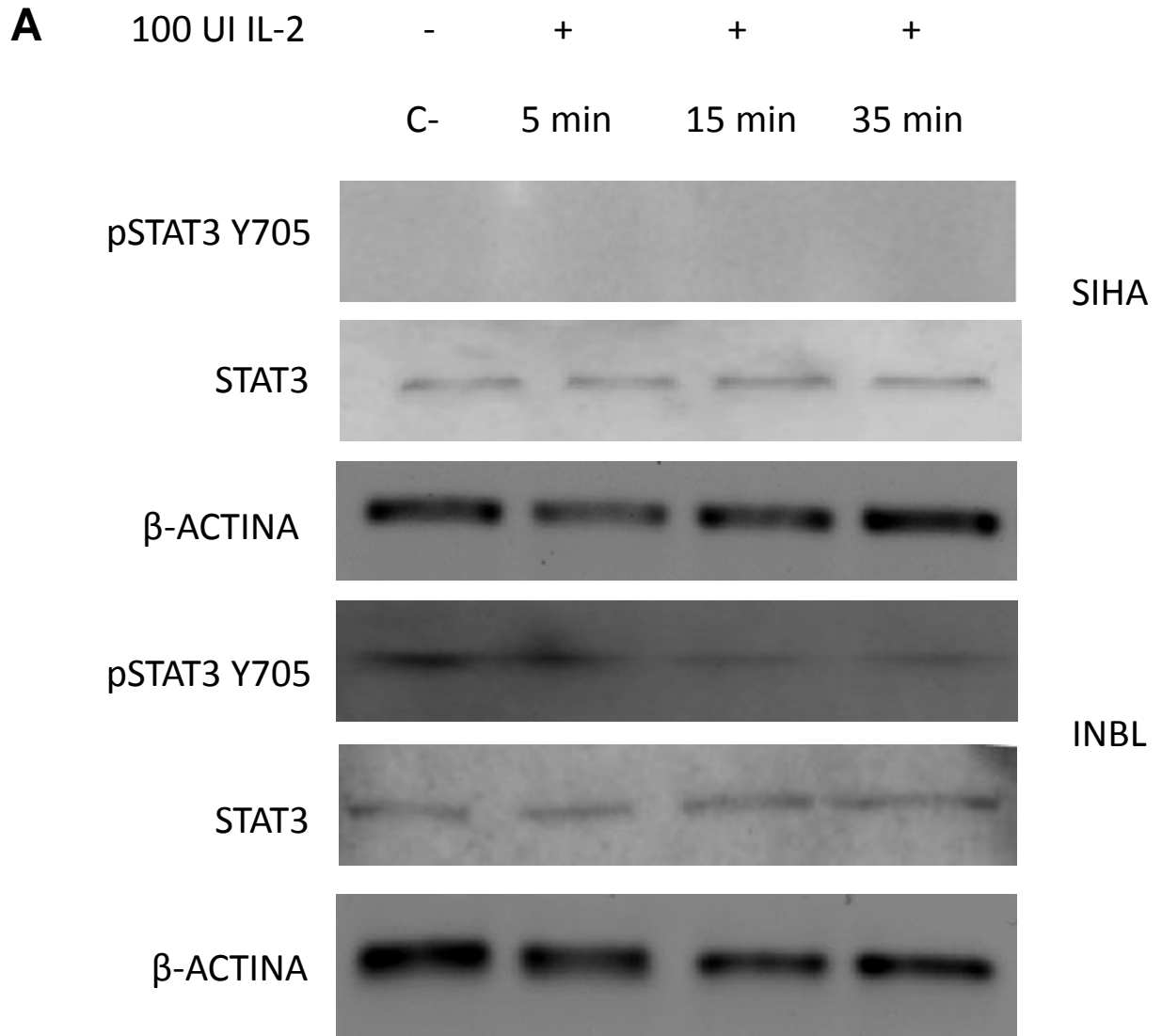


Figura 12. Fosforilación en tirosina 705 de STAT3 después del tratamiento con 100 UI/ml de IL-2. A) Western Blot para fosforilación de STAT3 en líneas celulares SiHa (arriba) e INBL (abajo). B) Gráfica de radio de fosforilación de la STAT3 en línea celular INBL (*)= $P \leq 0.05$, (***)= $P \leq 0.001$. C-=Control negativo, sin tratamiento con IL-2

La expresión génica de STAT3, HIF-1 α , GLUT1 y PDK1 aumenta después del tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2, mientras que el tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2 no modifica la expresión de estos genes en la línea celular SiHa

Para determinar el efecto de la IL-2 sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, se incubaron células SiHa en presencia de 10 y 100 UI/ml de la citocina durante diferentes tiempos. Es importante señalar que se utilizaron tiempos intermedios de 6, 10 y 12 horas con base en ensayos de ciclo celular de las líneas de CaCu realizados por nuestro grupo de trabajo. En estos ensayos encontraron que la transición de la fase G1 a la fase S es en estos tiempos.⁴⁴

Los resultados mostraron la presencia de bandas que corresponden al tamaño esperado del producto de PCR, en todos los carriles y en todas las condiciones. Como se puede observar en las figuras 13, 14, 15 y 16 se encontró un aumento en la expresión de los genes STAT3, HIF-1 α , GLUT1 y PDK1 con el tratamiento de 10 UI/ml de la IL-2 entre los 30 minutos y 10 h, mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de estos genes después del tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2.

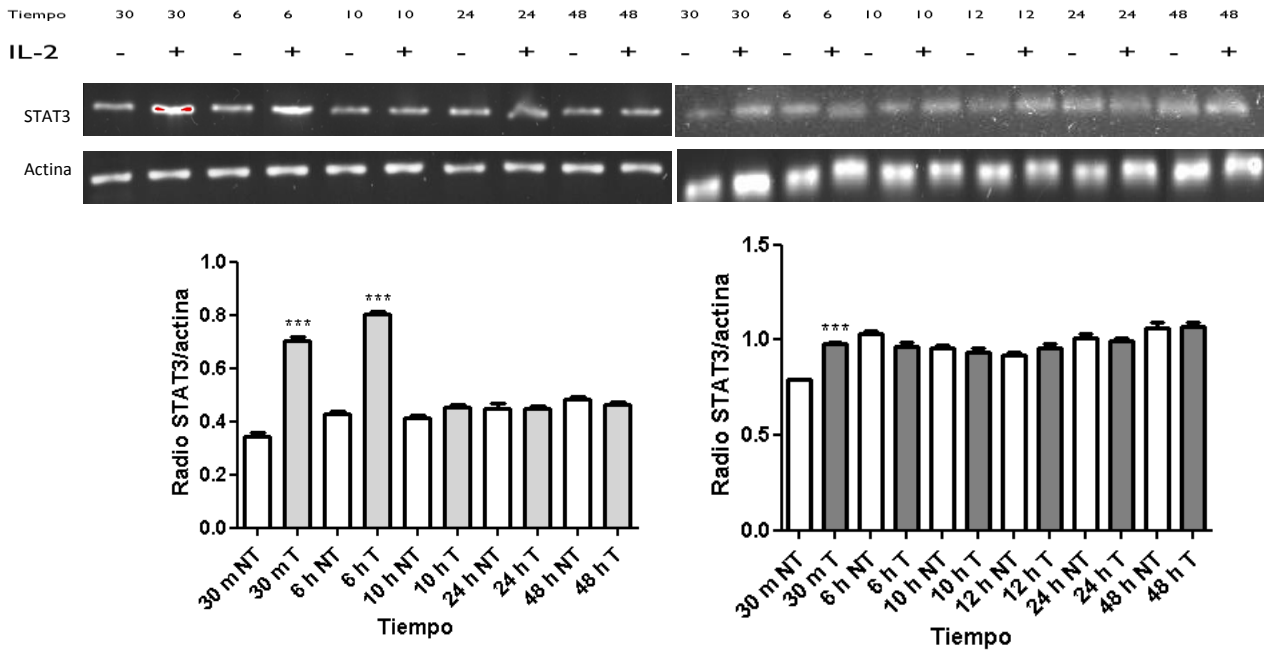


Figura 13. Expresión de STAT3. Después del tratamiento con la IL-2 en la línea celular SiHa, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que el tratamiento de 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de STAT3 a las 30 m y 6 h, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 no genera un cambio significativo en ninguna condición en la línea celular SiHa con respecto a los controles. (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

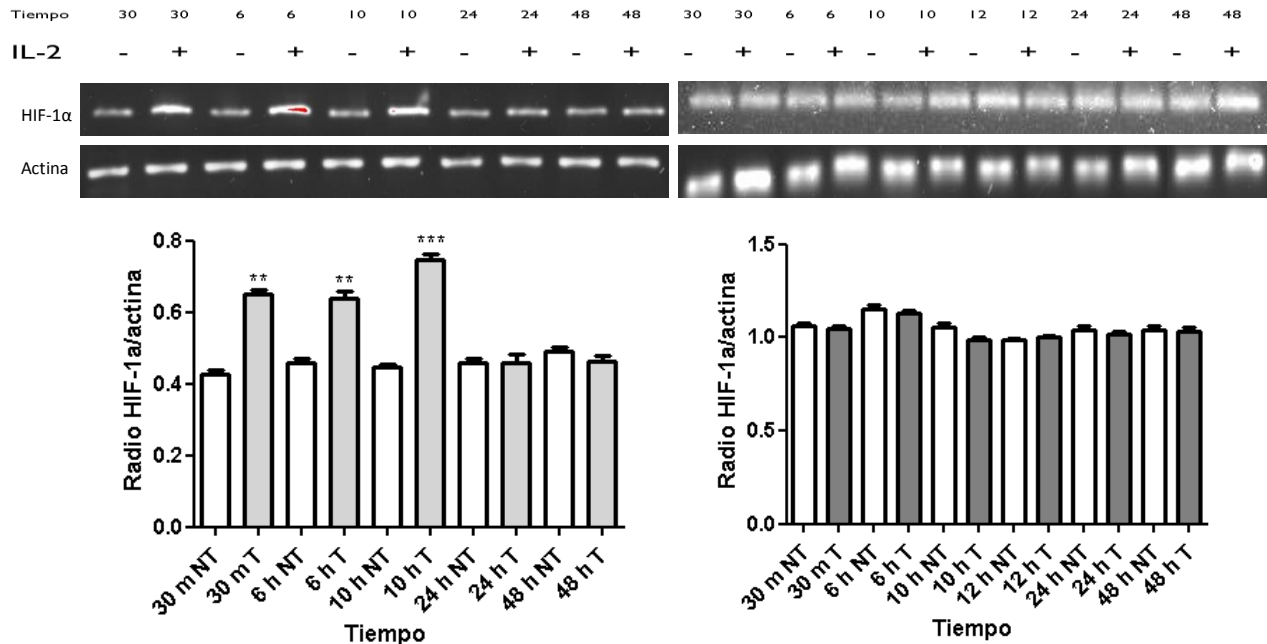


Figura 14. Expresión de HIF-1α. Después del tratamiento con la IL-2 en células SiHa, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que el tratamiento de 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de HIF-1α a las 30 m, 6 h y 10 h, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 no generó un cambio significativo en ninguna condición

en la línea celular SiHa con respecto a los controles. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$.

NT=No tratadas

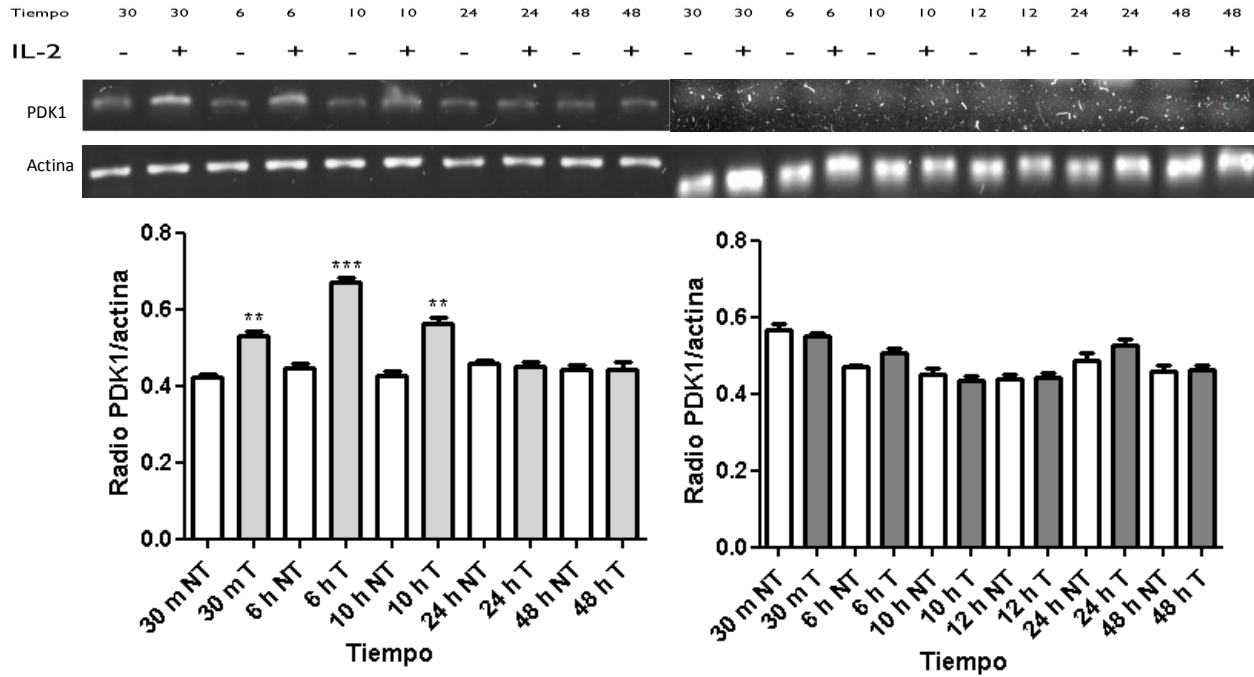


Figura 15. Expresión de PDK1. Después del tratamiento con la IL-2 en células SiHa, se observó que el tratamiento de 10 UI de la IL-2 (izquierda) aumenta la expresión de PDK1 a las 30 m, 6 h y 10 h (izquierda), por el contrario el tratamiento con 100 UI (derecha) de la IL-2 no genera un cambio significativo en ninguna condición en la línea celular SiHa con respecto a los controles. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

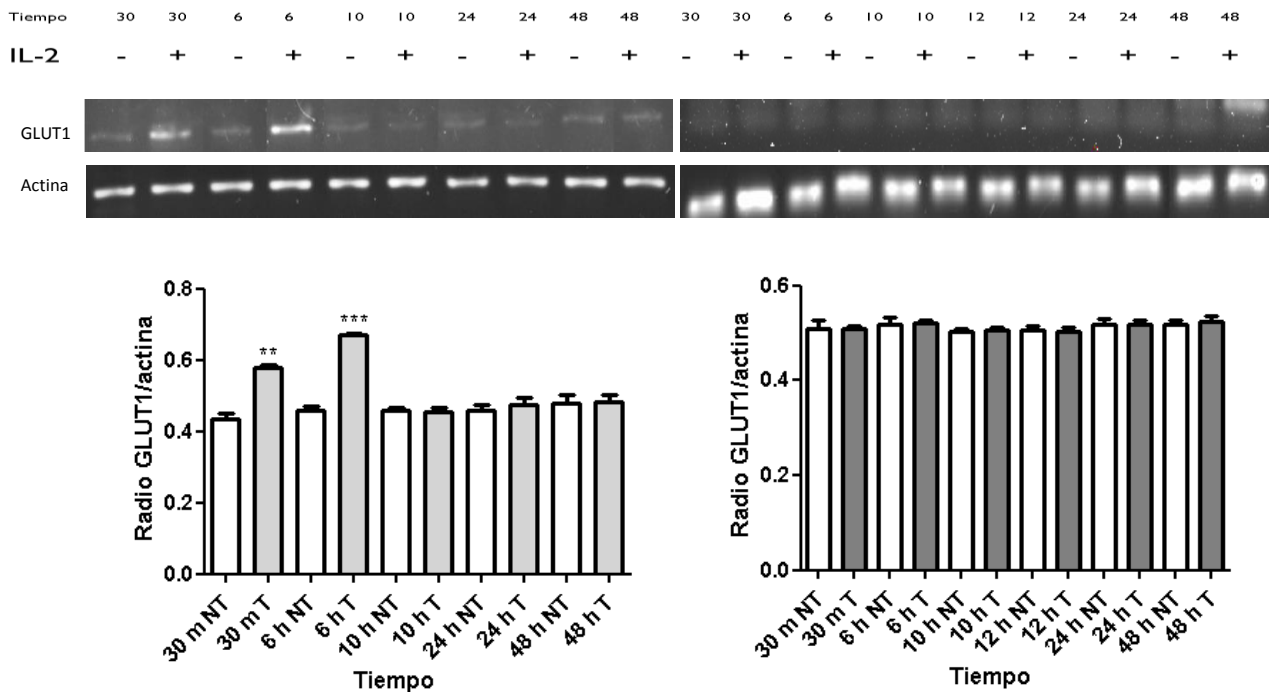


Figura 16. Expresión de GLUT1. Después del tratamiento con la IL-2 en células SiHa, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que el tratamiento de 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de GLUT1 a las 30 m y 6 h , por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 no genera un cambio significativo en ninguna condición en la línea celular SiHa con respecto a los controles. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

La expresión génica de STAT3, HIF-1 α , GLUT1 y PDK1 aumenta después del tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2, mientras que el tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2 disminuye la expresión de estos genes en la línea celular INBL

Para determinar el efecto de la IL-2 sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, se incubaron células INBL en presencia de 10 y 100 UI/ml de la citocina durante diferentes tiempos, como se mencionó anteriormente.⁴⁴

Los resultados muestran la presencia de bandas que corresponden al tamaño esperado del producto de PCR, en todos los carriles y en todas las condiciones. Como se puede observar en las figuras 17, 18, 19 y 20 se encontró un aumento en la expresión de los genes STAT3, HIF-1 α , GLUT1 y PDK1 con el tratamiento de 10 UI/mL de la IL-2, mientras que se observó una disminución en la expresión de estos genes después del tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2.

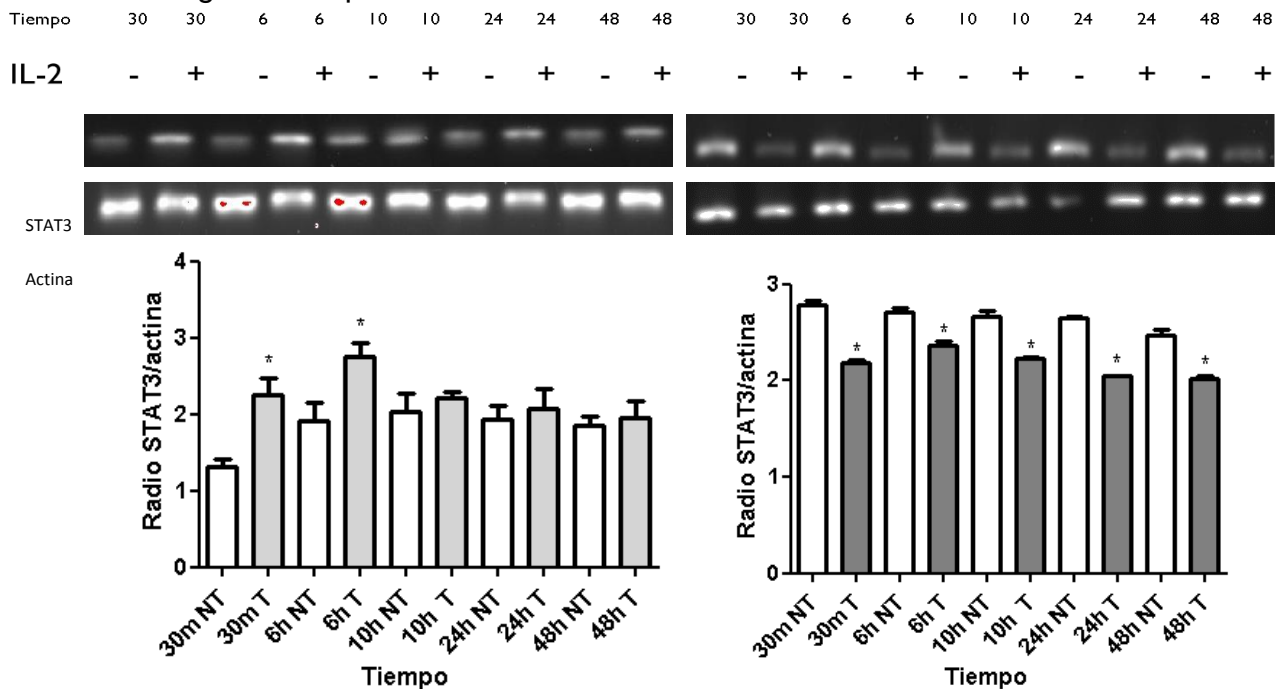


Figura 17. Expresión de STAT3. Después del tratamiento con la IL-2 en células INBL, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que con 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de STAT3 a las 30 m y 6 h, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 disminuyó la expresión de STAT3 en todas las condiciones en la línea celular INBL con respecto a los controles. (*)= $P \leq 0.05$. NT=No tratadas

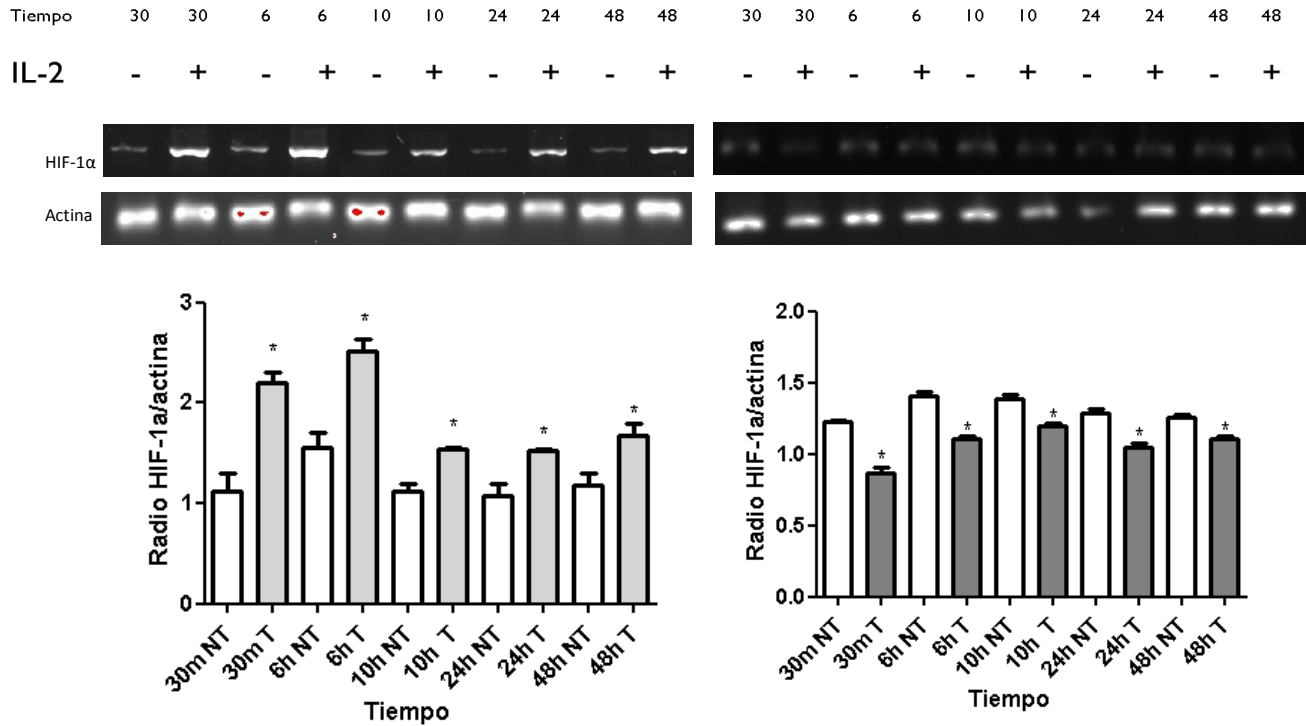


Figura 18. Expresión de HIF-1α. Después del tratamiento con la IL-2 en células INBL, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que con 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de HIF-1α en todas las condiciones, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 disminuye la expresión de HIF-1α en todas las condiciones en la línea celular INBL con respecto a los controles. (*)= $P \leq 0.05$. NT=No tratadas

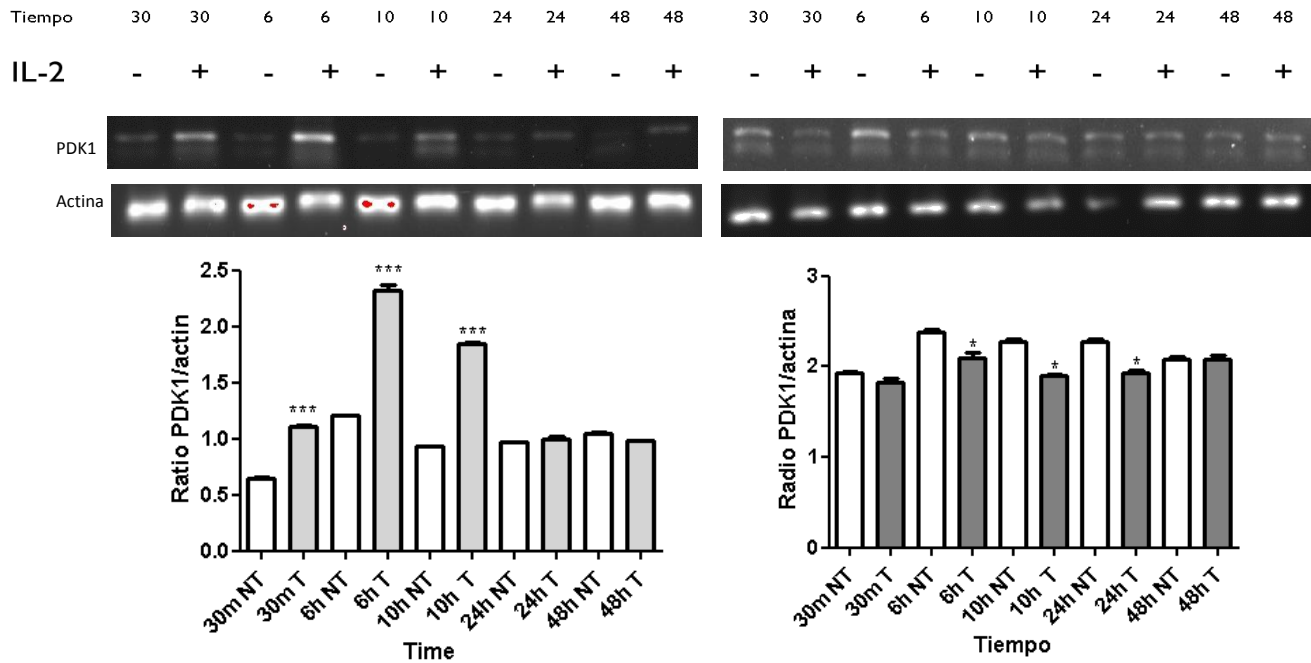


Figura 19. Expresión de PDK1. Después del tratamiento con la IL-2 en células INBL, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que con 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de PDK1 a los 30 m, 6 h y 10 h, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 disminuye la expresión de PDK1 a las 6 h, 10 h y 24 h en la línea celular INBL con respecto a los controles. (*)= $P \leq 0.05$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

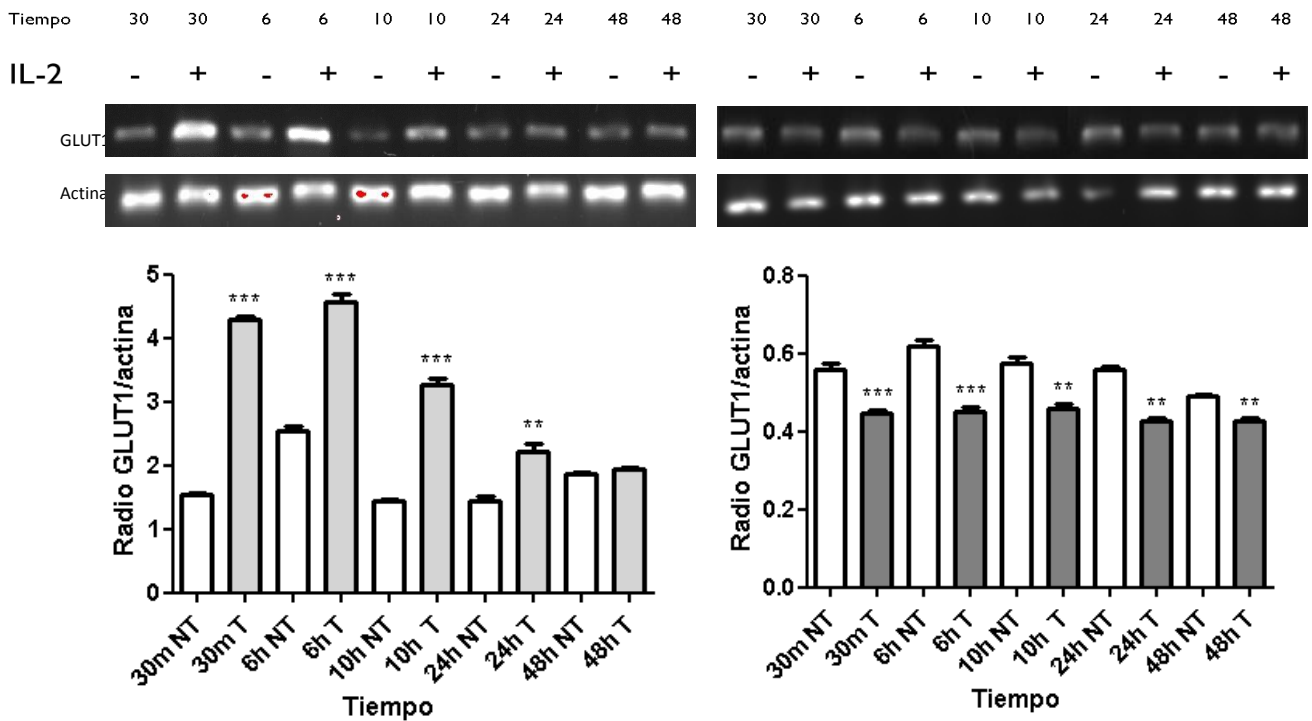


Figura 20. Expresión de GLUT1. Después del tratamiento con la IL-2 en células INBL, ya sea con 10 UI (izquierda) o 100 UI (derecha) se observó que con 10 UI de la IL-2 aumenta la expresión de GLUT1 en todas las condiciones con excepción de 48 h, por el contrario el tratamiento con 100 UI de la IL-2 disminuye la expresión de STAT3 en todas las condiciones en la línea celular INBL con respecto a los controles. (**)= $P \leq 0.01$, (***)= $P \leq 0.001$. NT=No tratadas

La producción de ATP aumenta a las 10 horas en presencia de 10 UI o 100 UI de la IL-2 en la línea celular INBL

Para determinar el efecto de la IL-2 sobre la producción de ATP en la línea celular INBL, se incubaron las células de CaCu en presencia de 10 UI o 100 UI de la IL-2 a diferentes tiempos y la cantidad de ATP se evaluó por medio de luminometría.

En la figura 21 podemos observar que hubo un aumento significativo en la producción de ATP a las 10 horas, independientemente del tratamiento de IL-2 en la línea celular INBL.

El aumento con el tratamiento con 10 UI/ml de la IL-2 puede correlacionar con el aumento de la expresión que observamos de los genes clave para el cambio metabólico conocido como efecto Warburg, para la producción elevada de energía así como el aumento en la proliferación. De manera similar, el tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2 generó un aumento significativo en la producción de ATP lo cual sugiere la producción del ATP por medio de la cadena de transporte de electrones. Además al no aumentar la proliferación sugiere que este ATP podría utilizarse en otras actividades tales como autofagia, biosíntesis y el mantenimiento de otros procesos vitales.

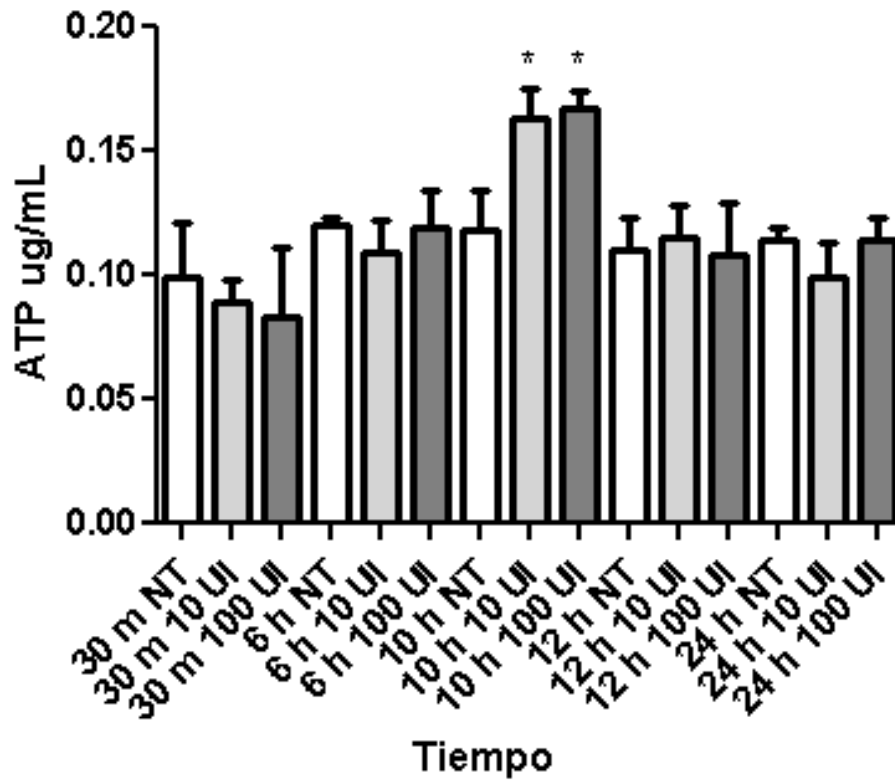


Figura 21. Producción del ATP en las células INBL. Después del tratamiento con 10 y con 100 UI/mL de la IL-2, se observa un aumento de la producción de ATP a las 10 horas con respecto a los controles. (*)= $P \leq 0.05$. NT=No tratadas

Discusión

El cáncer es una enfermedad caracterizada por una proliferación sucesiva e incontrolada de células tumorales y representa una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en México. En particular, el CaCu representa la segunda causa de muerte en México solo por debajo del cáncer de mama, por lo que es un problema de salud pública relevante.^{1, 2}

Recientemente se han descrito algunas características presentes en tumores de diversas estirpes. Entre estas características se encuentran la desregulación del metabolismo energético de la célula. En condiciones fisiológicas normales la obtención de energía se encuentra ampliamente regulada, las vías de señalización encargadas de la producción de energía tienen puntos de regulación tanto negativa como positiva. Entre las vías más importantes encargadas de la regulación bioenergética se encuentra la vía JAK-STAT.²

La vía JAK-STAT está relacionada con efectos proliferativos que pueden llevar al desarrollo de un tumor. Esta vía es activada por varios factores de crecimiento y citocinas entre las que se encuentran la IL-2.^{14, 15}

La IL-2 es una citocina involucrada en la regulación de la respuesta inmune, y se considera un potente activador de la proliferación y función de los linfocitos T y las células NK. Nuestros resultados sugieren que la IL-2 funciona como factor de crecimiento para las células tumorales, con 10 UI/ml de la IL-2 la proliferación de las células tumorales de cáncer de cérvix SiHa e INBL aumenta desde las 24 h hasta las 72 h (Figuras 8 y 9), mientras que no es significativo en linfocitos (Figura 10), lo cual concuerda con los datos publicados por Valle Mendiola en 2014 y Lagunas Cruz en 2019 donde observaron que en las líneas celulares HeLa, Calo e INBL hubo un aumento de proliferación con respecto a los controles. Además, la concentración concuerda con la cantidad normal presente en suero que oscila de 8 UI/mL a 12 UI/mL donde los linfocitos requieren esta cantidad para sobrevivir, mientras que las células tumorales la requieren para proliferar.^{6, 8, 9, 11, 13}

Por el contrario, el tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2 disminuyó la proliferación en células tumorales de cáncer de cérvix SiHa e INBL, mientras que en los linfocitos ésta aumentó de manera significativa, como lo observaron Valle Mendiola en 2014 y Lagunas Cruz en 2019 usando la misma concentración de IL-2 en las líneas celulares HeLa, Calo e INBL. Es probable que en las condiciones de cultivo *in vitro* haya una saturación de los receptores de IL-2 en las líneas celulares SiHa e INBL y en consecuencia disminuyó la proliferación.^{6, 9, 13, 24, 44}

Cabe destacar que todos los resultados publicados por nuestro grupo de investigación se han realizado en líneas celulares positivas para VPH-18. Los resultados obtenidos para la línea celular SiHa, positiva para VPH-16 concuerdan con los obtenidos para las células VPH-18+, lo que sugiere que el comportamiento es similar independientemente del genotipo viral. Sin embargo, aunque el comportamiento es similar, la respuesta producida por la línea celular SiHa es relativamente menor comparada con la observada en la línea celular INBL, esto puede deberse a la etapa de desarrollo del tumor de donde provienen. La línea celular SiHa proviene de un tumor etapa II mientras que la línea celular INBL proviene de un tumor en etapa IV, aunado a esto se conoce que la expresión de la E7 en INBL es 100 veces mayor que en SiHa, lo que puede contribuir a su respuesta.^{6, 8, 9, 11, 13, 24, 43}

Tomando en cuenta los resultados de proliferación, es importante señalar que la vía JAK/STAT está ligada a la proliferación en estas líneas celulares por lo que la activación de las proteínas STAT3 y STAT5 mediante fosforilación es importante para iniciar la función de éstas.

La respuesta al tratamiento de la IL-2 y los resultados obtenidos por Rangel Corona en 2010 donde demostró que las células de cáncer expresan los genes de las tres subunidades del IL-2R, además, Lagunas Cruz en 2020 demostró que las tres subunidades de este receptor se encuentran en la superficie de células de CaCu, lo que sugiere la presencia de un receptor de IL-2 funcional en estas líneas celulares de CaCu. La interacción del IL-2R y su ligando promueve la dimerización y trimerización del receptor y la consecuente fosforilación de JAK lo que lleva al

reclutamiento y activación de las STATs. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2 induce un aumento en la fosforilación en tirosina 705 de STAT3 de manera significativa en las líneas celulares SiHa e INBL, lo cual correlaciona con el aumento de proliferación (Figura 10). Esto sugiere que STAT3 tiene un papel importante en proliferación y supervivencia en estas líneas celulares de CaCu. Por el contrario, la fosforilación disminuye después del tratamiento con 100 UI/ml de la IL-2 lo que implica una disminución de la activación de este factor de transcripción (Figura 11). Estos resultados concuerdan con los publicados por Guanizo en 2018, donde muestran que la fosforilación en el residuo de tirosina 705 en STAT3 aumenta su actividad y su función. Además, Dubovy y colaboradores en 2018 demostraron la función de la fosforilación no solo de tirosina 705, sino en un residuo en serina 727 donde aumenta su efecto como factor de transcripción.^{24, 47, 48}

Cabe destacar que se observa una disminución a los 35 minutos de la fosforilación en tirosina 705 de STAT3 después del tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2, lo cual sugiere que hay una translocación al núcleo.²⁴

La línea celular de cáncer de cérvix INBL tiene activa de manera constitutiva la proteína STAT5 mediante fosforilación en el residuo de tirosina 705 como lo demostró Valle Mendiola en 2014, donde, de igual manera, este factor de transcripción está ligado a efectos protumorales como proliferación y supervivencia celular. Por otra parte, la fosforilación en el residuo de tirosina 705 en el dominio SH2 de STAT3 indica una forma activa de la proteína para llevar a cabo sus funciones como factor de transcripción. Nuestros resultados muestran una activación constitutiva de STAT3 en la línea celular INBL. Sin embargo, en la línea celular SiHa no está activa de manera constitutiva (Figura 10).^{13, 24, 49, 50, 51}

Es importante tomar en cuenta que la activación constitutiva de STAT3 es un motivo de controversia debido a que muchos autores sugieren que STAT3 no se encuentra fosforilado de manera constitutiva en tirosina 705 en la línea celular SiHa tal como sugieren Morgan en 2019, Zeng en 2018 y Walch en 2016, donde no encontraron la fosforilación basal en Y705 de STAT3. Contrario a esto, hay

otros autores que sugieren que hay una fosforilación constitutiva de STAT3, entre ellos se encuentran Shukla en 2013 y Chen en 2007 quienes observaron una fosforilación basal en el residuo de tirosina 705 en STAT3.^{49, 50, 51, 52, 53}

Algunas observaciones sugieren que existe una correlación importante entre STAT3 y el metabolismo celular, proceso que está regulado de manera aberrante en células de cáncer. Se ha demostrado que la activación constitutiva de STAT3 promueve la glucólisis mediante la inducción transcripcional de HIF- α y de la disminución de la actividad mitocondrial. Todo esto en otros tipos de cáncer tales como el de mama, sin embargo en CaCu no existen estudios que sustenten esta correlación.³¹

Después de la activación mediante la fosforilación, STAT3 es capaz de migrar a núcleo mediante importinas y funcionar como factor de transcripción para algunos genes importantes para el cambio metabólico conocido como efecto Warburg, tales como PDK, HIF-1 α , HK y GLUT-1.^{23, 24}

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 10 UI/ml durante diferentes tiempos (30 minutos, 6 horas y 10 horas) aumenta la expresión en genes clave para el cambio metabólico en las células tumorales de cáncer de cérvix SiHa, lo cual concuerda con los resultados publicados por Demaria y colaboradores en 2010. Ellos demostraron que en células de cáncer de mama mediante un modelo Knock-In de STAT3 se observa un aumento de HIF-1 α y GLUT1, además de la disminución de PDH, con lo cual se demuestra el efecto oncogénico de STAT3 en un modelo *in vivo*.²³

De la misma manera, nuestros resultados muestran un aumento en PDK1, STAT3, HIF-1 α y GLUT1 en 6 y 10 horas (Figuras 13-16), lo que sugiere que son necesarios para entrar a fase S, considerando que la fase G1 en estas líneas celulares es de aproximadamente 10-12 horas, como fue demostrado por nuestro grupo de investigación.⁴⁴ Lo anterior sugiere que la vía de JAK-STAT3 juega un papel importante en la proliferación y mantenimiento tumoral, además de corroborar el resultado del tratamiento de 10 UI de la IL-2 en la proliferación en la

línea celular SiHa siendo estos genes clave para la producción de ATP mediante el efecto Warburg a través de STAT3 manteniendo la expresión de HIF-1 α , el cual a su vez mantiene la expresión de PDK1 y GLUT1. De igual manera, cabe destacar, que aunque STAT3 tiene como blanco a HIF-1 α , también es blanco génico de HIF-1 α formando un loop de expresión génica, al parecer, necesario para el mantenimiento tumoral.^{23, 44, 58}

En tejido normal, aproximadamente 10% de la energía de la célula se genera por glucólisis, mientras que la respiración aeróbica que tiene lugar en la mitocondria contribuye con 90%. Sin embargo, en tejidos tumorales, aproximadamente el 50% de la energía celular se genera por glucólisis, y la energía restante es generada en la mitocondria, este cambio se mantiene aun cuando el O₂ presente es suficiente para mantener la función mitocondrial (glucólisis anaerobia). Esta característica de las células tumorales de mostrar un elevado radio de glucólisis mientras continúan creciendo aún bajo condiciones de normoxia se correlaciona con el incremento de la expresión de enzimas glucolíticas y de transportadores de glucosa, estos cambios pueden deberse a la activación de factores de transcripción, como HIF-1 α o las STATs. HIF-1 α es capaz de regular el cambio metabólico a glucólisis aerobia en células bajo condiciones de hipoxia o de normoxia, por otra parte la transcripción de HIF-1 α es controlada mediante STAT3. Además, muchos de los genes regulados por el HIF-1 α están relacionados con el metabolismo de la glucosa, por lo que esta proteína estimula la glucólisis debido a la activación de transportadores de glucosa y de enzimas glucolíticas. El HIF- α también es capaz de bloquear la fosforilación oxidativa mitocondrial evitando la entrada del piruvato y su transformación en acetil-CoA. Esta vía dependiente de HIF- α estimula la glucólisis e inhibe el consumo mitocondrial de O₂, promoviendo la sobrevivencia celular, aún en condiciones de hipoxia aguda y prolongada, además STAT3 puede traslocar a mitocondria formando un complejo con la proteína GRIMM19, disminuyendo la actividad mitocondrial mediante la interacción con los complejos I y III de la cadena respiratoria disminuyendo la cantidad de producción de ROS y así la apoptosis y senescencia. También, STAT3 bloquea los poros dependientes

de voltaje evitando la salida de compuestos como el citocromo C para evitar la señalización de las caspasas y la vía intrínseca de la apoptosis.^{29, 31, 32, 57}

A diferencia del tratamiento con 10 UI de la IL-2, nuestros resultados con 100 UI de la IL-2 en la línea celular de cáncer de cérvix SiHa no muestran cambio significativo alguno sobre los genes STAT3, HIF-1 α , PDK1 y GLUT1 en las condiciones de estudio (Figuras 13-16), lo cual sugiere un aparente estado no proliferativo. Esto concuerda con los resultados obtenidos para proliferación donde observamos una disminución significativa después del tratamiento con 100 UI de esta citocina. En otro orden de ideas, Lagunas Cruz en 2019 reportó que el tratamiento con 100 UI de la IL-2 genera una detención en la fase G1 de estas líneas celulares de carcinoma de cérvix, además de que son resistentes a la apoptosis, lo que puede tener una relación entre esta detención y la aparente disminución metabólica o estado quiescente en la línea celular SiHa, siendo estos genes importantes para la progresión a fase S del ciclo celular y al no cambiar la expresión la fase S se ve retrasada.^{6, 9, 44, 58}

El tratamiento con 10 UI/ml aumenta la expresión en genes clave para el cambio metabólico en las células tumorales de cáncer de cérvix INBL (Figuras 17-20), lo cual concuerda con los resultados publicados por Demaria y colaboradores (2010) donde observaron un aumento de HIF-1 α y GLUT1 en células de cáncer de mama, y la actividad de PDH disminuye en comparación con los controles. Además, Pawlus y colaboradores en 2013 demostraron que STAT3 y HIF-1 α trabajan en sinergia para conservar la progresión tumoral, consecuentemente observaron un aumento en la expresión de STAT3 y HIF-1 α . Esto sugiere que la vía de JAK-STAT3 juega un papel importante en la proliferación y mantenimiento tumoral en ambas líneas celulares independientemente del genotipo viral.^{6, 9, 46, 47, 58}

Por el contrario, el tratamiento con 100 UI de la IL-2 sobre la línea celular INBL disminuyó significativamente la expresión de PDK1, STAT3, HIF-1 α y GLUT1 en todas las condiciones (Figuras 17-20), lo cual sugiere una disminución metabólica mostrando una relación entre la disminución de la expresión génica y la disminución de la proliferación celular.^{6, 9}

Es interesante destacar que el tratamiento con 100 UI de la IL-2 en ambas líneas celulares muestra un comportamiento diferente, sin embargo, estos resultados correlacionan con la fosforilación observada después del tratamiento con 100 UI. El tratamiento con 100 UI en la línea celular SiHa mantiene la expresión de los genes PDK1, STAT3, HIF-1 α y GLUT1 mientras que no se observa fosforilación de STAT3, lo que sugiere que el tratamiento con 100 UI de IL-2 afecta la fosforilación, por lo que la expresión no se ve afectada. Por otra parte, el tratamiento con 100 UI de la IL-2 en la línea celular INBL disminuye significativamente la expresión de PDK1, STAT3, HIF-1 α y GLUT1 mientras que la fosforilación se ve disminuida. Estos resultados sugieren que la actividad de STAT3 está ampliamente ligada a la expresión de estos genes clave para el cambio metabólico y corrobora lo observado por Hashemi en 2020 que la disminución de STAT3 disminuye la expresión de HIF1- α en cáncer colorectal, melanoma y de mama de ratones, aunado a esto, autores como Fei (2014) y Priester (2013) observaron que al disminuir STAT3 y HIF1- α hay un aumento en la actividad antitumoral en glioblastoma y cáncer pancreático.^{59, 60, 61}

Tomando en cuenta los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación aunados con los resultados obtenidos en este proyecto se puede observar el efecto diferencial después del tratamiento con diferentes concentraciones de la IL-2 en células de CaCu.

Por una parte, el tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2 muestra un incremento en la fosforilación y activación de la STAT3, como consecuencia, aumenta la expresión de genes clave para el cambio metabólico conocido como efecto Warburg, que se ve reflejado en la producción de energía como el ATP, además, la proliferación aumenta significativamente (Figura 22).

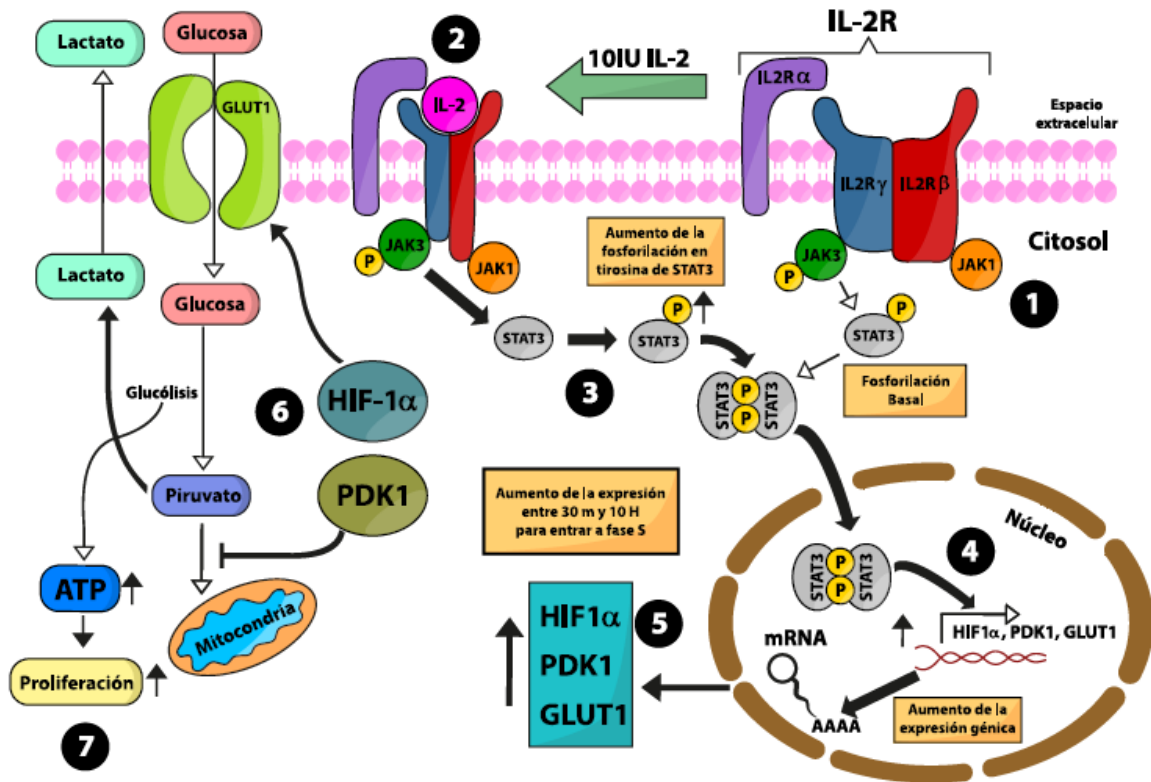


Figura 22. Efecto del tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2 sobre la STAT3 y el efecto Warburg. La fosforilación de JAK3 se encuentra constitutivamente activa en células de cáncer de cérvix (1), donde después del tratamiento con 10 UI/mL de la IL-2 (2), se observa un aumento en la fosforilación y activación de STAT3 (3) lo cual induce un aumento en la expresión de los blancos génicos de STAT3 (4) tales como PDK1, HIF-1 α y GLUT1 (5). Lo anterior sugiere un aumento en su efecto sobre el cambio metabólico (6), lo que da como resultado un aumento en la producción de ATP y la proliferación celular (7).

Por el contrario, el tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2 causa un efecto de disminución metabólica. La fosforilación de STAT3 disminuye, y por tanto disminuye la forma activa de este factor de transcripción, lo cual afecta la expresión de sus genes blanco, tales como PDK1, HIF-1 α y GLUT1. Sin embargo, aunque la proliferación decae significativamente la producción de energía en forma de ATP aumenta con respecto a los controles, lo cual sugiere que la producción de ATP, a pesar de que, probablemente, se obtenga de la cadena de

transporte de electrones o de la vía de las pentosas fosfato, puede utilizarse para mantener algunos procesos vitales tales como biosíntesis o autofagia, entre otros (Figura 23).⁶²

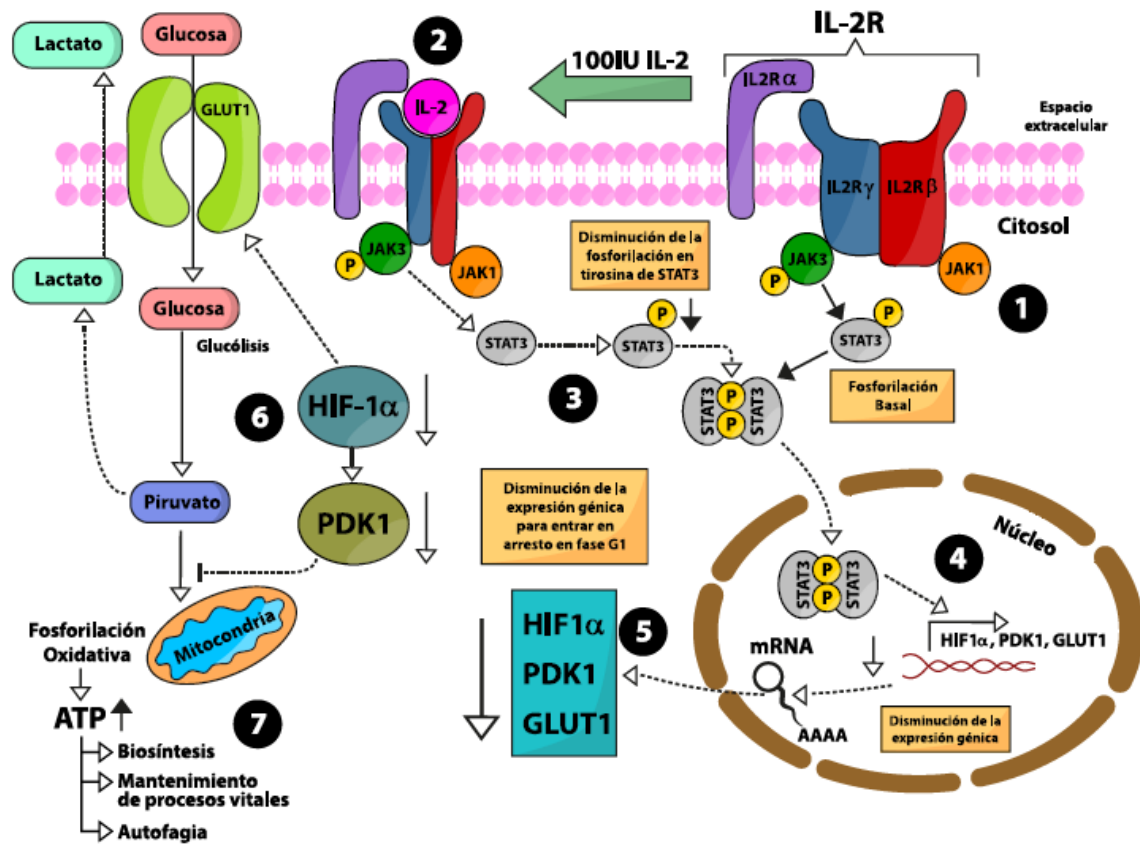


Figura 23. Efecto del tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2 sobre STAT3 y el efecto Warburg. La fosforilación de JAK3 se encuentra constitutivamente activa en células de cáncer de cérvix (1), donde después del tratamiento con 100 UI/mL de la IL-2 (2), se observa una disminución en la fosforilación y activación de STAT3 (3) provocando así una disminución en la expresión de los blancos génicos de STAT3 (4) tales como PDK1, HIF-1 α y GLUT1 (5), lo que sugiere un menor efecto sobre el cambio metabólico (6), lo que da como resultado una disminución significativa de la proliferación celular, a pesar de que la producción de energía en forma de ATP se ve aumentada (7), lo que sugiere que la energía es obtenida mediante fosforilación oxidativa o la vía de las pentosas fosfato y será utilizada para la biosíntesis, autofagia y el mantenimiento de procesos vitales.

Resumiendo lo planteado, la IL-2 juega un papel central en la iniciación, progresión y mantenimiento de la transformación maligna de las células de cáncer cervical, todo esto dependiendo de la concentración.

De la misma forma, nuestros resultados sugieren el papel fundamental de STAT3 como factor de transcripción sobre algunos genes clave en el efecto Warburg y necesarios para entrar en fase S, continuar con el ciclo celular y aumentar la proliferación celular.

Finalmente, el aumento de PDK1, HIF-1 α y GLUT1 demuestra la importancia de estos genes para el mantenimiento y la progresión tumoral, además de ser una de los principales reguladores de las vías de obtención de energía de la célula transformada.

Al parecer, STAT3 funciona como un centro integrador de diferentes señales de supervivencia y de crecimiento a nivel del metabolismo energético y respiratorio a través de sus actividades como regulador de la transcripción. Sin embargo, la manera en que STAT3 ejerce esta función en el CaCu podría ser mediante la transcripción de factores y genes clave para este cambio metabólico, aunque el efecto completo aún se desconoce.

La información generada en este proyecto nos ayuda a entender los mecanismos de señalización que utilizan estas células tumorales para reprogramar el metabolismo energético y poder proliferar eficientemente. Este conocimiento es útil ya que puede servir para en un futuro desarrollar tratamientos alternativos para el carcinoma de cérvix, ya que sugiere que STAT3 puede ser un blanco para el tratamiento de este cáncer.

Conclusiones

La activación de STAT3 reguló positivamente la expresión de los genes HIF-1 α , GLUT-1 y PDK-1 involucrados en el metabolismo energético, en respuesta a 10 UI de la IL-2 para aumentar la proliferación celular, mientras que con 100 UI la expresión de estos genes se vio disminuida, en células de cáncer de cérvix VPH-16 y VPH-18, para disminuir la proliferación de estas células.

En conclusión, tomando en cuenta nuestros resultados, y lo observado por nuestro grupo de investigación podemos sugerir a STAT3 como blanco terapéutico para generar tratamientos alternativos para el cáncer de cérvix.

Perspectivas

Se sugiere continuar con los experimentos para plantear un esquema más completo del efecto y el papel de STAT3 sobre células de CaCu *in vitro*.

Se sugiere continuar con:

- Western Blot para evaluación de la traducción de mRNA.
- Evaluación de la secreción de lactato.
- Evaluación del consumo de glucosa.
- Evaluación de la integridad mitocondrial y genes pro y antiapoptóticos.
- PCR Punto Final para genes mitocondriales
- Western Blot para evaluación de la traducción de mRNA de genes mitocondriales.
- Silenciamiento de STAT3 para observar el efecto sobre el metabolismo energético.

Bibliografía

1. Cáncer. (2020). Retrieved 2 May 2020, from <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
2. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
3. Serman, F. (2002). Cancer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano: perspectivas en prevención y tratamiento. *Revista Chilena De Obstetricia Y Ginecología*, 67(4). doi: 10.4067/s0717-75262002000400011
4. Zaldívar Lelo de Larrea, G., Martín Molina, F., Sosa Ferreyra, C., Ávila Morales, J., Lloret Rivas, M., Román Lara, M., & Vega Malagón, G. (2012). Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena De Obstetricia Y Ginecología*, 77(4), 315-321. doi: 10.4067/s0717-75262012000400014
5. Vallejo, V., & Velázquez, N. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 53(2), S172-7.
6. Lagunas-Cruz, M., Valle-Mendiola, A., Trejo-Huerta, J., Rocha-Zavaleta, L., Mora-García, M., & Gutiérrez-Hoya, A. et al. (2019). IL-2 Induces Transient Arrest in the G1 Phase to Protect Cervical Cancer Cells from Entering Apoptosis. *Journal Of Oncology*, 2019, 1-16. doi: 10.1155/2019/7475295
7. Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C. F., & Weiss-Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, 50(3), 273–277. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.013>
8. Rebollo, A., & Silva, A. (1994). Estructura y función del receptor de IL-2. *Inmunología*, 13(2), 39-48.
9. Valle-Mendiola, A., Gutiérrez-Hoya, A., Lagunas-Cruz, M. D. C., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2016). Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in

- Cervical Cancer. Mediators of Inflammation, 2016.
<http://doi.org/10.1155/2016/2849523>
10. Zhou, Y., Magnuson, K., Cheng, T., Gadina, M., Frucht, D., & Galon, J. et al. (2000). Hierarchy of Protein Tyrosine Kinases in Interleukin-2 (IL-2) Signaling: Activation of Syk Depends on Jak3; However, Neither Syk nor Lck Is Required for IL-2-Mediated STAT Activation. *Molecular And Cellular Biology*, 20(12), 4371-4380. doi: 10.1128/mcb.20.12.4371-4380.2000
 11. Rocha-Zavaleta, L., Huitron, C., Cacéres-Cortés, J., Alvarado-Moreno, J., Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. et al. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor- β signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular Signalling*, 16(11), 1239-1247. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.03.011
 12. Frank, D., Robertson, M., Bonni, A., Ritz, J., & Greenberg, M. (1995). Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 92(17), 7779-7783. doi: 10.1073/pnas.92.17.7779
 13. Valle-Mendiola, A., Weiss-Steider, B., Rocha-Zavaleta, L., & Soto-Cruz, I. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Investigation*, 32(4), 115–125. <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.883526>
 14. Bromberg, J., & Chen, X. (2001). STAT proteins: Signal transducers and activators of transcription. *Methods In Enzymology*, 138-151. doi: 10.1016/s0076-6879(01)33052-5
 15. Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. (2005). Vía JAK-STAT: una visión general. *Vertientes Revista Especializada En Ciencias De La Salud*, 8(1-2), 14-25.
 16. Kazuroni, I., & Warren, L. (2000). The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*, 37, 1-11.
 17. Delgoffe, G., & Vignali, D. (2013). STAT heterodimers in immunity. *JAK-STAT*, 2(1), e23060. doi: 10.4161/jkst.23060

18. Bromberg, J., Dvigan, G., & Yanxiang, Z. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295-303.
19. Resemann, H., Watson, C., & Lloyd-Lewis, B. (2014). The Stat3 paradox: A killer and an oncogene. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 382(1), 603-611. doi: 10.1016/j.mce.2013.06.029
20. Yuan, J., Zhang, F., & Niu, R. (2015). Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep17663
21. Barbieri, I., Pensa, S., Pannellini, T., Quaglino, E., Maritano, D., & Demaria, M. et al. (2010). Constitutively Active Stat3 Enhances Neu-Mediated Migration and Metastasis in Mammary Tumors via Upregulation of Pten. *Cancer Research*, 70(6), 2558-2567. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-2840
22. Qin, J., Yan, L., Zhang, J., & Zhang, W. (2019). STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1). doi: 10.1186/s13046-019-1206-z
23. Demaria, A., Giorgi, C., Lebiedzinska, M., Esposito, G., Bartoli, A., Gough, D. J., Turkson, J., Poli, V. (2010). STAT3-mediated metabolic change is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging*, 2(1), 823–842.
24. Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. (2020). Energy Metabolism in Cancer: The Roles of STAT3 and STAT5 in the Regulation of Metabolism-Related Genes. *Cancers*, 12(1), 124. doi: 10.3390/cancers12010124
25. Vander Heiden, M., Cantley, L., & Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033. doi: 10.1126/science.1160809
26. Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314. doi: 10.1126/science.123.3191.309
27. Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1926). Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klinische Wochenschrift*, 5(19), 829-832. doi: 10.1007/bf01726240

28. Da u, A., Toma-Da u, I., & Karlsson, M. (2003). Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Physics In Medicine And Biology*, 48(17), 2829-2842. doi: 10.1088/0031-9155/48/17/307
29. Zeng, W., Liu, P., Pan, W., Singh, S. and Wei, Y., 2015. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. *Cancer Letters*, 356(2), pp.263-267.
30. Lum, J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J., DeBerardinis, R., & Covelto, K. et al. (2007). The transcription factor HIF-1 plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & Development*, 21(9), 1037-1049. doi: 10.1101/gad.1529107
31. Brahim-Horn, M., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current Opinion In Cell Biology*, 19(2), 223-229. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.003
32. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G., & Dang, C. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic change required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177-185. doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002
33. Liberti, M., & Locasale, J. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends In Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
34. Stacpoole, P. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *JNCI: Journal Of The National Cancer Institute*, 109(11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djx071>
35. Navarro, A., & Loeches, M. (2020). Piruvato deshidrogenasa – ChemEvol. [Www3.uah.es](http://www3.uah.es). Retrieved 14 May 2020, from <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/piruvato-deshidrogenasa/>.
36. Sradhanjali, S., & Reddy, M. (2018). Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase as a Therapeutic Strategy against Cancer. *Current Topics In Medicinal Chemistry*, 18(6), 444-453. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180523105756>

37. Commander, R., Wei, C., Sharma, A., Mouw, J., Burton, L., & Summerbell, E. et al. (2020). Subpopulation targeting of pyruvate dehydrogenase and GLUT1 decouples metabolic heterogeneity during collective cancer cell invasion. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15219-7>
38. Qian, Y., Wu, X., Wang, H., Hou, G., Han, X. and Song, W., 2020. MicroRNA-4290 suppresses PDK1-mediated glycolysis to enhance the sensitivity of gastric cancer cell to cisplatin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 53(5).
39. Shao, M., Yu, Z., & Zu, J. (2020). LncRNA-SNHG16 Silencing Inhibits Prostate Carcinoma Cell Growth, Downregulate GLUT1 Expression and Reduce Glucose Uptake. *Cancer Management And Research*, 12, 1751-1757.
40. Xiao, H., Wang, J., Yan, W., Cui, Y., Chen, Z., & Gao, X. et al. (2017). GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer. *The Prostate*, 78(2), 86-94. <https://doi.org/10.1002/pros.23448>
41. Ohnishi, T., Kusuyama, J., Bandow, K., & Matsuguchi, T. (2020). Glut1 expression is increased by p53 reduction to change metabolism to glycolysis during osteoblast differentiation. *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/bcj20190888
42. Zheng, Y., Chen, Y., Jiang, H., Zhang, H., Wang, H., Xu, J., & Yu, Z. (2020). Circ_0058063 upregulates GLUT1 expression and promotes glucose-uptake in esophageal squamous-cell carcinomas. *Journal Of Thoracic Disease*, 12(3), 925-931. doi: 10.21037/jtd.2019.12.5
43. Wang, Y., Lu, Z., Wang, N., Zhang, M., Zeng, X., & Zhao, W. (2017). MicroRNA-1299 is a negative regulator of STAT3 in colon cancer. *Oncology Reports*, 37(6), 3227-3234. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5605>
44. Morales de la Cruz, P. F. (2020). Efecto de interleucina-2 sobre la expresión y activación de CDK2 en líneas de cáncer cervicouterino. Tesis para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza. UNAM.
45. Snyder, M., Huang, X.-Y., & Zhang, J. J. (2007). Identification of Novel Direct Stat3 Target Genes for Control of Growth and Differentiation. *Journal of*

- Biological Chemistry, 283(7), 3791-3798.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m706976200>
46. Pawlus, M. R., Wang, L., & Hu, C.-J. (2013). STAT3 and HIF1 α cooperatively activate HIF1 target genes in MDA-MB-231 and RCC4 cells. *Oncogene*, 33(13), 1670-1679. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.115>
47. Guanizo, A. C., Fernando, C. D., Garama, D. J., & Gough, D. J. (2018). STAT3: a multifaceted oncoprotein. *Growth Factors*, 36(1-2), 1-14. <https://doi.org/10.1080/08977194.2018.1473393>
48. Dubový, P., Hradilová-Sviženská, I., Klusáková, I., Kokošová, V., Brázda, V., & Joukal, M. (2018). Bilateral activation of STAT3 by phosphorylation at the tyrosine-705 (Y705) and serine-727 (S727) positions and its nuclear translocation in primary sensory neurons following unilateral sciatic nerve injury. *Histochemistry and Cell Biology*, 150(1), 37-47. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1656-y>
49. Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2019). Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1—NF κ B—IL-6 signalling axis. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007835. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007835>
50. Zeng, Y.-T., Liu, X.-F., Yang, W.-T., & Zheng, P.-S. (2019). REX1 promotes EMT-induced cell metastasis by activating the JAK2/STAT3-signaling pathway by targeting SOCS1 in cervical cancer. *Oncogene*, 38(43), 6940-6957. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0906-3>
51. Walch-Rückheim, B., Pahne-Zeppenfeld, J., Fischbach, J., Wickenhauser, C., Horn, L. C., Tharun, L., Büttner, R., Mallmann, P., Stern, P., Kim, Y.-J., Bohle, R. M., Rube, C., Ströder, R., Juhasz-Böss, I., Solomayer, E.-F., & Smola, S. (2016). STAT3/IRF1 Pathway Activation Sensitizes Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Cancer Research*, 76(13), 3872-3883. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-1306>
52. Parwani, A. V. (2008). Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine*, 2008, 142-143. [https://doi.org/10.1016/s1077-9108\(08\)70622-4](https://doi.org/10.1016/s1077-9108(08)70622-4)

53. Shukla, S., Mahata, S., Shishodia, G., Pandey, A., Tyagi, A., Vishnoi, K., Basir, S. F., Das, B. C., & Bharti, A. C. (2013). Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-Mediated Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE*, 8(7), e67849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067849>
54. Monroy GA et al. (1992) Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cervicouterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleína-1, *Revista Mexicana de Oncología*, 7:69–76.
55. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, Waga K, Rangel-Corona R, Monroy-Garcia A, Rocha-Zavaleta L, Urdiales-Ramos J, Weiss-Steider B, Haman A, Hugo P, Brousseau R, Hoang T. (2001) Implication of tyrosine kinase receptor and steel factor in cell density-dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Research*. 61(16):6281-6289
56. Alcántara-Montiel, J. C., & Vega-Torres, B. I. (2016). Síndrome hiper-IgE. Lecciones de la función y defectos de STAT-3 o DOCK-8. *Revista Alergia México*, 63(4), 385. <https://doi.org/10.29262/ram.v63i4.217>
57. Dasu A, Toma-Dasu I, Karlsson M. (2003). Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Physics in Medicine and Biology*. 48: 2829–2842
58. Jung, J. E., Lee, H. - G., Cho, I. - H., Chung, D. H., Yoon, S. - H., Yang, Y. M., Lee, J. W., Choi, S., Park, J. - W., Ye, S. - K., & Chung, M. - H. (2005). STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *The FASEB Journal*, 19(10), 1296-1298. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3099fje>
59. Niu, F., Li, Y., Lai, F.-F., Ni, L., Ji, M., Jin, J., Yang, H.-Z., Wang, C., Zhang, D.-M., & Chen, X.-G. (2015). LB-1 Exerts Antitumor Activity in Pancreatic Cancer by Inhibiting HIF-1 α and Stat3 Signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2212-2223. <https://doi.org/10.1002/jcp.24949>
60. Priester, M., Copanaki, E., Vafaizadeh, V., Hensel, S., Bernreuther, C., Glatzel, M., Seifert, V., Groner, B., Kogel, D., & Weissenberger, J. (2013). STAT3

- silencing inhibits glioma single cell infiltration and tumor growth. *Neuro-Oncology*, 15(7), 840-852. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not025>
61. Hashemi, V., Ahmadi, A., Malakotikhah, F., Chaleshtari, M. G., Baghi Moornani, M., Masjedi, A., Sojoodi, M., Atyabi, F., Nikkhoo, A., Rostami, N., Baradaran, B., Azizi, G., Yousefi, B., Ghalamfarsa, G., & Jadidi-Niaragh, F. (2020). Silencing of p68 and STAT3 synergistically diminishes cancer progression. *Life Sciences*, 249, 117499. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117499>
62. You, L., Wang, Z., Li, H., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., Sui, X., Pan, H., & Han, W. (2015). The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*, 11(5), 729-739. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017192>

Anexos

RPMI 1640

Composición:

Components		mg/L final medium
Inorganic salts	Calcium chloride x 2H ₂ O	62,27
	Potassium chloride	400
	Magnesium sulfate dried	69,77
	Sodium chloride	5950,49
	Sodium nitrate	72
	di-Sodium hydrogen phosphate anhydr.	800
Other Components	D(+)-Glucose anhydr.	2000
	L-Glutathione red.	1
Amino acids	L-Arginine x HCl	241,86
	L-Asparagine x H ₂ O	50
	L-Aspartic acid	20
	L-Cystine	50
	L-Glutamic acid	20
	Glycine	10
	L-Histidine base	15
	L-Hydroxyproline	20
	L-Isoleucine	50
	L-Leucine	50
	L-Lysine x HCl	40
	L-Methionine	15
	L-Phenylalanine	15
	L-Proline	20
	L-Serine (non animal origin)	30
	L-Threonine	20
	L-Tryptophan	5
	L-Tyrosine	20
	L-Valine	20
	Vitamins	4-Amino benzoic acid
D(+)-Biotin		0,2
D-Calcium pantothenate		0,25
Choline chloride		3
Folic acid		1
myo-Inositol		35
Nicotinamide		1
Pyridoxine x HCl		1
Riboflavin		0,2
Thiamine x HCl		1
Vitamin B12	0,005	

DMEM

Composición:

	Components	mg/L final medium:13,44g/L
Inorganic	Calcium chloride x 2H ₂ O	264,92
salts	Iron(III) nitrate x 9H ₂ O	0,10
	Potassium chloride	400,00
	Magnesium sulfate dried	139,57
	Sodium chloride	6400,00
	Sodium dihydrogen phosphate x H ₂ O	125,00
Other	D(+)-Glucose anhydr.	4500,00
Components	Phenol red	15,00
Amino acids	L-Arginine x HCl	84,00
	L-Cystine	48,00
	L-Glutamine	584,00
	L-Glycin	30,00
	L-Histidine x HCl x H ₂ O	42,00
	L-Isoleucine	105,00
	L-Leucine	105,00
	L-Lysine x HCl	146,00
	L-Methionine	30,00
	L-Phenylalanine	66,00
	L-Serine (non animal origin)	42,00
	L-Threonine	95,00
	L-Tryptophan	16,00
	L-Tyrosine	72,00
	L-Valine	94,00
Vitamins	D-Calcium pantothenate	4,00
	Choline chloride	4,00
	Folic acid	4,00
	myo-Inositol	7,20
	Nicotinamide	4,00
	Pyridoxal x HCl	4,00
	Riboflavin	0,40
	Thiamine x HCl	4,00

Soluciones utilizadas:

Verseno

Agregar:

- Tris base [H₂NC (CH₂OH)₃] 3.04 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 8.00 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0.04 g
- Etilendiamino Tetraacético (EDTA, C₁₀H₁₆N₂O₈) 0.40 g

Disolver con 500 mL de agua destilada

Ajustar el pH a 7.7 con HCl

Aforar a 1 L

PBS

Agregar:

- Cloruro de sodio (NaCl) 8.00 g
- Cloruro de potasio (KCl) 0.20 g
- Fosfato mono ácido de sodio (NaH₂PO₄) 2.16 g
- Fosfato di ácido de potasio (Na₂HPO₄) 0.20 g

Disolver con 100 mL de agua destilada

Ajustar pH a 7.2-7.4 con HCl

Aforar a 1 L

Cristal Violeta:

Agregar:

- Cristal violeta líquido 4.3 mL

Aforar a 100 mL

Buffer de Lisis

Agregar:

- Tritón 0.5 mL

- PMSF 1 M 500 μ L
- Ortovanadato 50 μ L
- EDTA 0.5 M 200 μ L
- NaCl 5 M 1.5 mL
- NaF 0.5 M 3 mL
- Pirofosfato 1 mL
- Tris 7.5 M 500 μ L

Buffer de Laemli 5X

Agregar:

- Tris pH 6.8 3.125 mL
- SDS 1g
- Azul de Bromofenol 0.005 g
- Glicerol 5 mL

Buffer de Laemli

Agregar:

- Buffer de Laemli 1X 450 μ L
- DTT 0.1M 40 μ L

Acrilamida-Bisacrilamida 30:08

Agregar:

- Acrilamida 30 g
- Bisacrilamida 0.8 g

Aforar a 100 mL

Gel de Poliacrilamida para SDS-PAGE

Gel Separador

Agregar:

- TRIS pH 8.8 3M 1.25 mL

- SDS 10% 100 μ L
- Acrilamida-Bisacrilamida 30:08 3.3 mL
- Agua destilada 4.8 mL
- Persulfato de amonio 10% 50 μ L
- TEMED 15 μ L

Gel Concentrador

Agregar:

- TRIS pH 6.8 1M 1.25 mL
- SDS 10% 50 μ L
- Acrilamida-Bisacrilamida 30:08 625 μ L
- Agua destilada 2.8 mL
- Persulfato de amonio 10% 25 μ L
- TEMED 7.5 μ L

Buffer de transferencia

Agregar:

- SDS 1.5 g
- Tris pH 8.0 9.1 g
- Glicina 43.2 g
- Metanol 600 mL
- Agua 221 mL

TBS

Agregar:

- TRIS pH 7.5 1M 20 mL
- Cloruro de sodio 5M (NaCl) 30 mL

Aforar a 1 L

TBS Tween

Agregar:

- Tween 50 μL

Aforar a 500 mL con TBS

Gel de Agarosa 1.5%

Agregar:

- Agarosa 1.5 g

Aforar a 100 mL