



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Participación de STAT5 en la regulación de genes
relacionados con el metabolismo energético mitocondrial
en células de cáncer de cérvix estimuladas con IL-2**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

RUBÉN ALEJANDRO FUENTES PASCACIO

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA

INVESTIGADOR CATEDRA CONAHCYT, FES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX, febrero de 2025



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Participación de STAT5 en la regulación de genes relacionados con el metabolismo energético mitocondrial en células de cáncer de cérvix estimuladas con IL-2

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mi autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente



FUENTES PASCACIO RUBEN ALEJANDRO
No de cuenta UNAM: 522013786

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Participación de STAT5 en la regulación de genes
relacionados con el metabolismo energético mitocondrial
en células de cáncer de cérvix estimuladas con IL-2**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

RUBÉN ALEJANDRO FUENTES PASCACIO

TUTORA PRINCIPAL: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA

INVESTIGADOR CATEDRA CONAHCYT, FES ZARAGOZA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX, febrero de 2025

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FES-ZARAGOZA)
OFICIO: CGEP/CPCB/ FESZ /0119/2025
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 Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de noviembre de 2024** 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 **FUENTES PASCACIO RUBÉN ALEJANDRO** con número de cuenta **522013786** con la tesis titulada "**Participación de STAT5 en la regulación de genes relacionados con el metabolismo energético mitocondrial en células de cáncer de cérvix estimuladas con IL-2**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
Vocal: DR. ÁLVARO MARÍN HERNÁNDEZ
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 30 de enero de 2025.

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RRH/EARR/rrh

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 Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo brindado (CVU: 1111298) y al apoyo del programa PAPIIT IN222121 e IN225324, DGAPA, UNAM.

A la Dra. María Isabel Soto Cruz por aceptarme a su grupo de investigación y fungir como tutora principal durante el posgrado. A los miembros del comité tutorial, la Dra. Adriana Gutiérrez Hoya y la Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por sus observaciones, asesoría y apoyo a este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A mis padres por darme la vida y la oportunidad de estudiar lo que amo.

A mi madre, la persona más bondadosa y amorosa del mundo. Admiro tu fortaleza, carácter, cariño y esfuerzo como persona y en especial como madre, siempre estaré para ti, como sé que tú estarás para mí. Te amo.

A mi padre, la persona más trabajadora y humilde de mi mundo. Si tuviera que describirte con una palabra sería: esfuerzo. Me enseñaste que en esta vida todo cuesta y que no hay mejor satisfacción que obtener algo con tus propias manos, además de que el origen de una persona no determina quien será en la vida, gracias por todo. Te amo

A mis hermanos, Jairo Antonio Fuentes Pascacio y Alma Yazmin Fuentes Pascacio, los cuales me han brindado tanta sabiduría y enseñanzas tanto de la carrera como de la vida, los amo.

Al laboratorio de Oncología Molecular (L9,planta baja UMIEZ), al Dr. Arturo Valle Mendiola, la Dra. Adriana Gutiérrez Hoya, el Dr. Octavio Alberto Zerecedo Carreón, el Mto. Christopher Bryan Romero Hernández, el Mto. Armando García Velasco, el Biólogo Iván Ortiz Garrido, la Bióloga Erika Anayatzin Covarrubias Negrete, el Biólogo Fernando Abdías López Alva y la estudiante Paola Katherine Castelan Silva, gracias por todo su apoyo a mi trabajo y a mi persona, los aprecio mucho y espero poder seguir compartiendo buenos momentos con ustedes, los quiero.

A mi compañero de laboratorio, compañero de vivienda y gran amigo, el candidato a doctor Rodrigo Rojas Mercado, me has enseñado mucho sobre la investigación y la vida. Gracias por tu amistad y apoyo.

A mis amigos del alma el Mto. Carlos David Uscanga Heredia y el biólogo Carlos Daniel Chontal Rodríguez, les agradezco por todos los buenos momentos, excelentes conversaciones y la gran amistad que tenemos.

A mis amigos y amigas de copas Manuel Ignacio Morales, Adrián Galicia Martínez, Cesar Fabián Pedraza Amaro, Mauricio Giovani Lopez Alvarez, Damaris Galindo Concha, Barbara Giovanna López Rubio, Daniel Alexis Carapia Rojas y Pedro Damián De La Cruz Rios, gracias por compartir momentos muy divertidos y escucharme cuando lo necesitaba.

Dedicatorias

A mis abuelas Caralampia y Luvia, las abuelas más amorosas del mundo, ustedes me criaron y me cuidaron desde que era un bebé. Gracias por tantos abrazos y besos. Las amo.

A mi abuelo Pepe†, por su sabiduría y consejos, me hubiese encantado que usted me hubiese visto como maestro y a mi abuelo Oscar†, por su cariño y tener siempre un excelente plato mareño para mí

A mi familia Oaxaqueña, me han brindado mucho amor, apoyo y muchas risas.

A mi familia de Chiapas, ustedes me han brindado apoyo de todo tipo, gracias por su calor y amor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA.....	25
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS	62

TABLA DE FIGURAS

Figura 1.- Características principales del cáncer.	4
Figura 2.- Progresión mediada por VPH a cáncer de cérvix.	6
Figura 3.- Acoplamiento del ligando IL-2 con su receptor específico (subunidades α β y γ)	8
Figura 4.- Vía de señalización JAK/STAT.	10
Figura 5.- Estructura de STAT5a y STAT5b.	13
Figura 6.- Efecto Warburg. Diferencias en las vías de glucólisis entre células normales y células cancerosas.	16
Figura 7.- Vía de señalización IL-2/JAK3/STAT5 en la regulación de genes mitocondriales. Figura creada por medio del programa BioRender.com ...	22
Figura 8.- Diseño experimental para evaluar la expresión de los genes de la FO en las líneas celulares SiHa y HeLa estimuladas con IL-2.	27
Figura 9.- Diseño experimental para evaluar la expresión de los genes relacionados con la FO en las líneas celulares SiHa y HeLa con silenciamiento e estimuladas con IL-2.	29
Programa y análisis estadístico.	31
Figura 10.- Diseño experimental para evaluar la translocación de STAT5 a la mitocondria.	32
Figura 11.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidoreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular SiHa.	34
Figura 12.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidoreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular HeLa.	36
Figura 13.- Evaluación del silenciamiento transitorio de STAT5 en la línea celular SiHa usando el RNA de interferencia (shRNA) evaluado por citometría de flujo.	38
Figura 14.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidoreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular SiHa con STAT5 silenciado estimuladas con 10UI de Interleucina 2 (IL-2).	39
Figura 15.- Expresión de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 en la línea celular HeLa con STAT5 silenciado. A) Imagen representativa del gel de agarosa con las células estimuladas con IL-2.	41
Figura 16.- Presencia de pSTAT5, STAT5 y VDAC en mitocondrias de células de cáncer de cérvix SiHa.	44
Figura 17.- Presencia de pSTAT5, STAT5 total, VDAC y mitofilina en células de cáncer de cérvix HeLa.	54

RESUMEN

El cáncer de cérvix (Cacu) es el segundo cáncer más común en mujeres en México y representa un problema de salud pública. Dos de las características del cáncer son la aberrante transducción de redes de señalización y una reprogramación metabólica. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que las células de Cacu producen interleucina 2 (IL-2) y que su receptor IL-2R está presente. También, la vía de señalización JAK3/STAT5 está activa en células de cáncer de cérvix, además, la estimulación con 10 UI/ml de IL-2 aumenta su fosforilación y, por tanto, se asocia a un aumento de la proliferación celular. Igualmente se ha reportado el posible de STAT5 en genes relacionados con la cadena de transporte de electrones (ETC, siglas en ingles). Debido a que no se conoce el papel de la vía JAK/STAT, especialmente el rol de STAT5 en la reprogramación metabólica proponemos analizar si STAT5 puede regular la expresión de los genes de la cadena de transporte de electrones, además de la posible migración de STAT5 a la mitocondria, para contribuir a la reprogramación metabólica.

Lo resultados mostraron que la estimulación con IL-2 regula negativamente la expresión de los genes de la ETC, NDUFV1 y ATP5FB1, en las líneas celulares HeLa y SiHa, en tiempos de 30 minutos y 6 horas, ATP5B1 mostró una recuperación a las 12 horas, mientras que NDUFV1 mostró una disminución gradual, el gen UQCRC1 no mostró cambios significativos respecto al control. Cuando se silencia la proteína STAT5 se observó que se recupera el nivel de expresión inducido por la estimulación con IL-2 en comparación con las células silvestres. También, se demostró que STAT5 está presente en la mitocondria y su fosforilación aumenta en respuesta a IL-2, a partir de los 15 minutos. Un resultado inesperado es que las proteínas mitocondriales VDAC y mitofilina aumentan en respuesta a la estimulación con 10 UI/ml de IL-2. Estos cambios en los niveles de las proteínas mitocondriales sugieren un papel importante de STAT5 activada vía IL-2 en el metabolismo mitocondrial. Este trabajo demuestra un papel clave de la vía de señalización IL-2/JAK/STAT en el metabolismo celular y se puede proponer a STAT5 como un posible blanco en terapias dirigidas.

ABSTRACT

Cervical cancer (CeCa) is the second most common cancer in women in Mexico and still a public health problem. Two hallmarks of cancer are aberrant signaling network transduction and metabolic reprogramming. Our research group has shown that CeCa cells produce IL-2 and its receptor IL-2R is present. Also, the JAK/STAT signaling pathway is active, since the JAK3 and STAT5 proteins are activated, and stimulation with 10 IU/ml of IL-2 increases their phosphorylation and is associated to cell proliferation. Likewise the possible involvement of STAT5 in genes related to the electron transport chain (ETC) has been reported. The role of the JAK/STAT pathway and especially the role of STAT5 in metabolism is unknown; therefore, we proposed to analyse if the stimulation with IL-2 and the activation of the pathway could regulate genes of the electron transport chain and whether STAT5 could migrate to the mitochondria, ultimately contributing to the metabolic reprogramming.

The results showed IL-2 stimulation regulated negatively the expression of the ETC genes, NDUFV1 and ATP5FB1, in HeLa and SiHa cell lines, at times of 30 minutes and 6 hours, ATP5B1 showed a recovery at 12 hours, while NDUFV1 showed a gradual decrease, the UQCRC1 gene showed no significant changes with respect to the control. When STAT5 is silenced in these cell lines, the expression level is recovered after IL-2 stimulation compared to wild-type cells. STAT5 was also shown to be present in mitochondria and its phosphorylation increased in response to IL-2, starting at 15 minutes. An unexpected result is that mitochondrial proteins VDAC and mitofilin increased in response to stimulation with 10 IU/ml of IL-2. An unexpected result is that mitochondrial proteins VDAC and mitofilin increased in response to IL-2 stimulation. These changes in mitochondrial proteins could indicate a key role of IL-2 in mitochondrial metabolism. This work demonstrates a central role of the IL-2/JAK/STAT signaling pathway in cellular metabolism and shows STAT5 as a possible target in targeted therapies.

INTRODUCCIÓN

Características del cáncer

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades que se caracterizan por el descontrol de la división celular que resulta en una masa de células llamada tumor. Las células normales presentan una estricta organización en la proliferación celular y un determinado tiempo de vida celular, mueren cuando envejecen o se dañan. Sin embargo, las células cancerosas carecen de control y evitan la muerte celular, progresan y posteriormente escapan del tejido original e invaden otros. Actualmente, es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, debido a la complejidad y variedad de mecanismos utilizados por la célula cancerosa para garantizar su proliferación y supervivencia bajo un microambiente adverso (1).

Es una enfermedad clonal, esto significa que se origina a partir de una célula que ha adquirido de forma progresiva alteraciones genéticas y epigenéticas, las cuales favorecen la adquisición de nuevas características como la constante señalización proliferativa, la evasión de supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la angiogénesis y la capacidad de invasión también conocida como, metástasis (Figura 1). Desde del 2001 se recopiló información y finalmente se clasificaron como características del cáncer, al pasar el tiempo se han agregado nuevas características distintivas del cáncer. Una de estas características descritas y objetivo importante de este trabajo es la desregulación del metabolismo somático celular, que abordan todos los justes del metabolismo energético en las células de cáncer para impulsar el crecimiento y la división celular, mecanismos como el aumento de la importación del glucosa y de la actividad de la glucólisis, aumento y estabilización de proteínas del metabolismo, aumento de la producción de ATP y cambios en el funcionamiento de organelos celulares como la mitocondria (2).

Las células diferenciadas normales emplean la fosforilación oxidativa a través de la mitocondria para generar la energía y la biomasa necesaria para los procesos celulares; sin embargo, a diferencia de los tejidos normales, la mayoría de las

células cancerosas presentan cambios fundamentales en el metabolismo de nutrientes y dependen de la glucólisis aeróbica. El aumento de la glucólisis aerobia le confiere a la célula maligna una ventaja proliferativa al generar fuentes energéticas suficientes (ATP) además de usar los intermediarios de carbono (Succinato, fumarato, acetato y lactato) para la síntesis de biomoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos) y posteriormente usarlos para generar una nueva célula (1, 2).

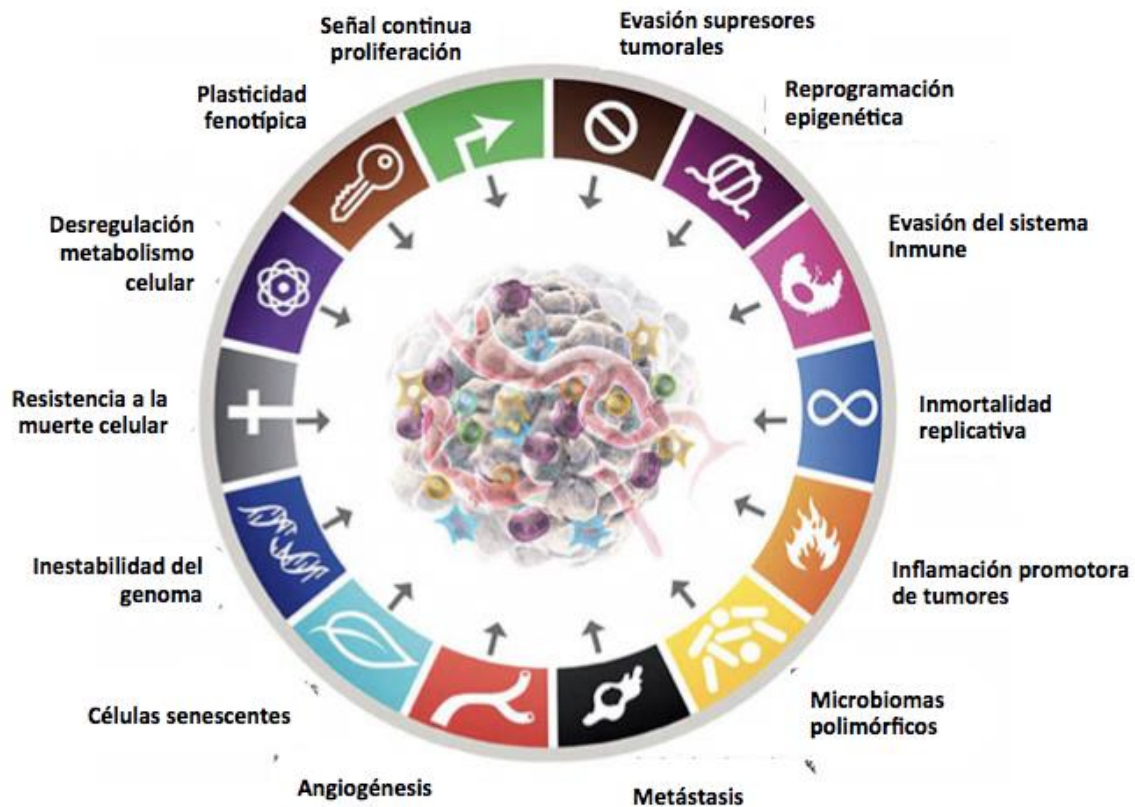


Figura 1.- Características principales del cáncer. Las células de cáncer pueden activar programas de comportamiento celular que en un tejido normal no están activas. Presentan una señal constante de proliferación, evasión a la muerte celular programada, reprogramación epigenética, evasión al sistema inmune, inmortalidad replicativa, aumento en la inflamación, una microbiota diversa, plasticidad fenotípica, inestabilidad genómica, células senescentes, angiogénesis, desregulación del metabolismo celular y finalmente la capacidad para invadir otros tejidos (metástasis). Tomado y modificado de Hanahan (2022).

Cáncer de cérvix y virus del papiloma humano (VPH)

El cáncer de cérvix (CaCu) ocupa el cuarto lugar en los más comunes en mujeres y en nuevos casos a nivel mundial. El carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma son los más comunes, abarcan el 70% y 25%, respectivamente, de todos los tipos de cáncer de cérvix. En 2020 Ferlay y colaboradores estimaron 604 127 nuevos casos de cáncer de cérvix e informaron 311 365 muertes. En México en el 2020 el CaCu fue el segundo tipo más común de cáncer en mujeres mayores de 15 años, se detectaron 10,348 nuevos casos diagnosticados y ocurrieron 4909 muertes (3).

Existen varios factores de riesgo implicados en el inicio del CC que incluyen: inicio temprano de relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales, inmunodepresión, falta de asistencia para la detección y subevaluación del tejido cervical, finalmente el factor de riesgo que ha mostrado mayor influencia en el inicio de la enfermedad es la infección crónica por el virus del papiloma humano (VPH), aproximadamente el 90% de los cánceres de cérvix presentan VPH. La transformación de las células puede iniciar con la infección de las células troncales basales del tejido de cérvix (Figura 2). Las proteínas E1 y E2 sintetizadas de los genes con los mismos nombre del genoma viral pueden desempeñar un papel en la amplificación del genoma de este. Por su parte, E6 y E7 son las principales proteínas asociadas con los cánceres mediante la eliminación de los supresores tumorales, específicamente p53 y pRB1, que conduce a la resistencia de la muerte celular programada, la inestabilidad genética y la formación de lesiones en la piel o las mucosas. Las funciones de las proteínas virales E6 y E7 varían entre los tipos de VPH de alto y bajo riesgo y están asociadas con diferentes patologías. E7 a través de su extremo N-terminal puede interactuar directamente con pRB1 e inducir la disociación del complejo pRB1/E2F resultado en la degradación de pRB1 vía protosomal y la activación de E2F, lo que motiva a la transcripción de numerosos genes requeridos para iniciar el ciclo celular, mientras que las proteínas E6 se une a la proteína E6AP (ligasa de ubiquitina E3 celular) formando el complejo E6/E6AP, p53 es uno de los principales blancos de dicho complejo y al unirse

promueven la ubiquitinación de p53 y su degradación proteosomal, interfiriendo con la detención del ciclo celular y promoviendo la proliferación celular (4).

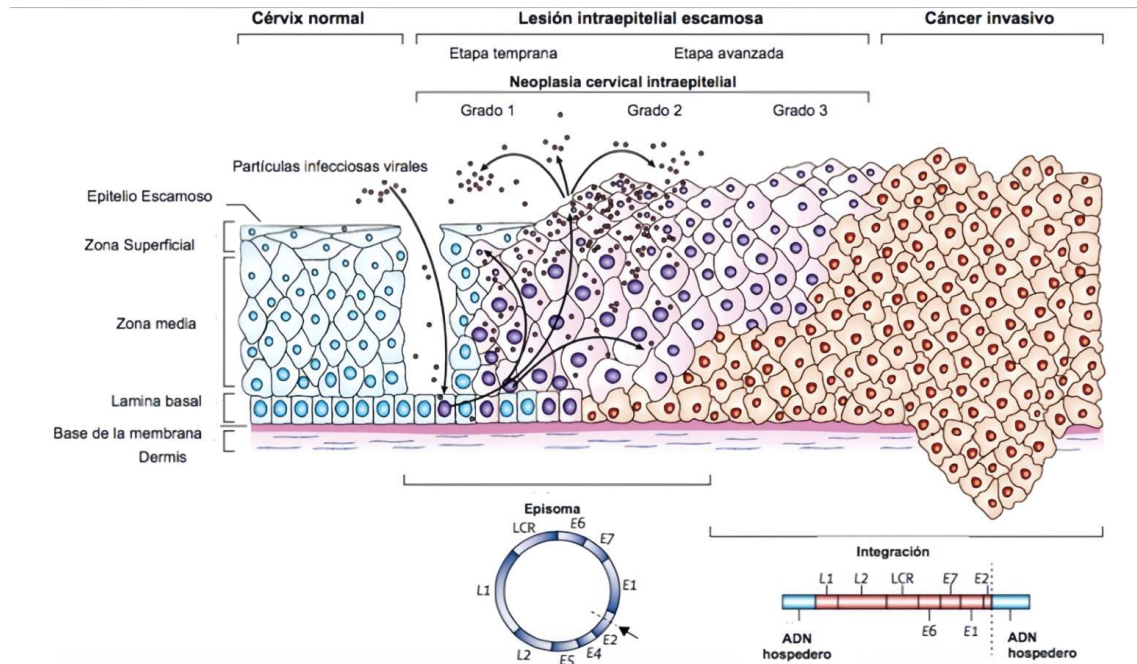


Figura 2.- Progresión mediada por VPH a cáncer de cérvix. El virus del papiloma humano (VPH) accede a las células basales a través de microlesiones en el epitelio cervical. Después de la infección, los primeros genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 del VPH se expresan y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal (núcleos morados). En las capas superiores del epitelio (la zona media y la zona superficial) el genoma viral se replica aún más y se expresan los genes tardíos L1, L2 y E4. Las lesiones intraepiteliales de bajo grado apoyan la replicación viral productiva. Un número desconocido de infecciones por VPH de alto riesgo progresan a neoplasia intraepitelial cervical de alto grado (HGCIN, por sus siglas en inglés). La progresión de las lesiones no tratadas a cáncer microinvasivo e invasivo se asocia con la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped (núcleos rojos), con la pérdida o interrupción asociada de E2 y la regulación ascendente posterior de la expresión del oncogén E6 y E7. LCR, región de control larga. Tomado y adaptado de Woodman *et al* (2007).

Interleucina 2 y cáncer

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina que estimula la proliferación de células T, aumenta la actividad citolítica de las células naturales asesinas (NK: Siglas en inglés), induce la diferenciación de células T reguladoras y media la muerte celular programada. Es producida generalmente por las células T CD4+ después de su activación por el antígeno. La IL-2 se une a un receptor específico (IL-2R) que está presente en células normales del sistema inmunitario, por ejemplo, linfocitos, células asesinas naturales y células dendríticas. Este receptor presenta tres subunidades diferentes que juntos forman los receptores de baja, media y alta afinidad. El receptor de baja afinidad solo presenta la cadena α (también llamada CD25), ésta se encarga de reconocer al ligando de la IL-2. La unión de la cadena β (CD122) y la cadena γ (CD132) forman el complejo de afinidad media, finalmente cuando las tres cadenas se unen se forma el receptor de afinidad alta; el modelo muestra que la IL-2 se une inicialmente a subunidad α , luego se recluta β y finalmente, γ . Las formas de receptor de afinidad intermedia y alta son funcionales y transducen la señal de la IL-2 (Figura 3) (6).

Una de las características más importantes de las células de cáncer, es que sintetizan proteínas como receptores, factores de transcripción y enzimas que una célula normal no presenta. Las células de cérvix normales no expresan IL-2R, pero recientemente se ha informado sobre la expresión de este receptor al igual que la propia IL-2 en varias líneas celulares de cáncer de cuello uterino. Más interesante aún, se demostró que la estimulación con bajas dosis de IL-2 10 UI/ml (concentraciones fisiológicas suelen ser mayores a 50 UI/ml) aumenta la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de cérvix CALO e INBL, mostrando un efecto positivo en las células de cáncer (7).

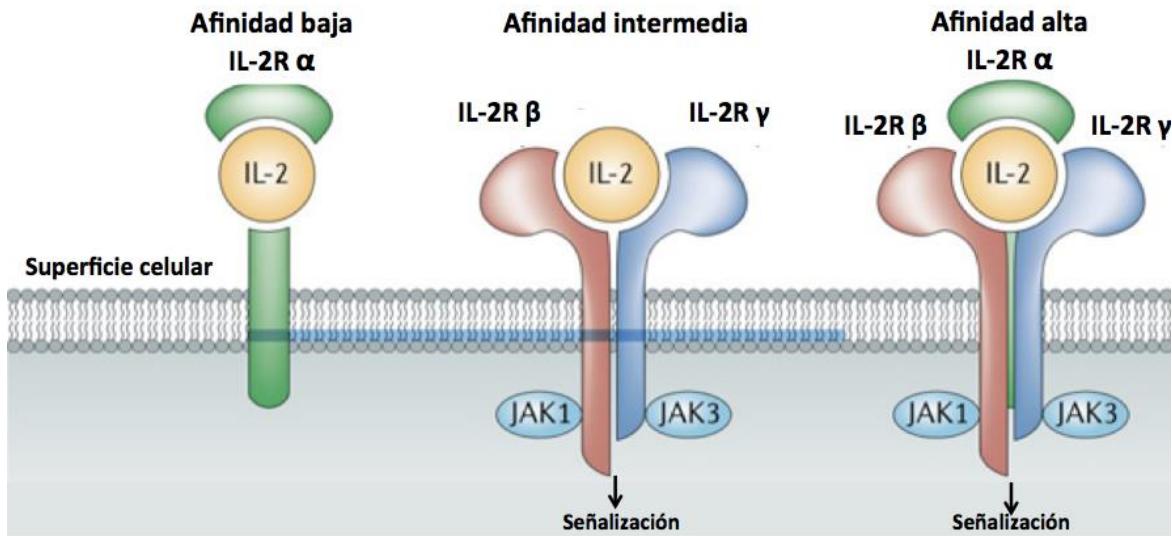


Figura 3.- Acoplamiento del ligando IL-2 con su receptor específico (subunidades α β y γ). Al unirse su ligando, el receptor sufre una trimerización y permite el anclaje de otras proteínas, como son las JAK que fosforilan al receptor y se transfosforilan entre ellas para activarse. Tomado de Spolski y Leonard (2018).

Vía de señalización JAK/STAT

La señalización de IL-2 junto con su receptor activa la vía de señalización Janus cinasa/transductor de señales y activador de la transcripción (JAK/STAT), presente en las células del sistema inmune y generalmente se encarga de aumentar la proliferación de células T. La vía de señalización JAK/STAT (Figura 4) se considera una vía central de comunicación en la función celular. Se han identificado más de 50 citocinas y factores de crecimiento que pueden afectar la eficiencia de esta vía de señalización como hormonas, interferones y por supuesto interleucinas, como la IL-2. Al interactuar el ligando con el receptor, éste sufre un cambio conformacional que permite el anclaje de otras proteínas, como las cinasas tipos Janus (JAK), las cuales están asociadas de forma no covalente con los receptores y mediante una transfosforilación se activan por medio de una fosforilación en residuos específicos de tirosina. Una vez activadas tienen la capacidad de reclutar a otras proteínas. Uno de los principales blancos de las JAK

son las STAT, las cuales al ser fosforiladas en residuos de tirosina, se dimerizan y luego se transportan al núcleo a través de poros de la membrana nuclear para regular genes específicos (9).

La familia JAK está formada por cuatro miembros principales: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Cada JAK está compuesta por siete dominios de homología (JH), de los cuales JH1 es el dominio cinasa, JH2 dominio pseudocinasa, una parte de JH3 y JH4 juntos constituyen el dominio SH2 y el dominio FERM que está compuesto por los dominios JH5, JH6 y JH7. La activación de JAK por la IL-2 en células normales ocurre de forma secuencial: JAK3 activa a JAK1 y la presencia de ambas es necesaria para activar la vía de IL-2. Sin embargo, a diferencia de la necesidad de JAK1 en células normales, se demostró que en células de cáncer de cérvix está presente JAK1, pero sin una aparente activación; también, se demostró que JAK3 se encuentra constitutivamente activa y la estimulación con 10UI de IL-2 aumentó aún más su actividad. JAK3 activa tiene la capacidad de reclutar y activar a las STATs para la supervivencia y proliferación celular (10).

Las STATs son un grupo de factores de transcripción que integran una familia que está compuesta por STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6. Tienen de 750-900 aminoácidos. Desde el extremo N hasta el extremo C, presenta el dominio N-terminal y la bobina, el dominio helicoidal, el dominio de unión al ADN, el dominio de conexión, el dominio SH2 y el dominio de activación de la transcripción. El dominio N-terminal se encarga de promover la formación de los dímeros. El dominio bobina participa en el control de los procesos de importación y exportación nuclear. El dominio de enlace, como su nombre lo indica, conecta estructuralmente el dominio de unión al ADN con el dominio SH2. El dominio SH2 de STAT es muy diferente de otros dominios SH2, es importante recalcar que este dominio está muy conservado en la familia STAT. La función principal del dominio SH2 es reconocer los motivos de fosfotirosina de los receptores de citocinas. Además, el dominio SH2 coopera con JAK activada para hacer que el dominio SH2 de STAT interactúe con el extremo carboxilo de otro monómero STAT después de la fosforilación para formar un homodímero o heterodímero. El

dominio de activación transcripcional es crítico para elementos de transcripción de ADN y el reclutamiento de coactivadores a través de un sitio de fosforilación de serina y tirosina conservado, regula la transcripción (9).

En nuestro grupo de investigación se demostró que tanto STAT3 como STAT5 se encuentran en distintas líneas celulares de cáncer de cérvix, e interesadamente, la estimulación con bajas dosis de IL-2 (10UI) aumentó la fosforilación y por lo tanto, la activación de las STATs, específicamente STAT3 y STAT5 (11,12).

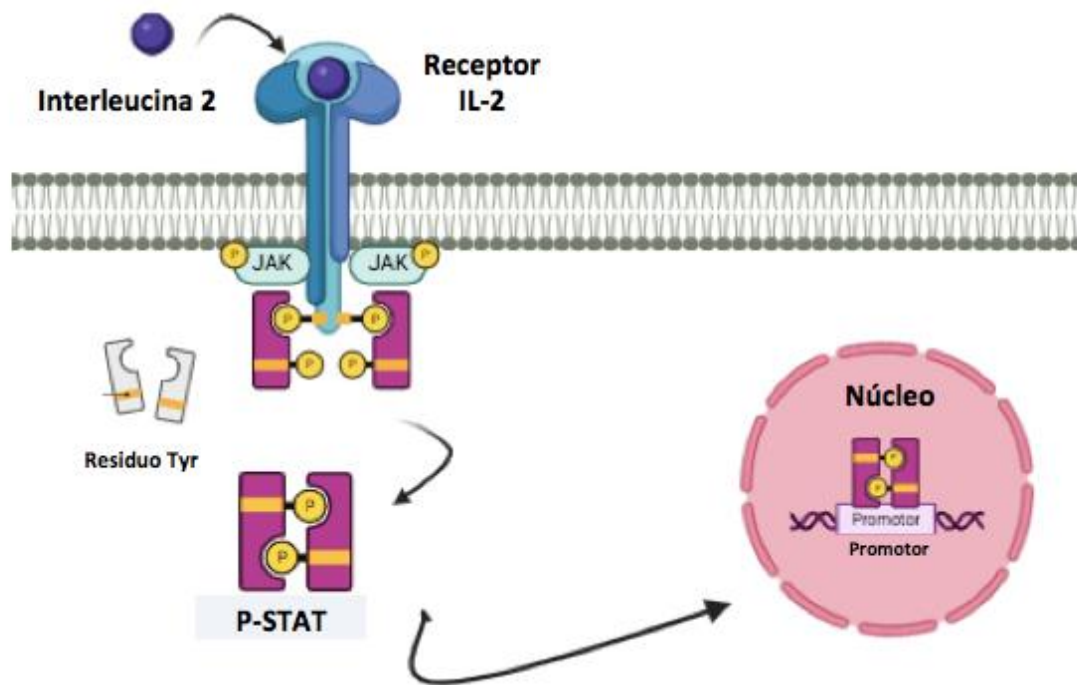


Figura 4.- Vía de señalización JAK/STAT. Citocinas como la IL-2 se unen a su receptor específico, el cual cambia su estructura conformacional y permite que las proteínas Janus cinasas (JAKs) se anclen y por transfosforilación se activen. Las JAK fosforilan a las transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (STATs), al estar fosforiladas forman dímeros y son transportadas al núcleo para regular la expresión génica. **Figura realizada en Biorender con la información de Hu y colaboradores 2021.**

STAT5 y Cáncer

Debido a que varias señales intracelulares y extracelulares son transducidas por la vía JAK/STAT, como el crecimiento y la proliferación celular, esta vía se ha asociado con el inicio, progresión y mantenimiento del cáncer.

Los factores de transcripción STAT5 incluyen dos proteínas STAT5a y STAT5b (Figura 5). Poseen una similitud de aminoácidos del 91%. STAT5a posee 794 aminoácidos y su sitio de fosforilación es la tirosina 694 (Y694), mientras que STAT5b se compone de 787 aminoácidos y su sitio de fosforilación es la tirosina 699 (Y699). STAT5a además de formar dímeros, puede formar tetrámeros. Las citocinas que activan STAT5 incluyen principalmente IL-3, prolactina y la familia de citocinas (incluidas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15). Las funciones biológicas de STAT5 incluyen: Regulación del crecimiento y desarrollo, así como la regulación del sistema inmune. Los dímeros STAT5 son esenciales para la supervivencia, se ha demostrado que los ratones deficientes en STAT5a y STAT5b presentan defectos graves en el desarrollo linfático y una letalidad perinatal. Sin embargo, los ratones deficientes en tetrámeros de STAT5a-STAT5b son viables, pero éstos presentan menor número de linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales (NK), disminución en la capacidad de proliferación de linfocitos T CD8+ y maduración de linfocitos NK alterada (11).

La continua activación de STAT5 ha sido relacionada con la tumorigénesis, en diversos tipos de cáncer como el de mama, colorrectal, pulmón, próstata así como en cánceres hematológicos y por su puesto en cérvix (13).

En modelos de ratones, el knockout de STAT5 disminuyó la formación de tumores en la mama, mientras que en los ratones que expresaban STAT5 y sobre expresaban el factor de crecimiento transformante- α (TGF α) se promovió el desarrollo de los tumores mucho más rápido (14). También, en este tipo de cáncer se ha demostrado que puede existir una mutación puntual en JAK2 lo que conduce a una STAT5 hiperactiva que mejora la proliferación de células epiteliales mamarias y aumenta el riesgo de transformación a células malignas (15).

En el cáncer colorrectal (CCR) la sobreexpresión y activación continua de STAT5 conduce a un peor pronóstico. Comparando el tejido epitelial de colon normal, el

tejido de CCR tiene una expresión mucho mayor de STAT5 (16). Es conocido que la inhibición de STAT5 induce el arresto del ciclo celular y reduce la invasión celular del tumor (17). Proteínas como p16, p21 y p27 se ven suprimidas por la actividad de STAT5 y al mismo tiempo se promueve la expresión de ciclina D1, proteínas de supervivencia como Bcl-2 y survivina, lo que mejora la proliferación y supervivencia de las células tumorales (17, 18).

En el cáncer de próstata (CaP) STAT5 se encuentra en la mayoría de casos, pero no en el epitelio normal y puede tener sinergia con el receptor de andrógenos (AR), el cual es muy importante en el desarrollo del tumor, ambos mejorarían su actividad transcripcional y aumentarían la expresión de sus genes diana (19). Además, se ha demostrado que la supresión de STAT5 en las líneas celulares CWR22Rv y LnCap (líneas celulares de CaP) inhibe el crecimiento tumoral e induce apoptosis (20).

Por otro lado, en el hepatocarcinoma, STAT5 también puede promover el desarrollo y progresión de la enfermedad. Se demostró que la activación específica de STAT5b en la línea celular Huh-7 incrementó la agresividad mediante el aumento de la transición epitelio mesenquimal (EMT) (21).

De igual manera, STAT5 tiene un rol importante en la regulación de la inmunidad tumoral; se demostró que al inocular tumores en ratones inmunocomprometidos, los niveles de STAT5a y STAT5b de linfocitos T y B aislados de ratones se redujeron significativamente, lo que indica que los niveles de STAT5 están relacionados con la progresión del tumor (11).

Como se mencionó anteriormente, STAT5 se encuentra presente en varias líneas celulares de cáncer de cérvix; al estimular las células con 10UI de IL-2, aumenta la expresión del gen así como la cantidad de proteína fosforilada. Esto sugiere un papel importante de STAT5 en la regulación de diversos genes en las células de cáncer de cérvix y por lo tanto en diferentes fenómenos biológicos, como puede ser la proliferación celular y la regulación del metabolismo celular (9).

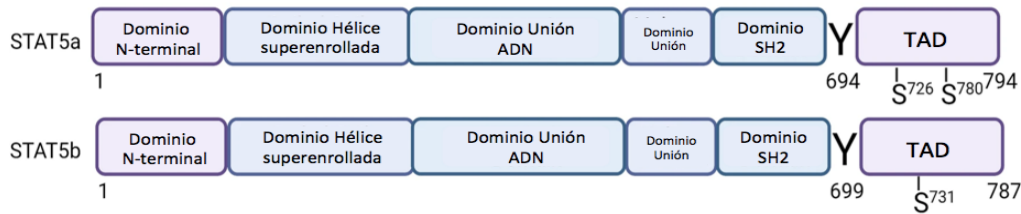


Figura 5.- Estructura de STAT5a y STAT5b. Los activadores transcripcionales STAT5a y STAT5b tienen una alta similitud a nivel de aminoácidos del 91%. STAT5a se compone de 794 aminoácidos, y el aminoácido 694 es un sitio de fosforilación de tirosina, mientras que STAT5b se compone de 787 aminoácidos. Tomado de Hu *et al* (2021).

Metabolismo alterado: Efecto Warburg

Una posible explicación a la alta capacidad proliferativa de las células cancerosas es la alteración de su metabolismo celular. El metabolismo celular incluye todos los procesos celulares para la transformación de biomoléculas, como la glucosa, a energía en forma de ATP, el cual es necesario para sintetizar nuevas biomoléculas para formar una nueva célula. El metabolismo de la glucosa, permite aprovechar la energía de la oxidación de sus enlaces de carbono para formar ATP. El producto final puede ser lactato o tras la oxidación total de la glucosa a través de la respiración mitocondrial, CO₂. Las células tumorales reprograman su metabolismo para satisfacer su alta demanda de energía; de hecho, este cambio en el metabolismo se considera uno de los sellos distintivos de la transformación oncogénica. Este proceso, conocido como efecto Warburg, se ha estudiado extensamente. Se han descrito tres procesos claves para este efecto: el aumento del flujo metabólico de la glucólisis, aumento de la producción de lactato y la disminución de la actividad mitocondrial, es importante aclarar que no todos los cánceres siguen este patrón y también se han descrito tumores con la actividad contraria, mostrando una dependencia por la fosforilación oxidativa. La glucólisis aeróbica es un medio ineficiente para generar ATP en comparación con la cantidad obtenida por la respiración mitocondrial. Sin embargo, la tasa de metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis aeróbica es más alta, de modo

que la producción de lactato a partir de la glucosa ocurre de 10 a 100 veces más rápido que la oxidación completa de la glucosa en la mitocondria. De hecho, la cantidad de ATP sintetizada durante cualquier período de tiempo es comparable cuando existe un aumento del flujo glucolítico debido al aumento de la actividad de las enzimas de la glucólisis (22,23). El aumento de la glucólisis aerobia le confiere a la célula maligna una ventaja proliferativa al generar fuentes energéticas suficientes, tal como ATP y los intermediarios de carbono para la biosíntesis de macromoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos). En los organismos multicelulares, la toma de nutrientes y el metabolismo están estrechamente regulados por sistemas de control que previenen la proliferación anormal (9,10). Inclusive células del sistema inmune presentan el efecto Warburg, con la diferencia que el control de éste depende del contexto celular. Las citocinas representan una importante regulación de la reprogramación metabólica en células del sistema inmune, por ejemplo, se reportó que existe una alta fosforilación de STAT5 que, a su vez, induce transcripcionalmente la expresión de Akt para amplificar la actividad de la vía PI3K/Akt y finalmente regular la expresión del transportador de glucosa 1 (Glut1) y la enzima hexocinasa 2 (HK2), importantes en la vía de la glucólisis (24).

Otro fenómeno importante durante el efecto Warburg es el estado anaplerótico de la mitocondria, específicamente en el ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs o también conocido como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA: siglas en ingles) es fundamental para todas las células que usan oxígeno durante la respiración celular. Además puede proveer moléculas precursoras (como el α -cetoglutarato y oxalacetato) para la síntesis de aminoácidos entre otras moléculas fundamentales. Esto es importante debido para las células altamente proliferativas, como las células tumorales, requieren continuamente suministros de metabolitos para la síntesis de nuevas células tumorales. Se ha asociado un ciclo de Krebs aberrante en enfermedades como la obesidad, así como en el cáncer. El concepto de anaplérosis describe una serie de reacciones o vías que reemplazan los depósitos de aniones para eliminarlos y evitar la acumulación de aniones en la matriz mitocondrial.

Cuando las moléculas del ciclo de Krebs se reclutan para su uso en vías sintéticas, deben reabastecerse de nuevo para que el ciclo pueda seguir funcionando. Las vías y las reacciones que reponen las moléculas de la ruta se conocen como "reacciones anapleróticas". Por ejemplo, la carboxilación de piruvato que forma oxalacetato repone el oxalacetato retirado del ciclo para participar en la síntesis de nucleótidos o en la gluconeogénesis. La mayoría de los cánceres dependen de estas síntesis de metabolitos. En muchas células cancerosas, la glutamina funciona como regulador de la anaplerosis a través de la conversión a glutamato deshidrogenasa. Las células de cáncer aumentan la actividad de estas enzimas del ciclo de Krebs provocando un aumento en la cantidad de expulsión de metabolitos del ciclo y aumentando la síntesis de biomoléculas como ácidos nucleicos y aminoácidos para las proteínas necesarios para la división celular (53).

Anteriormente no se había asociado las vías de señalización con la reprogramación metabólica, sin embargo, recientemente el papel de las redes de señalización celular ha tomado interés en dicha reprogramación. Los cambios aberrantes en esas vías de señalización incrementan la toma de nutrientes y el metabolismo necesario para producir el aporte energético indispensable para la sobrevivencia y proliferación celular (25, 26). Se ha reportado que el metabolismo energético, especialmente el metabolismo de la glucosa, está conectado con el control del crecimiento mediante la activación y silenciamiento de ciertos genes tumorales, que llevan a la proliferación celular descontrolada, al arresto del ciclo celular y al envejecimiento de la célula (27,28,29). Se ha reportado que la familia de proteínas transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) están implicados en la regulación de genes relacionados con el efecto Warburg. Los resultados del trabajo de Rojas-Mercado (2020) muestran que la estimulación con IL-2 aumentó la fosforilación de STAT3 y la expresión de genes relacionados con el metabolismo, como el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-alfa), proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido 1 (PDK1) y el transportador de glucosa 1 (GLUT1), genes muy relacionados al control del metabolismo de la glucosa. De

igual manera se describió que este mismo tratamiento con IL-2 aumentó la activación de STAT5 (11).

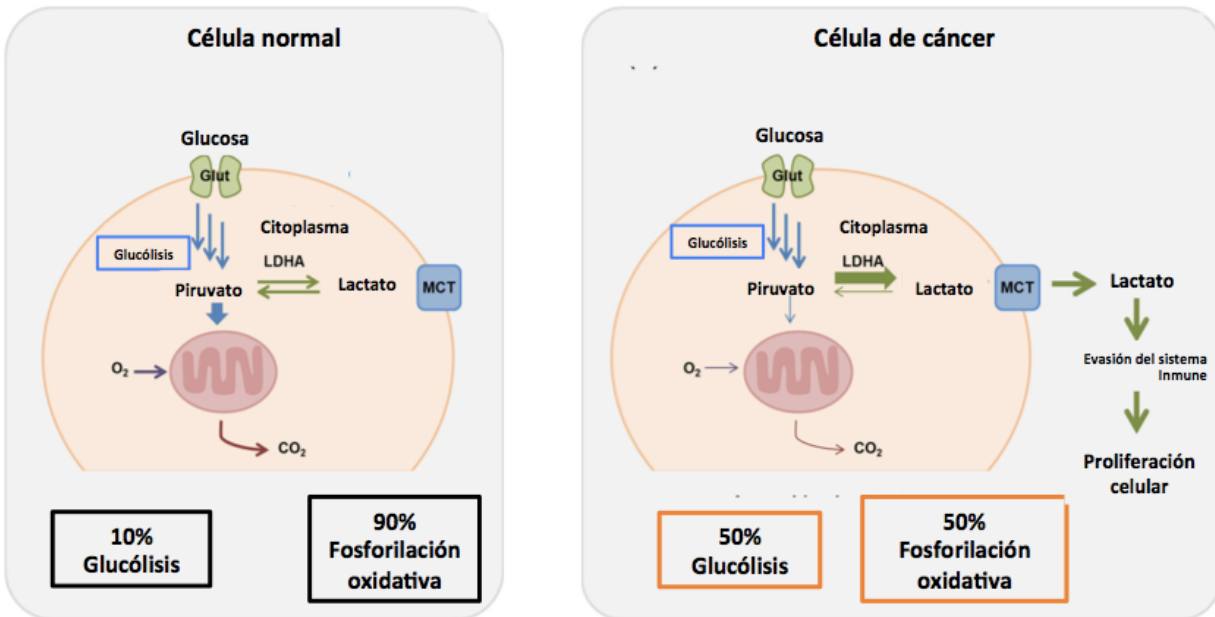


Figura 6.- Efecto Warburg. Diferencias en las vías de glucólisis entre células normales y células cancerosas. (A) En presencia de oxígeno, las células normales en tejido promedio producen dióxido de carbono y hasta 38 ATP por molécula de glucosa a través de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxilicos (TCA) y el sistema de transporte de electrones. En un ambiente hipóxico, los piruvatos se acumulan sin pasar por el ciclo TCA. Estos piruvatos acumulados en el tejido muscular se convierten en ácido láctico y solo producen 2 ATP. (B) Las células cancerosas solo utilizan el proceso de glucólisis, independientemente de la presencia o ausencia de oxígeno, por lo tanto presentan adecuaciones en la regulación de la glucólisis, además de presentar un desvío del piruvato hacia la síntesis de lactato. Tomado de Kim y Baek (2021).

STAT5 en el metabolismo celular

En tejido normal promedio, 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% (Figura 6). Sin embargo, en algunos tumores aproximadamente el 50% de la energía celular se genera por glucólisis, y la energía restante es generada en la mitocondria (23), este cambio se mantiene aun cuando el O₂ presente es suficiente para mantener la función mitocondrial (glucólisis anaerobia) (22). Esta característica de las células tumorales de mostrar un elevado radio de glucólisis mientras continúan creciendo aun 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. Varios trabajos sugieren que existe una correlación importante entre la vía JAK/STAT y el metabolismo celular, una vía aberrante en las células cancerosas, ya que la activación constitutiva de las proteínas STAT promueve la glucólisis a través de la activación transcripcional de factores inducibles por hipoxia y por lo tanto, la alteración de la actividad mitocondrial. Parece que las proteínas STAT funcionan como un centro integrador de diferentes señales de crecimiento y supervivencia para el metabolismo energético, por lo tanto, tienen un papel central en la función metabólica de la célula (10,11,12).

Este vínculo STAT-metabolismo en el cáncer surgió debido a que la señalización JAK/STAT tiene funciones cruciales en tejidos metabólicamente activos, incluidos el tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético y las células B pancreáticas, así como en células inmunitarias, incluidos los macrófagos, las células asesinas naturales y las células T (10).

Durante la activación de los linfocitos T, pasan por varios cambios metabólicos: proliferación rápida, síntesis de grandes cantidades de una variedad de proteínas

efectoras y preparación para entrar en un entorno potencialmente hipóxico. Estas adaptaciones metabólicas se asemejan a las observadas en el metabolismo del cáncer (proliferación, anabolismo, producción de energía para generar bloques de construcción y la falta de nutrientes y oxígeno pueden limitar el flujo metabólico ya que restringen el acceso de metabolitos y oxígeno). Este fenómeno indica que las células cancerosas solo adoptan estrategias metabólicas similares a las utilizadas por los linfocitos T en respuesta a su activación (31).

Se ha señalado que la activación constitutiva de las proteínas STAT promueven la glucólisis mediante la inducción transcripcional de HIF- α , como el aumento de las enzimas glucolíticas, el incremento de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) la cual inhibe la actividad de la complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) enzima encargada de transformar el pivrato al acetil-coA para ingresar a la mitocondria y entrar al ciclo de Krebs. También se sabe que existen mutaciones a los genes succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa (FH), que codifican enzimas del ciclo del Krebs provocando una actividad defectuosa y por lo tanto una acumulación de metabolitos y disminuyendo el potencial redox necesario para la cadena de transporte de electrones para producir ATP (32). STAT5 participa en la regulación del metabolismo energético y en la regulación de HIF-1 α , un importante regulador en el microambiente hipóxico del cáncer. Además, STAT5 puede inducir la expresión de HIF-2 α , que es necesaria para la regulación positiva de genes asociados con el metabolismo de la glucosa. Por lo tanto, está claro que las proteínas STAT están involucradas en la regulación de los factores inducibles por hipoxia que son los principales reguladores de la homeostasis del oxígeno. La hipoxia es un factor microambiental crítico que está relacionado con la progresión y la metástasis. La mayoría de los tumores sólidos muestran condiciones hipóxicas, y esta menor concentración de O₂ induce una regulación alterada en la transcripción génica, lo que lleva a cambios en el metabolismo celular (33).

Chuhe y colaboradores (2020) demostraron que en la línea celular murina BaF3 existe una interacción entre STAT5 y una enzima metabólica, la piruvato deshidrogenasa quinasa subunidad E2 (PDC-E2) en la mitocondria. STAT5 exhibe

una actividad única de unión al ADN. La presencia de STAT5 mitocondrial en células tumorales y células estimuladas por citocinas también coincide con su cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica. En un informe posterior, el mismo grupo demostró que PDC-E2 podría funcionar como un coactivador en la expresión de genes mitocondriales y nucleares dependientes de STAT5. El STAT5 citoplasmático es reclutado por el complejo receptor-ligando, y es fosforilado en tirosina por la cinasa JAK3. Las proteínas STAT5 se dimerizan y translocan al núcleo y la mitocondria. En el núcleo, STAT5 fosforilado en tirosina se une a las regiones promotoras de distintos genes diana y en la mitocondria STAT5 tendría la capacidad de unirse al genoma mitocondrial, precisamente en la región del bucle D, región conformada por tres hebras y encargada de regular e iniciar la transcripción de los genes de la CTE mitocondriales (ND1, ND6 y ATP6) (34,35). Teniendo esta evidencia que en células embrionarias HEK293, STAT5 puede migrar a la mitocondria y regular estos genes ND1, ND6 y ATP6 existe también la posibilidad de que pueda migrar a núcleo y también regular genes de la CTE participando en la disminución de la actividad de la fosforilación oxidativa. STAT5 podría regular la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa, especialmente los genes relacionados con la cadena transportadora de electrones (CTE), como son las proteínas de los complejos de la cadena respiratoria (flavoproteína1 del Complejo I; proteína 1 del Complejo III, citocromo c oxidasa I y II del Complejo IV; polipéptido 5 de la subunidad beta del complejo ATP sintetasa) subunidades de los complejos de la CTE que al ser alterados su actividad se comprometería regulando su expresión y por lo tanto alterando la actividad mitocondrial (35).

STAT 5 en la regulación de genes de la cadena de transporte electrónica

Los genes de la cadena de la cadena de transporte de electrones están presentes tanto en el ADN mitocondrial y el ADN nuclear, se ha reportado que varios factores de transcripción contribuyen a la regulación de dichos genes. Debido al

antecedente que en células T leucémicas STAT5 migra a la mitocondria y que en células embrionarias HEK293 STAT5 además de migrar a dicho organelo puede regular genes mitocondriales de la CTE (genes ND1, ND6 y ATP6) (36), no sería imposible pensar que en células de cáncer de cérvix al presentar la activación con IL-2 de la vía JAK/STAT y el aumento específico de STAT5 fosforilado tendría la capacidad de migrar tanto al núcleo como mitocondria y funcionar como regulador de los genes de la CTE tanto en el núcleo como en la mitocondria y regular su expresión, controlando así la actividad mitocondrial en células de cáncer, genes como la subunidad central V1 de ubiquinona oxidorreductasa (NDUFV1), proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (UQCRC1) y la subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1), subunidades importantes de los complejos 1,3 y de la enzima ATP sintasa respectivamente, si su transcripción es comprometida es probable que tanto a nivel de proteína como su actividad también sean afectadas.

Estas subunidades son partes importantes para la función de los complejos de la CTE, el gen NDUFV1 está ubicado en el brazo q del cromosoma 11 en la posición 13.2 y tiene 10 exones. Este gen codifica una subunidad de 51 kDa del complejo I NADH:ubiquinona oxidorreductasa, la subunidad transporta el sitio de unión de NADH, así como los sitios de unión de mononucleótido de flavina (FMN) y Fe-S. Es una oxidorreductasa y una subunidad central del complejo I; se cree que es necesaria para el ensamblaje y la catálisis del complejo (37). El gen UQCRC1 está ubicado en el brazo p del cromosoma 3 en la posición 23.31. La proteína codificada es una subunidad de la ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa del tercer complejo, complejo transmembranal de múltiples subunidades que forma parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Su función es catalizar la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c, vincula esta reacción redox con la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial, los protones son transportados a través de la membrana como hidrógenos en el quinol (38) y finalmente el ATP5F1B ubicado en el brazo q del cromosoma 12 en la posición 13 el gen codifica a una subunidad de la ATP sintasa mitocondrial. La ATP sintasa mitocondrial cataliza la síntesis de ATP,

utiliza un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna durante la fosforilación oxidativa. La ATP sintasa está compuesta por dos complejos de múltiples subunidades unidos: el núcleo catalítico soluble, F1 y el componente que atraviesa la membrana, F0, que comprende el canal de protones. La porción catalítica de la ATP sintasa mitocondrial consta de 5 subunidades diferentes (alfa, beta, gamma, delta y épsilon) ensambladas de 3 alfa, 3 beta y un único representante de las otras 3. El canal de protones consta de tres subunidades principales (a, b, c). Este gen codifica la subunidad beta del núcleo catalítico (39). STAT5 ha demostrado regular negativamente genes de la CTE mitocondriales como ND1, ND6 y ATP6 en la mitocondria (células embrionarias) (36), la posibilidad de que pueda regular genes de la CTE en el núcleo es muy probable, por lo tanto sería importante dilucidar el papel de STAT5 en la regulación de genes relacionados con el metabolismo celular.

STAT5 en la mitocondria

La localización mitocondrial de STAT5 sugiere que puede estar involucrada en la regulación génica de la mitocondria, lo cual coincide con el cambio metabólico hacia la glucólisis aerobia, fenómeno observado en células T y leucémicas estimuladas con citocinas. Más recientemente se demostró que el tratamiento con IL-3 en la línea celular HEK293 de cáncer de riñón, induce la traslocación de STAT5a a las mitocondrias y éste regula a través de una unión al ADN mitocondrial, (ADNmt) la disminución de la expresión de genes mitocondriales. La represión de la expresión de ADNmt mediada por STAT5a también se correlacionó positivamente con la unión de STAT5a a la subunidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC-E2), una enzima metabólica de control y un componente del ADNmt en la matriz mitocondrial) (34,25).

La familia de las STATs, y específicamente STAT5, puede regular genes relacionados con el metabolismo celular (Figura 7) por lo que surge la pregunta si dicho factor de transcripción puede regular genes nucleares de la cadena de transporte de electrones para regular el metabolismo celular y contribuir a la

progresión del cáncer, especialmente en el cáncer de cérvix, que es un problema de salud pública mundial.

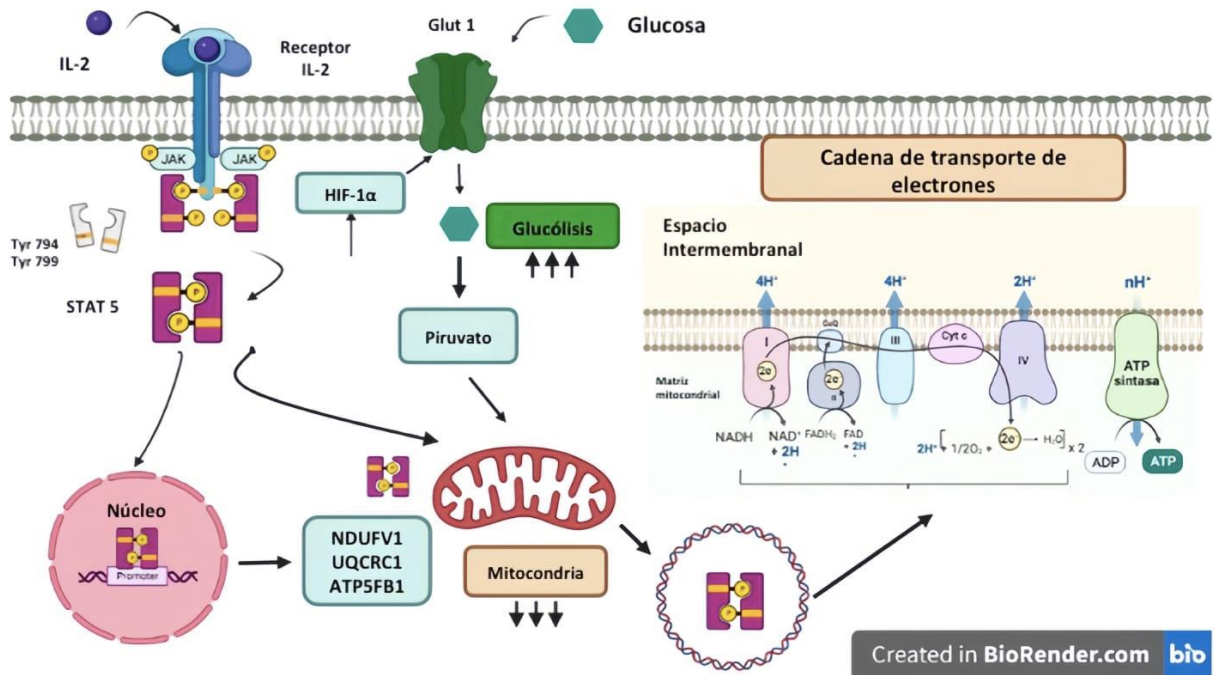


Figura 7.- Vía de señalización IL-2/JAK3/STAT5 en la regulación de genes mitocondriales. Figura creada por medio del programa BioRender.com

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que en las células de cáncer de cérvix hemos encontrado que la vía de señalización JAK-STAT se encuentra activa de manera constitutiva y se ve aumentada ante la estimulación de 10 UI/ml de IL-2 (10- 13), es de nuestro interés analizar si la proteína STAT5 está implicada en la regulación de genes relacionados con el metabolismo celular, surge la duda si STAT5 puede regular genes de la cadena de transporte de electrones como los genes **subunidad central V1 de ubiquinona oxidorreductasa del complejo 1 (NDUFV1)**, **proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa del complejo 3 (UQCRC1)** y **la subunidad beta de la ATP sintasa F1 del complejo 5 (ATP5FB1)** y funcionar como reguladores de señales de crecimiento modificando el metabolismo energético a través de sus actividades nucleares. La posibilidad de que STAT5 migre a la mitocondria en estas líneas celulares y ejercer actividades dentro de la mitocondria aún se desconoce, por lo que se requieren estudios para comprender como afectan estos cambios metabólicos a las células.

La información generada en este proyecto permitirá entender los mecanismos de señalización que utilizan estas células tumorales para reprogramar el metabolismo energético y poder proliferar eficientemente, para en un futuro desarrollar tratamientos alternativos y más específicos para el carcinoma de cérvix.

HIPÓTESIS

En respuesta a la estimulación de IL-2, STAT5 fosforilado disminuye la expresión de genes de la fosforilación oxidativa, y aumenta su translocación hacia la mitocondria.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el papel de STAT5 en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y su migración a la mitocondria en líneas de cáncer de cérvix tratadas con IL-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto del tratamiento con IL-2 sobre la expresión de genes componentes de la fosforilación oxidativa (FO) (subunidad central V1 de ubiquinona oxidorreductasa del complejo 1, proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa del complejo 3 y la subunidad beta de la ATP sintasa F1 del complejo 5) en las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa y HeLa.
2. Analizar el efecto del silenciamiento de STAT5 sobre la expresión de los genes componentes de los complejos I, III, y V en células de cáncer de cérvix estimuladas con IL-2.
3. Determinar la translocación de STAT5 fosforilado a la mitocondria en las líneas celulares de cáncer de cérvix, SiHa y HeLa estimuladas con 10UI de IL-2.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Experimental

Material biológico y mantenimiento del cultivo celular

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 HeLa (VPH-18), derivada de un adenocarcinoma grado 4B obtenida igualmente de American Type Culture Collection (ATCC).

Para el mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de cérvix, estas se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal de bovino (SFB) al 10% en cajas Petri de 100 mm e incubadas a 37°C y 5% de bióxido de carbono (CO₂) con una transferencia o subcultivo celular cada 5 días.

Evaluación de la expresión génica

Las células de las líneas de cáncer de cérvix SiHa y HeLa se sembraron a una densidad de 1×10^6 células en cajas Petri de 100 mm, se dejaron adherir por 24 horas de cultivo y posteriormente se cambió el medio, por medio suplementado con 0.5% SFB para ralentizar el metabolismo por 12 horas. A continuación las células se incubaron en presencia o ausencia de 10UI/ml de la IL-2 durante 30 minutos, 6 horas y 12 horas para extraer mRNA y analizar el efecto de la citocina sobre la expresión de los genes UQCRC1 y NDUFV1 mediante PCR punto final.

Para la extracción de RNA se utilizó el método TRIzol, se retiró el sobrenadante y se le agregó 1 mL de TRIzol y 200 μ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente. La suspensión se dejó incubar durante 10 minutos en hielo, para después centrifugar durante 15 minutos a 13,000 rpm. La fase acuosa se recuperó y se agregaron 400 μ L de isopropanol, para incubar toda la noche a -20 °C. Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 13,000 rpm, se

eliminó el sobrenadante, y se agregó 1 mL de etanol al 75% diluido con agua libre de nucleasas. Para eliminar restos de guanidina, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, 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 70 µL de agua libre de nucleasas.

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

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 5 µg de RNA para retrotranscribir a una temperatura de 37 °C durante una hora. Mientras que para evaluar los niveles de UQCRC1 y NDUFV1 se utilizaron 3 µg de cDNA , como gen de referencia se utilizó β-actina (Figura 8). Los oligos utilizados fueron:

Gen	Primer Sentido	Primer Antisentido
UQCRC1	CGAGTACCTGAGCACACATTAC	CTCTGCATATGTCCATGGGATG
NDUFV1	GGCACCAAACACTATTCAACATCTC	CAGCATGCTTCTCAATCAGTTC
ATP5FB1	CTAAGGTAGCGCTGGTATATGG	CATCTTGACTTCTTGGTCTCTA
β-actina	TCTTCCAGCCTTCCTTCCT	TGTTGGCGTACAGGTCTTTG

Las condiciones para la amplificación fueron: 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 35 minutos 50V. Su utilizó SYBR Green (ThermoFisher, USA) para visualizar las bandas en el fotodocumentador (Biorad, USA).

3 Repeticiones temporales

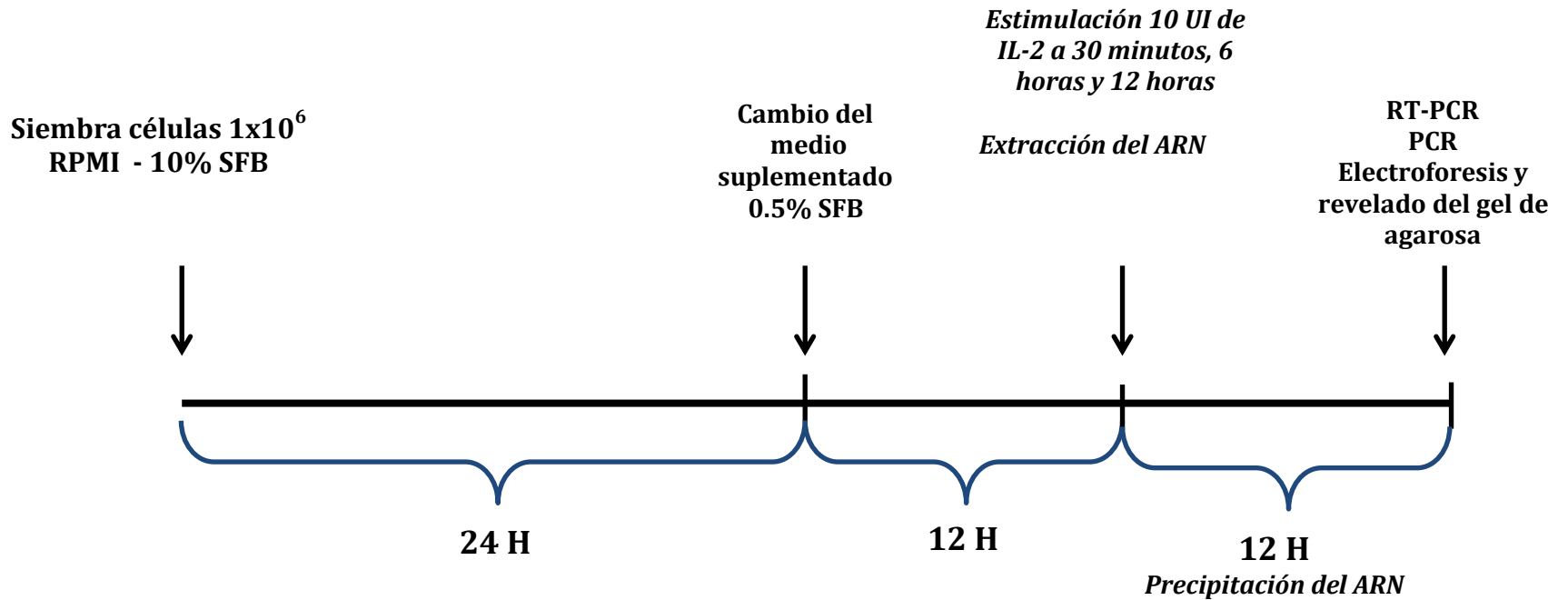


Figura 8.- Diseño experimental para evaluar la expresión de los genes de la FO en las líneas celulares SiHa y HeLa estimuladas con IL-2.

Silenciamiento transitorio de STAT5 en las líneas celulares HeLa y SiHa.

Las secuencias de shRNA se diseñaron para silenciar STAT5 (A/B). Estas se insertaron (STAT5-94 CCACCATCACGGACATTAT y STAT5-71GACTCAGGAGTACTTCATC) en un plásmido pSIREN que contenía el gen de resistencia a puromicina. Las células se transfectaron usando Turbofect (Thermo Scientific) según las especificaciones del fabricante. Para ello, 8×10^5 células/pozo se sembraron en placas de 6 pozos 24 horas antes de la transfección. Los plásmidos se diluyeron a una concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$ en 400 μL de medio RPMI-1640, además se adicionó 12 μL de Turbofect, esto se mezcló inmediatamente y se incubó por 18 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se agregó a cada pozo y se incubó a 37 °C, 5% CO₂ por 48 horas. Después de las 48 horas de la exposición con el plásmido, se retiró el medio de cultivo y se agregó medio RPMI-1640 y se estimuló con 10 UI/ml de IL-2 (concentración que aumenta la proliferación celular y la activación de la vía JAK3/STAT5) en tiempos de 30 minutos, 6 horas y 12 horas. Finalmente, se extrajo el RNA de las células con la técnica mencionada anteriormente (Figura 9).

Medición de STAT5 total en las células transfectadas

Después de las 48 horas de la transfección transitoria la células SiHa fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 1% por 20 minutos, posteriormente se lavaron 2 veces con 200ul de buffer BD Perm/Wash™ 1x se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, se retiró el buffer BD Perm/Wash™ y posteriormente para la permeabilizaron se usó 400 ul de metanol más 1 ml de buffer BD Perm/Wash™ por 40 minutos, se retiró la solución y se incubó el anticuerpo (4:200) STAT5 (Santa Cruz), USA en una solución de 200ul PBS al 1% SFB por 24 horas, se decantó la solución y se lavó con 200ul buffer BD Perm/Wash™ 1x, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con FITC (Santa Cruz, USA) (1:200) por 2 horas en la misma solución PBS 1% SFB, finalmente se lavó 2 veces por buffer BD Perm/Wash™. Se utilizó el citómetro de flujo Cytotflex (Beckman, USA) usando el software Flowing. Con el programa Flowjo se analizaron los datos.

3 Repeticiones temporales

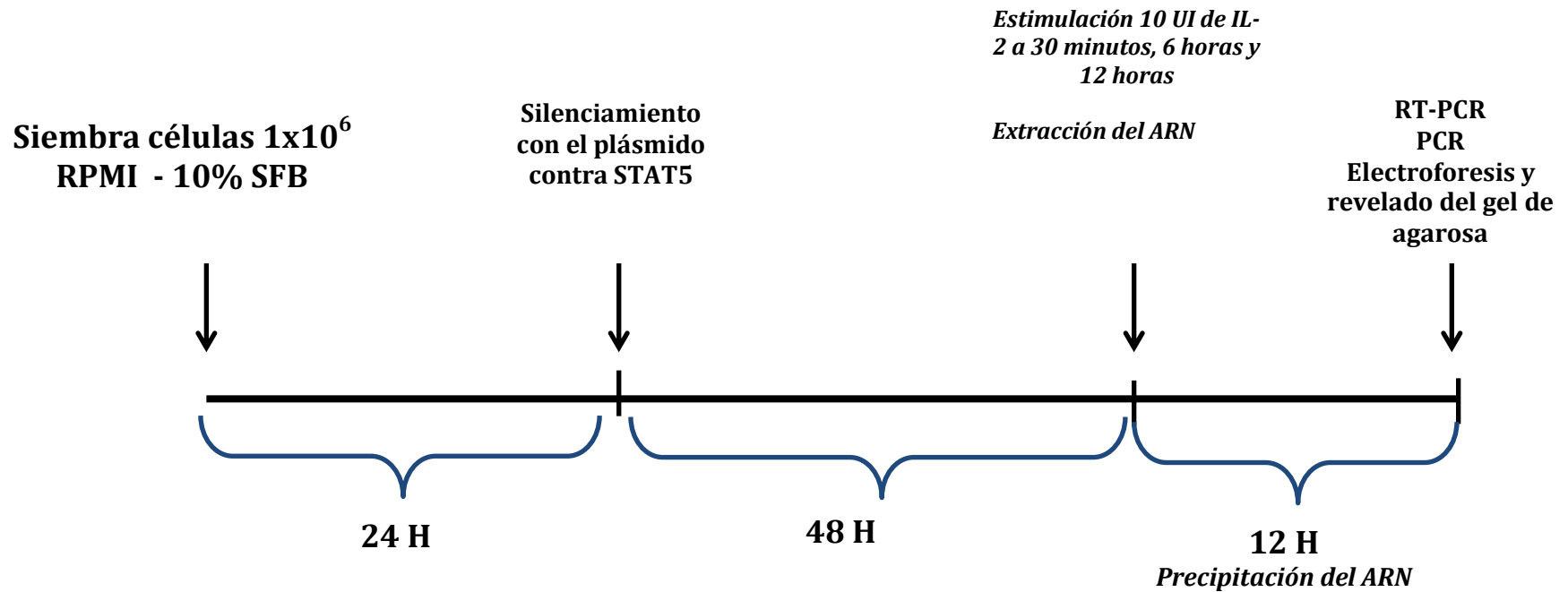


Figura 9.- Diseño experimental para evaluar la expresión de los genes relacionados con la FO en las líneas celulares SiHa y HeLa con silenciamiento e estimuladas con IL-2.

Translocación de STAT5 a la mitocondria

Para la determinar la presencia de STAT5 en la mitocondria de las células de cáncer de cérvix, se sembraron 6×10^6 células por condición, se incubaron en presencia o ausencia de 10 UI/ml de IL-2 durante 5, 30 y 60 minutos. Las células sin estímulo representan el control negativo.

Pasado el tiempo de estímulo se aislaron las mitocondrias con el kit Mitochondrion Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher, USA); para esto, se despegaron las células con verseno y se resuspendieron con el reactivo A, se incubaron durante 2 minutos en hielo y se agregaron 10 μ L del reactivo B, se incubaron por 5 minutos en hielo y se agitaron cada minuto. Posteriormente, a la suspensión se le agregó 400 μ L del reactivo C y se centrifugó durante 10 minutos a 6,200 rpm a 4 °C, al terminó se eliminó el sobrenadante y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos, para eliminar el sobrenadante nuevamente y se lavó el botón de mitocondrias con 250 μ L de reactivo C. Finalmente se cuantificó la proteína mediante el método de Lowry, método colorimétrico cuantitativo de proteínas utilizando el kit comercial (Dc Protein Assay, Biorad, USA). Una curva estándar de albumina se utilizó para determinar las concentraciones de proteína. Para ello, se prepararon las siguientes 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.

Para la cuantificación de la proteína total se preparó una solución con 200 μ L del reactivo B, 20 μ L de reactivo A y 5 μ L de muestra por pozo en placas de 96 pozos. La lectura se llevó a cabo en un lector de placas a 590 nm.

Para determinar el contenido de proteína por inmunoblot, 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%. Los geles se polimerizaron con persulfato de amonio al 0.05% (Sigma Chemical, Co. USA) y tetrametileno-

diamina (TEMED) (Sigma Chemical, Co USA). En geles de poliacrilamida se cargó 25 µg de proteína, las proteínas se corrieron 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 albumina al 3% (Biorad, USA) para asegurar el bloqueo. Posteriormente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-STAT5 (Santa Cruz, USA) en una proporción de 1 a 1000 con albumina al 3% (Biorad, USA) durante 3 horas. Después, 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) se incubó en una proporción de 1 a 10,000 con albumina al 1% durante 45 minutos. Inmediatamente se realizaron cinco lavados de cinco minutos con TBS tween, seguidos de tres lavados con TBS de cinco minutos.

Para visualizar las proteínas por medio de quimioluminiscencia se agregaron 600 µl del reactivo A que contiene peróxido de hidrogeno y 650 µ del reactivo B que contiene luminol (Pierce, USA) (Figura 10).

Programa y análisis estadístico.

Para evaluar la expresión de los genes NDUFV1, UQCRC1 y ATP5FB1 así como la fosforilación de STAT3 se hizo un análisis densitométrico con el uso del programa ImageJ.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad versión 6.2. Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con la una prueba ANOVA de una vía no pareada.

3 Repeticiones temporales

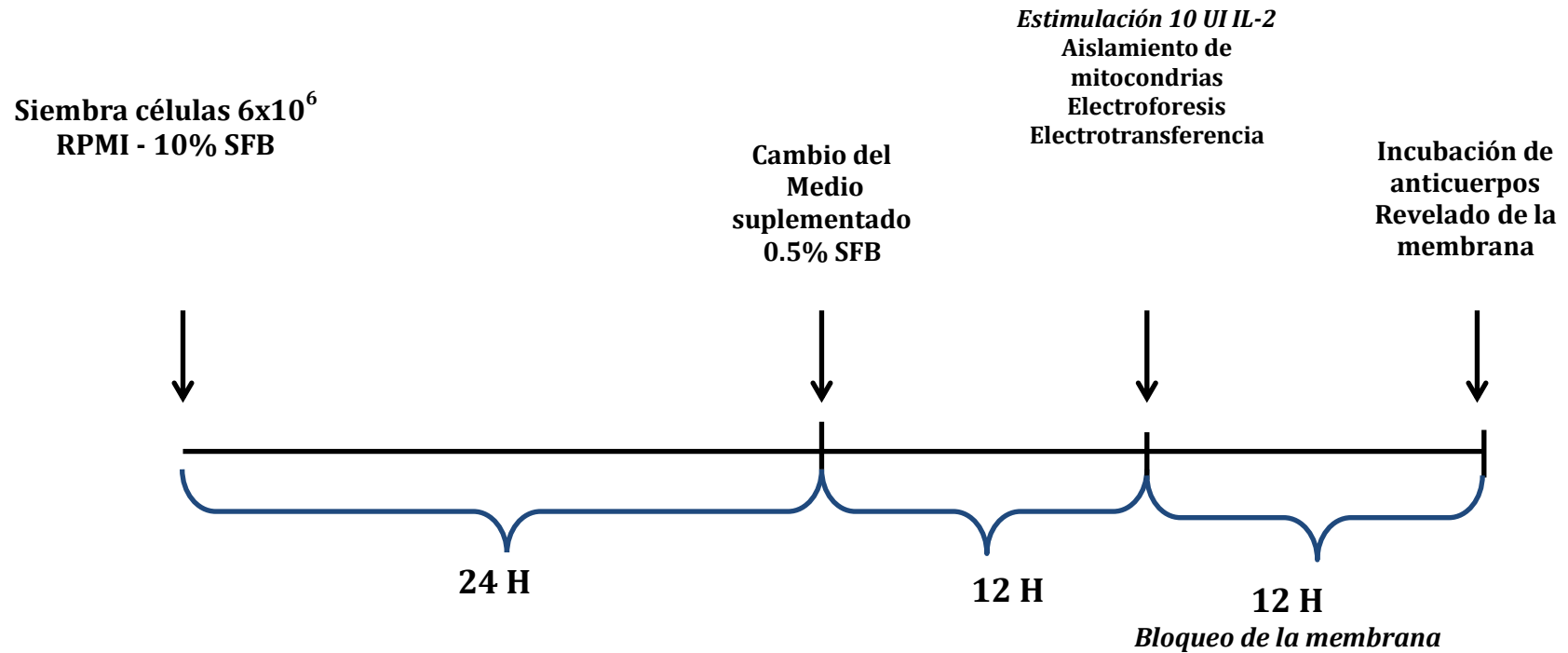
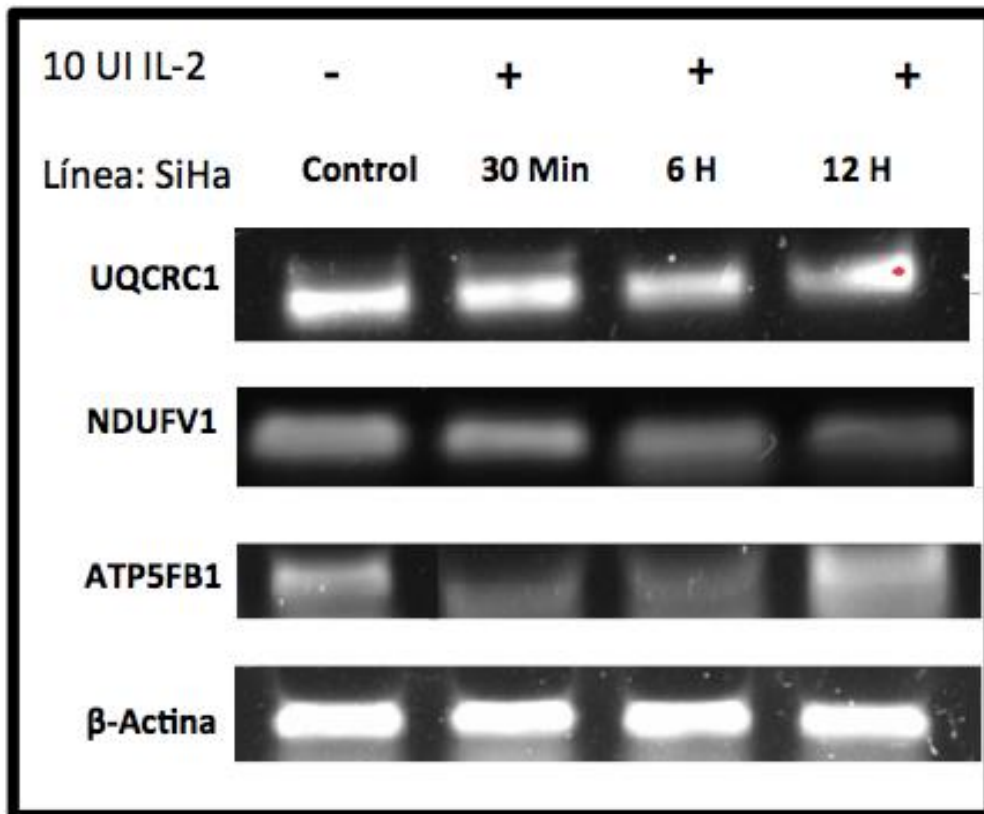


Figura 10.- Diseño experimental para evaluar la translocación de STAT5 a la mitocondria.

RESULTADOS

La expresión génica de NDUFV1 y ATP5FB1 disminuye después del tratamiento con 10 UI/ml de IL-2 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 UI/ml de la citocina durante diferentes tiempos. NDUFV1 y ATP5FB1 mostraron una mayor sensibilidad ante la exposición de la IL-2. NDUFV1 presentó una disminución significativa a las 6 horas (16%) y 12 horas (19%), mientras que el gen ATP5FB1 presentó la disminución a los 30 minutos (45%) y 6 horas (47%), recuperándose a las 12 horas. En el caso del gen UQCRC1, no presentó cambios significativos en ninguno de los tiempos (Figura 11).



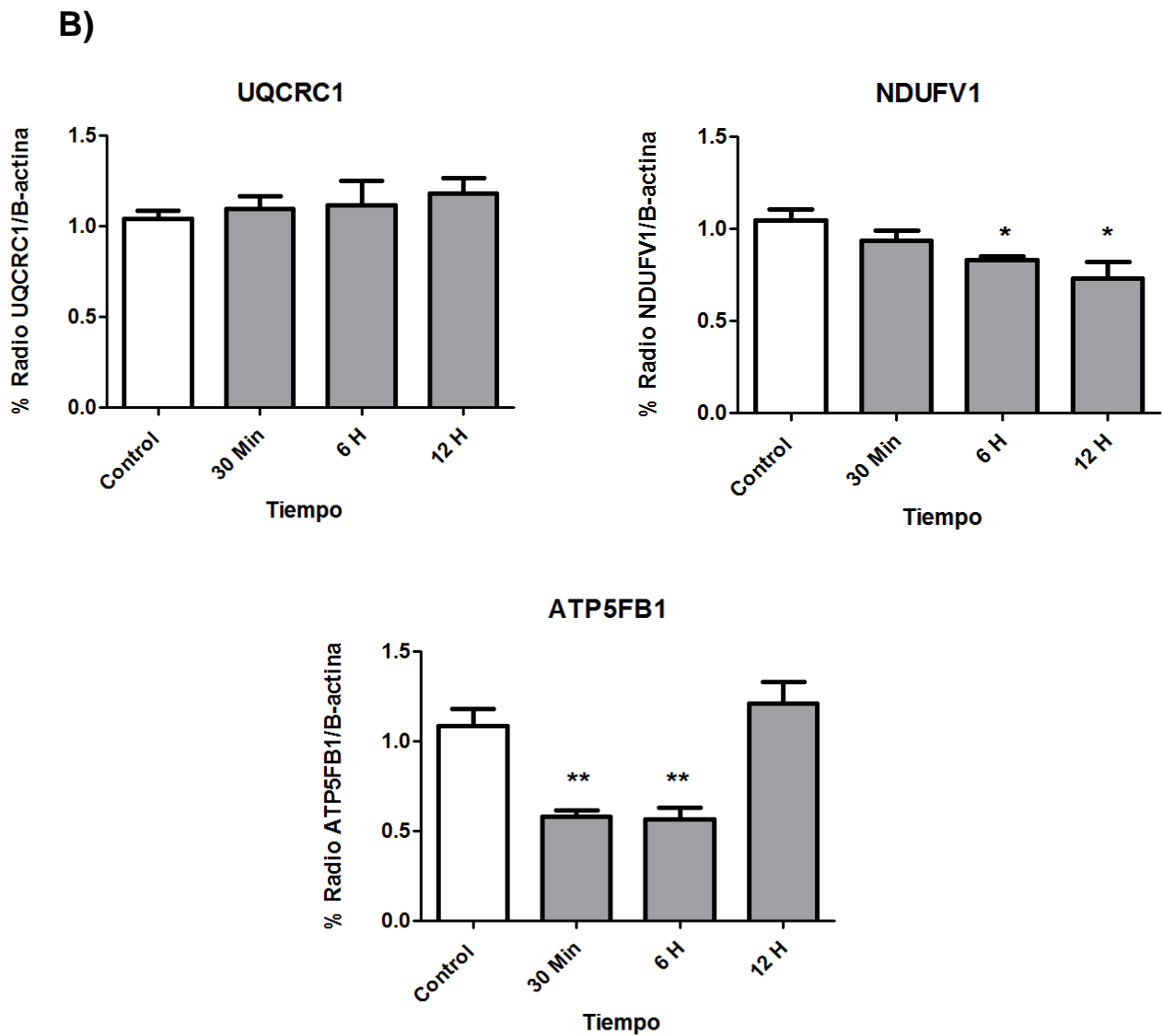
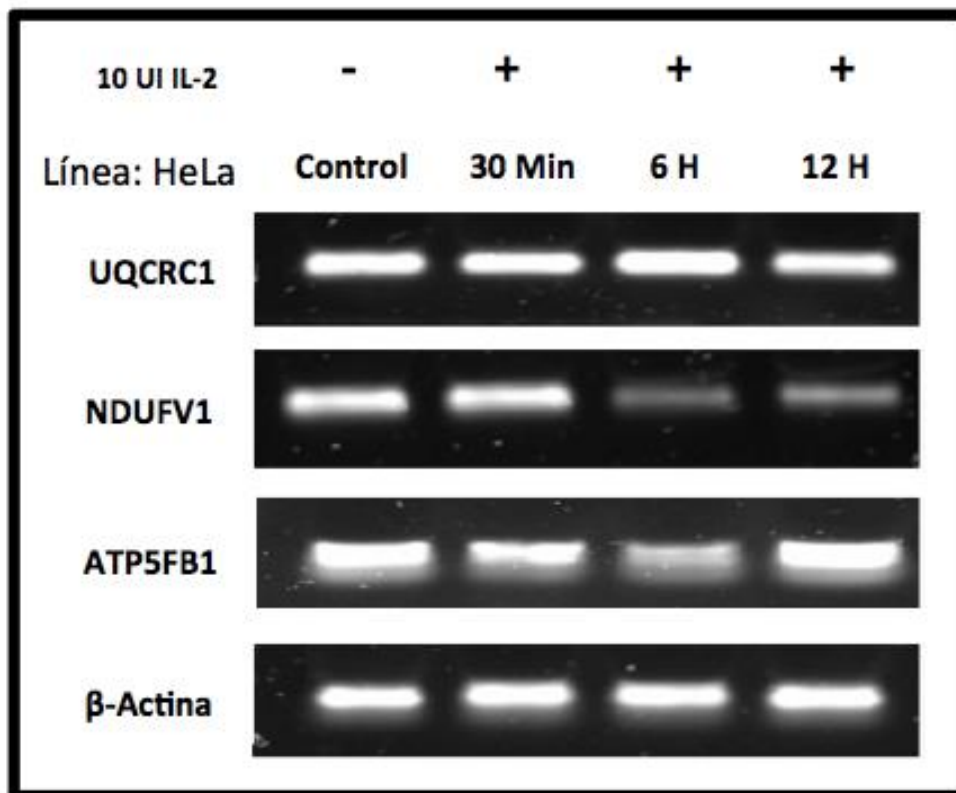


Figura 11.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidoreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular SiHa ante la estimulación de 10 UI/ml de Interleucina 2 (IL-2). A) Imagen representativa del gel de agarosa los resultados de la RT-PCR. B) Histogramas de relación de densitometría de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 usando β -Actina como control de carga. Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *:p<0.005.

La expresión génica de NDUFV1 y ATP5FB1 disminuye después del tratamiento con 10 UI/ml de IL-2 en la línea celular HeLa.

También se evaluó la expresión de genes relacionados con la FO en la línea celular HeLa. Los resultados demuestran que en el gen NDUFV1 existe una disminución de la expresión a las 6 horas (24%) y 12 horas (22%), mientras que el gen ATP5FB1 disminuye a los 30 minutos (17%) y 6 horas (25%). Nuevamente UQCRC1 no muestra cambios significativos (Figura 12).

A)



B)

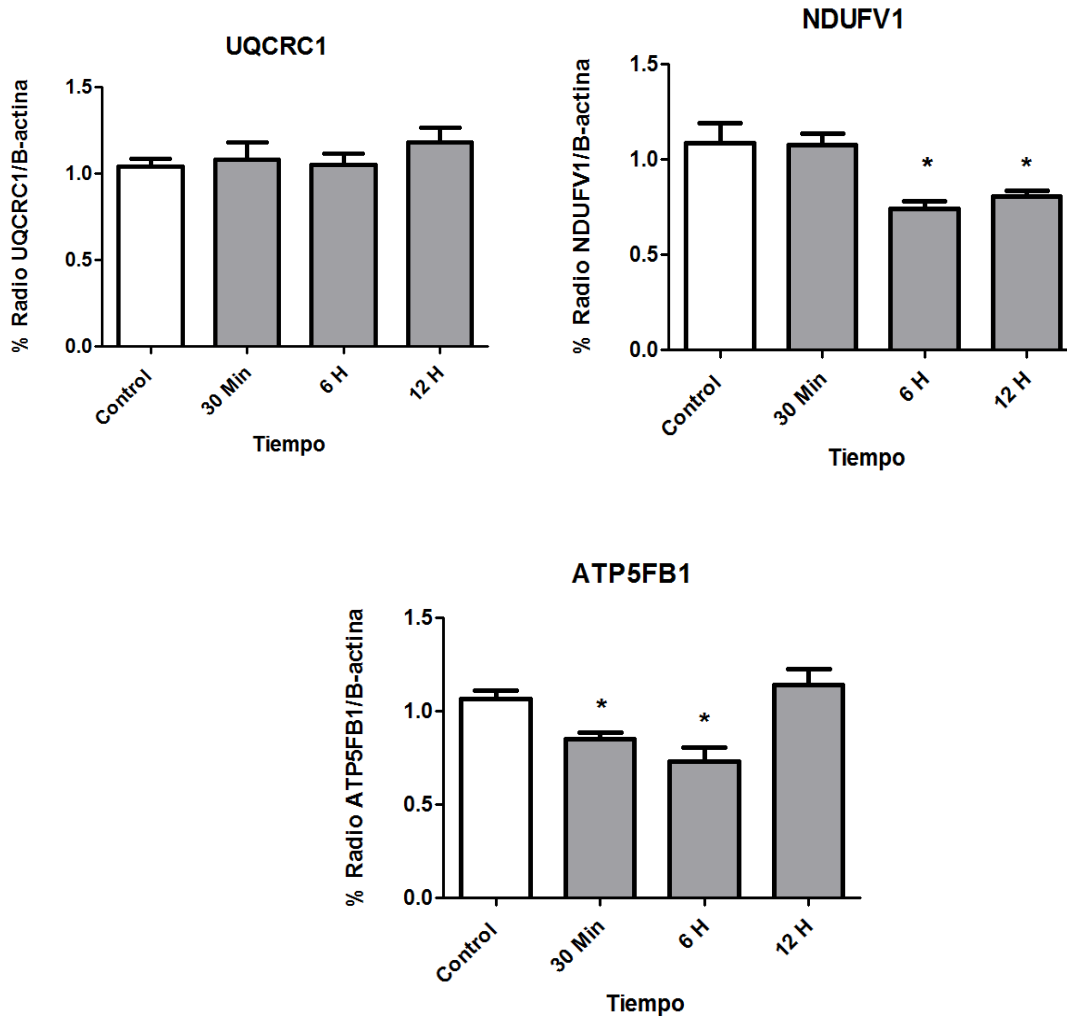


Figura 12.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidoreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular HeLa ante la estimulación de 10 UI/ml de Interleucina 2 (IL-2) A) Imagen representativa del gel de agarosa con las células estimuladas con IL-2. B) Histogramas de relación de densitometría de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 usando β -Actina como control de carga. Tiempos de 30 minutos, 6 horas y 12 horas. Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *:p<0.005.

El silenciamiento transitorio por shRNA disminuyó el STAT5 total en las células SiHa

Se realizó un silenciamiento transitorio de 48 horas para la proteína STAT5 con el fin de confirmar que STAT5 es el responsable de la regulación negativa de los genes de la FO ante la estimulación con 10 UI/ml de IL-2. Las células SiHa silenciadas mostraron por citometría de flujo una disminución del 54% de STAT5 total a comparación con las silvestres (Figura 13).

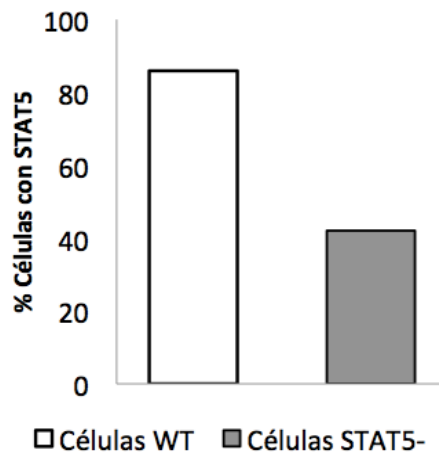
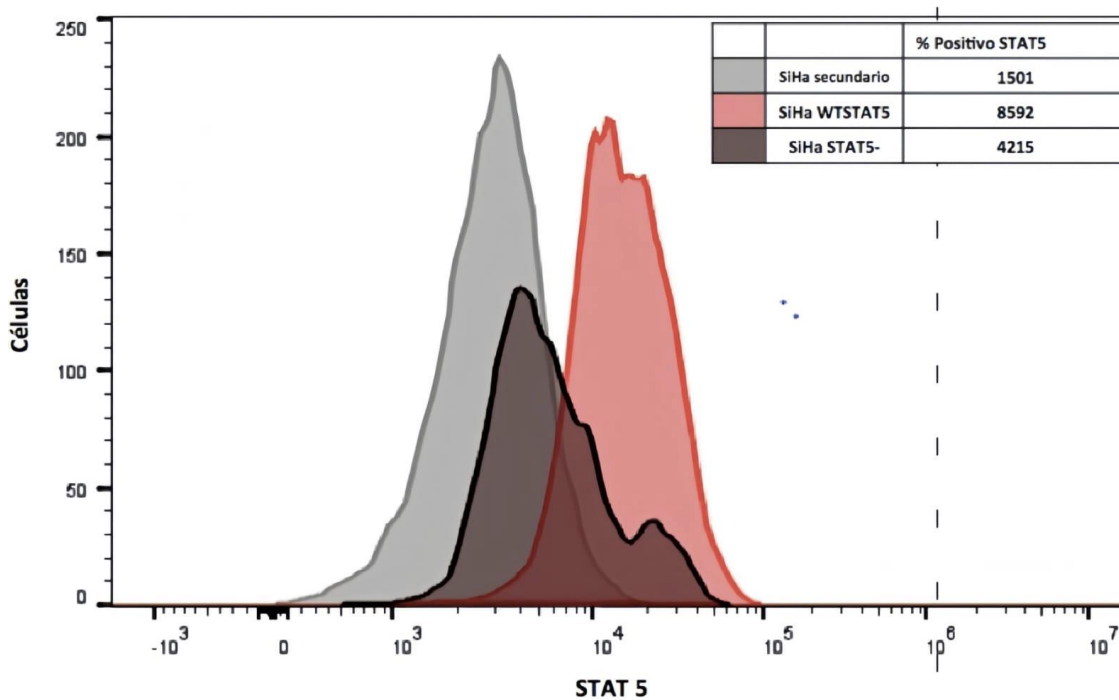
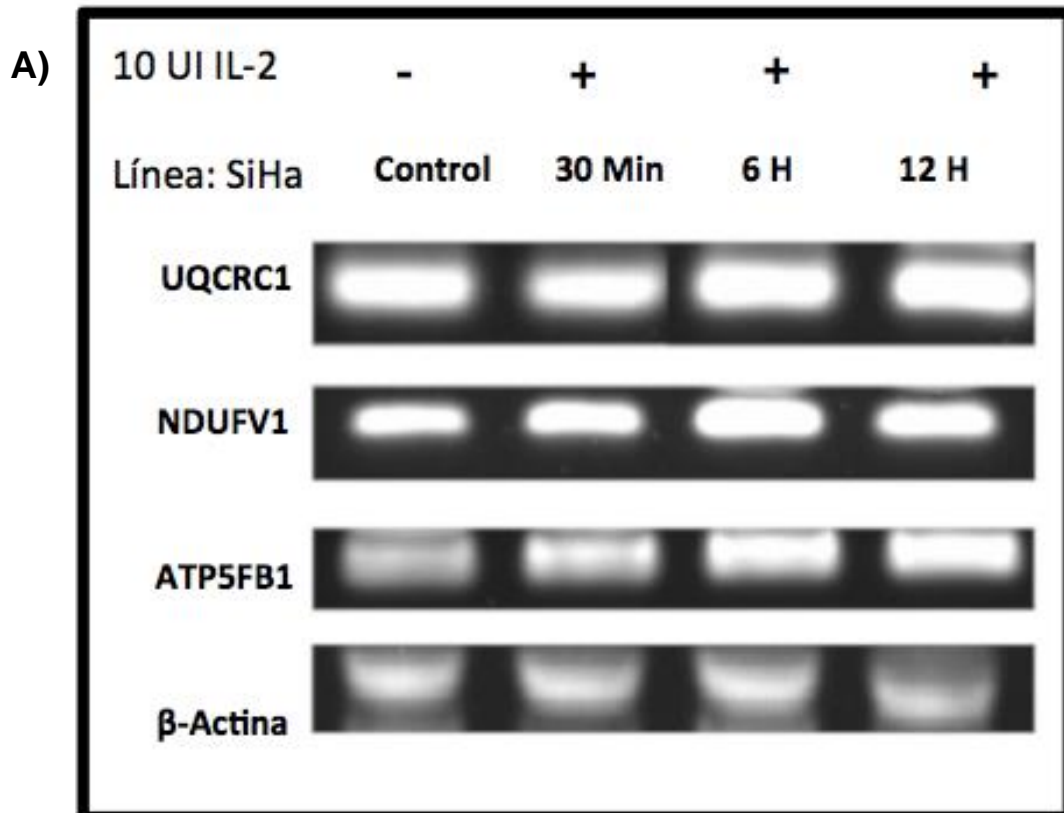


Figura 13.- Evaluación del silenciamiento transitorio de STAT5 en la línea celular SiHa usando el RNA de interferencia (shRNA) evaluado por citometría de flujo. (A) Histograma de las poblaciones de SiHa wild type (WT) y SiHa transfectadas contra STAT5. (B) Evaluación del porcentaje de silenciamiento de STAT5 en la línea celular SiHa.

La expresión génica de NDUFV1 y ATP5FB1 no disminuye después del tratamiento con 10 UI/ml de IL-2 en la línea celular SiHa con STAT5 silenciado.

Los resultados mostraron que las células SiHa con STAT5 silenciado no disminuyeron después de la estimulación de IL-2 (Figura 14) a diferencia de las células silvestres; inclusive el gen ATP5 FB1 mostró un aumento en comparación con el control a las 12 horas (40%). Interesantemente, las células con STAT5 silenciado fueron sensibles a la disminución en el porcentaje de suplementación del SFB, ya que la mayoría muere al pasar de 10% a 0.5% de suero en comparación con las células sin transfectar, por lo cual este paso se descartó para las células transfectadas (Figura 14).



B)

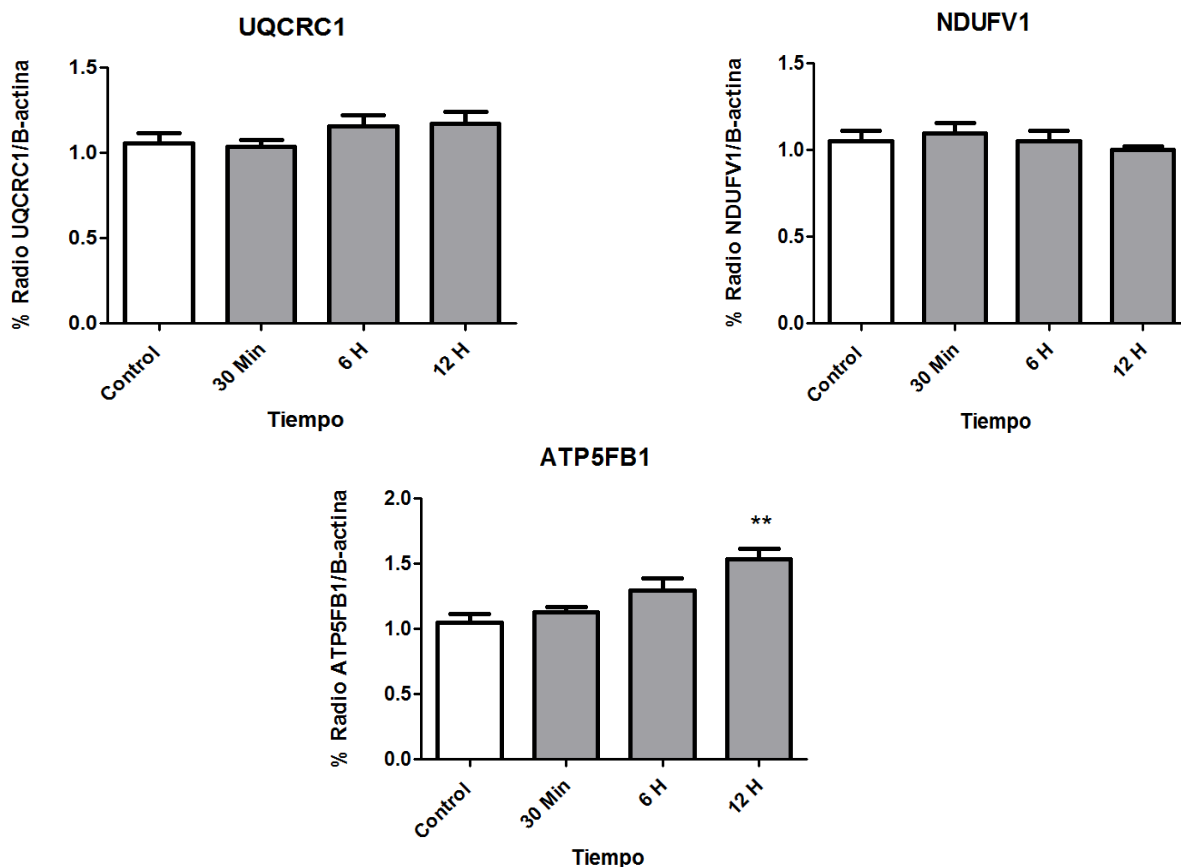
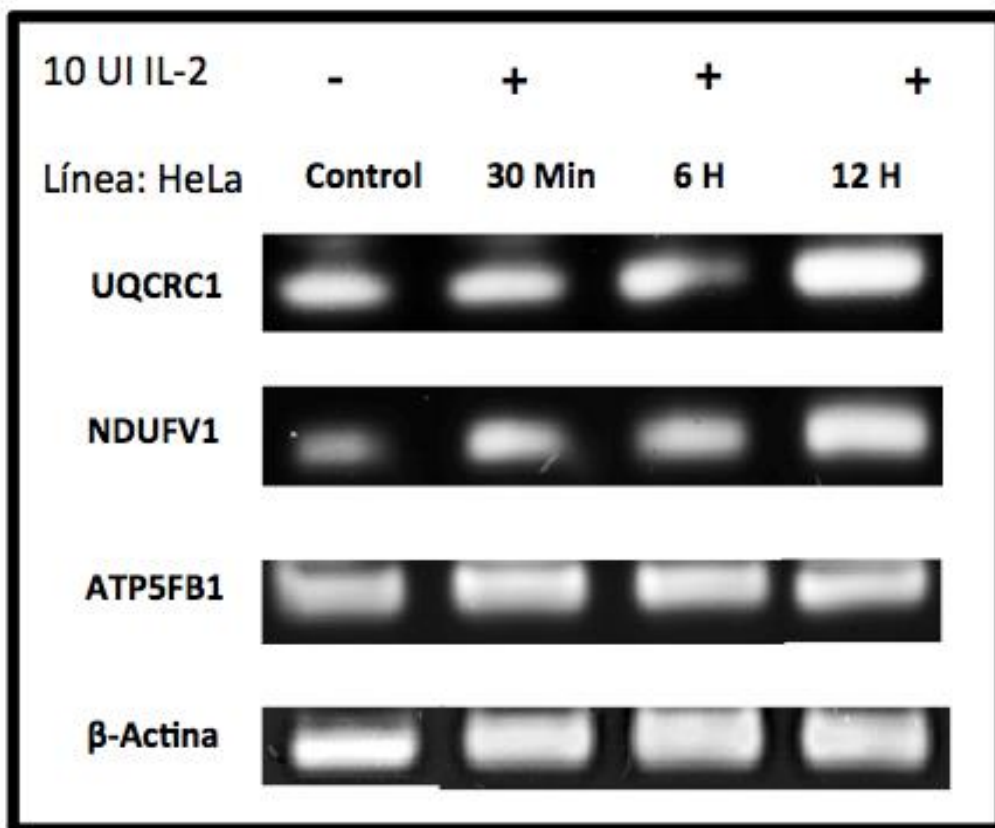


Figura 14.- Expresión de los genes: Subunidad central V1 de ubiquinona oxidorreductasa (UQCRC1), Proteína central 1 de ubiquinol-citocromo C reductasa (NDUFV1) y la Subunidad beta de la ATP sintasa F1 (ATP5FB1) en la línea celular SiHa con STAT5 silenciado estimuladas con 10UI de Interleucina 2 (IL-2). A) Imagen representativa del gel de agarosa con las células estimuladas con IL-2. B) Histograma de relación de densitometría de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 usando β -Actina como control de carga. Tiempos de 30 minutos, 6 horas y 12 horas. Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *: $p < 0.005$.

La expresión génica de NDUFV1 y ATP5 S0 no disminuye después del tratamiento con 10 UI/ml de IL-2 en la línea celular HeLa con STAT5 silenciado

De la misma manera, se silenció transitoriamente a STAT5 en la línea celular HeLa, los resultados mostraron que la regulación negativa que se observó en las células sin silenciar cambió. También, las células mostraron sensibilidad a la reducción del porcentaje de suplementación del SFB. Interesantemente, en esta línea celular se observó un aumento en la expresión del ARNm en el gen NDUFV1, especialmente a las 6 horas (24%) 12 horas (41%) y el gel ATP5FB1 a los 30 minutos (7%) y 6 horas (13%), mostrando un efecto opuesto en las células silvestres ante la estimulación de 10 U/ml de IL-2 (Figura 15).

A)



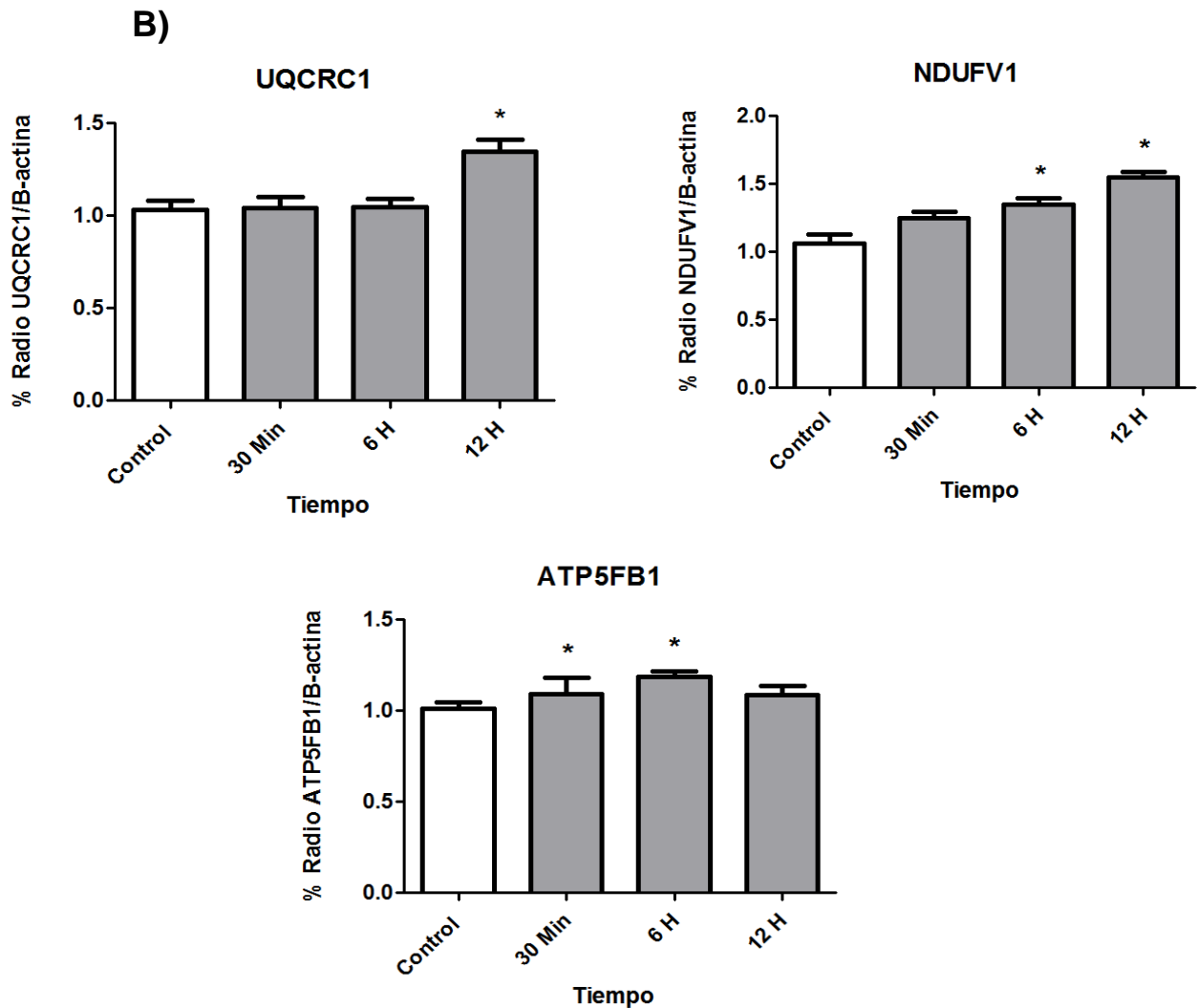


Figura 15.- Expresión de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 en la línea celular HeLa con STAT5 silenciado. A) Imagen representativa del gel de agarosa con las células estimuladas con IL-2. B) Histograma de relación de la densitometría de los genes UQCRC1, NDUFV1 y ATP5FB1 usando β -Actina como control. Tiempos de 30 minutos, 6 horas y 12 horas. Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *:p<0.005.

La estimulación de IL-2 aumentó los niveles de fosforilación de STAT5 en las mitocondrias en ambas líneas celulares.

Para analizar la translocación de STAT5 a las mitocondrias de la línea celular HeLa, se separaron las mitocondrias y posteriormente las proteínas mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y se analizaron mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-STAT5. Bandas que corresponden al peso molecular de STAT5 se observaron en las condiciones del control. En la línea celular SiHa se observó que STAT5 en la mitocondria e interesantemente un incremento de STAT5 fosforilado (estado activo) a los 15 minutos de un 20% a comparación de la unidad del control y un aumento a los 30 minutos y 1 hora del 50% comparado con el control (relación de la densitometría realizada con Actina del citoplasma). Estadísticamente el STAT5 total no fue afectado (Figura 16). En la línea celular HeLa STAT5 fosforilado aumentó un 24% a los 15 minutos y posteriormente a los 30 y 1 hora incrementó un 46 y 49% respectivamente, igualmente el STAT5 total no se vio afectado (Figura 17).

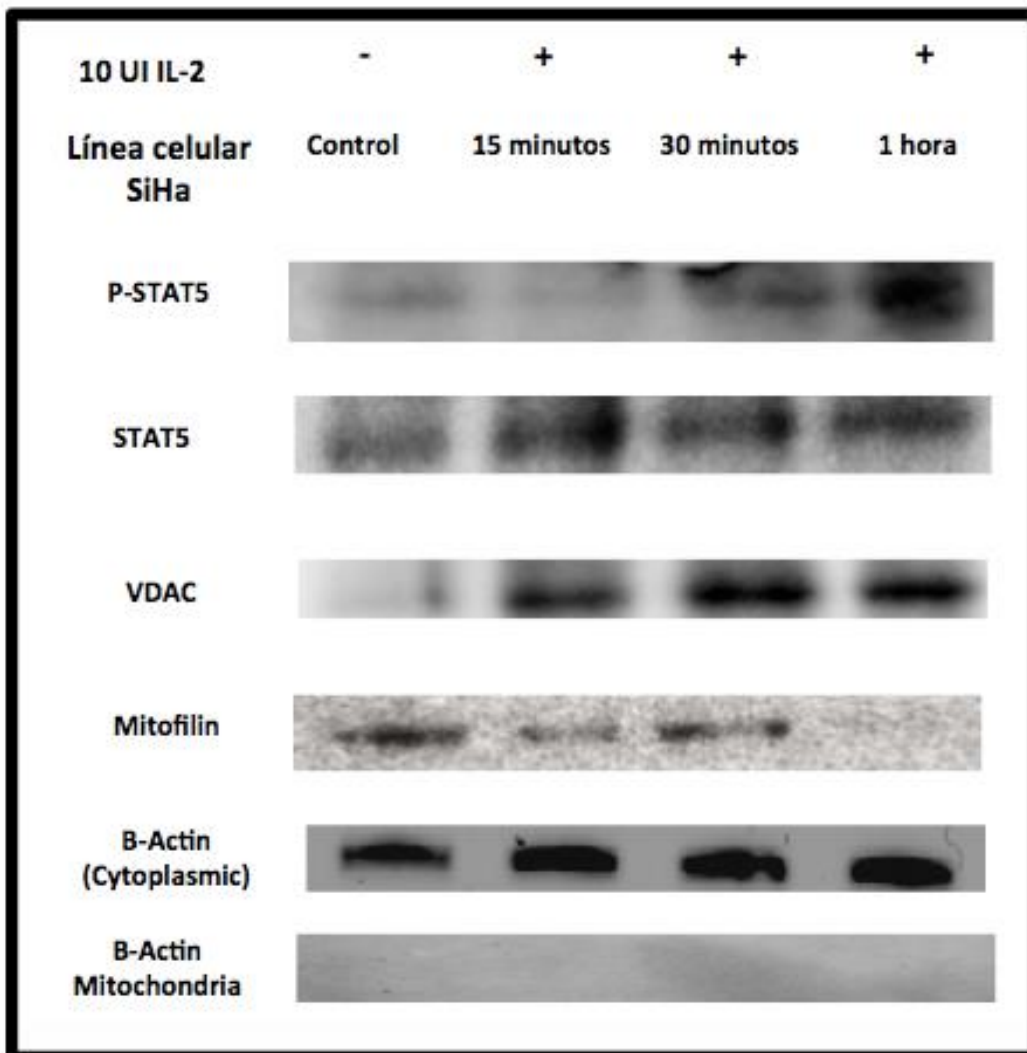
Debido a que ambos controles mitocondriales (VDAC y mitofilina) de carga mostraron cambios en sus niveles de proteína por la estimulación de IL-2, se realizó un lisado total y usando la misma técnica de cuantificación y cargado de muestra, se usó β -actina para el análisis densitométría, si bien no es una prueba que muestra el control de carga de proteínas mitocondriales, se trató de mostrar de forma indirecta que las muestras fueron cargadas de manera correcta.

IL-2 aumenta los niveles de VDAC y mitofilina en la mitocondria en células de cáncer de cérvix.

Como control de carga y marcador de mitocondria se usó la proteína de canal selectivo de aniones dependiente del voltaje (VDAC), , éste se comporta como un poro de difusión general para moléculas hidrofílicas pequeñas, presente en la membrana externa de mitocondria, su función es regular la entrada y salida de diversas moléculas, con el fin de mantener la homeostasis de la mitocondria. Los

resultados muestran un aumento de la proteína VDAC a los 15 minutos, 30 minutos y 1 hora en respuesta al estímulo con 10 UI/ml de IL-2. Este aumento se observó en ambas líneas celulares. Debido a estos resultados decidimos utilizar a la mitofilina como control de carga y marcador de mitocondria. Esta proteína participa en la formación de las crestas en la membrana interna de la mitocondria. Al igual que la proteína VDAC, la mitofilina también aumenta en respuesta a la estimulación con IL-2, en especial a los 30 minutos en la línea celular HeLa, manteniéndose en la hora, al igual que las proteínas STAT5 y pSTAT5. Se realizó el análisis de densitometría usando como control de carga a la β -actina, a la cual se le realizó el mismo procedimiento de cuantificación y cargado de muestras (Figuras 16 y 17).

A)



B)

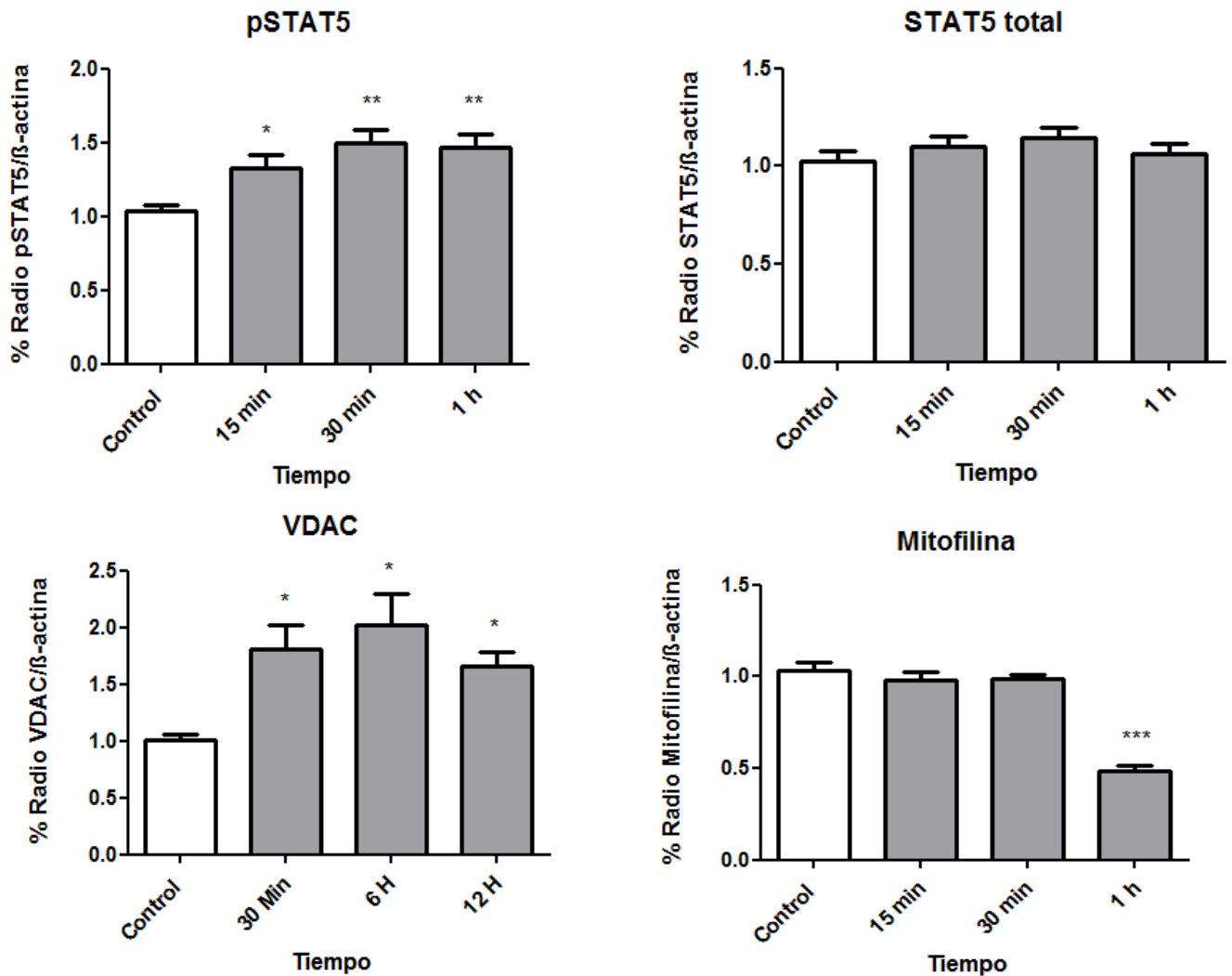
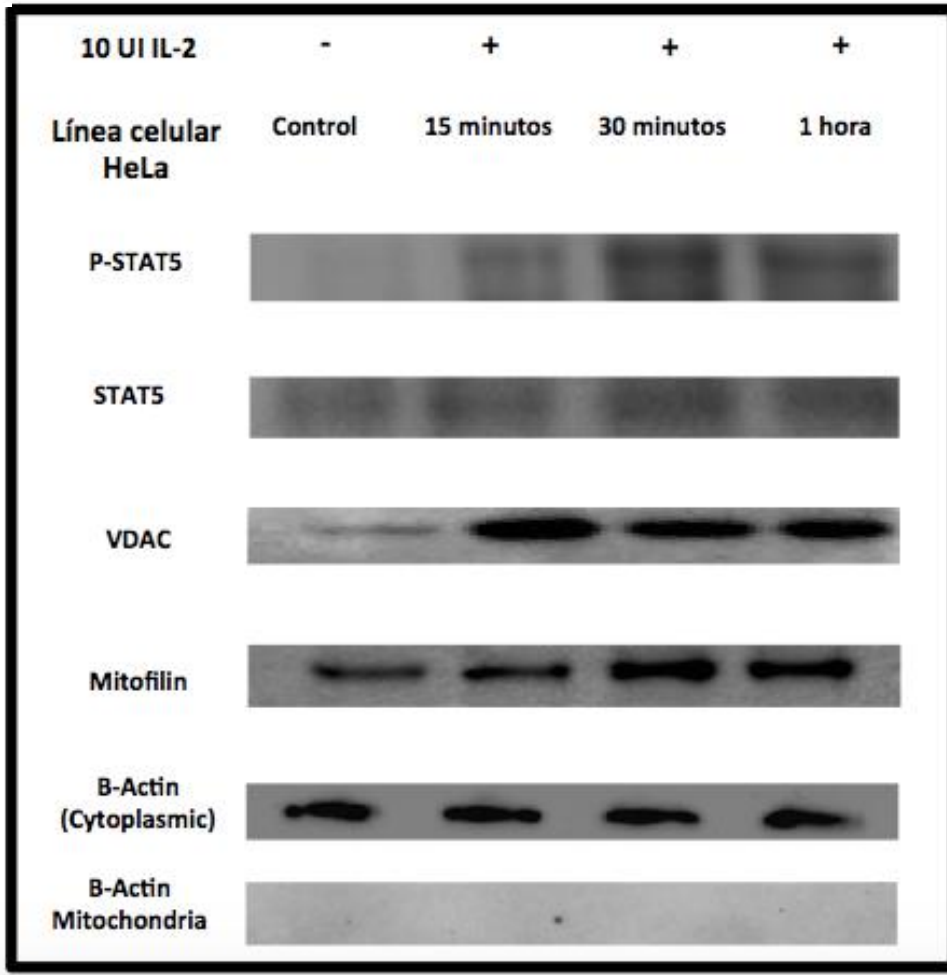
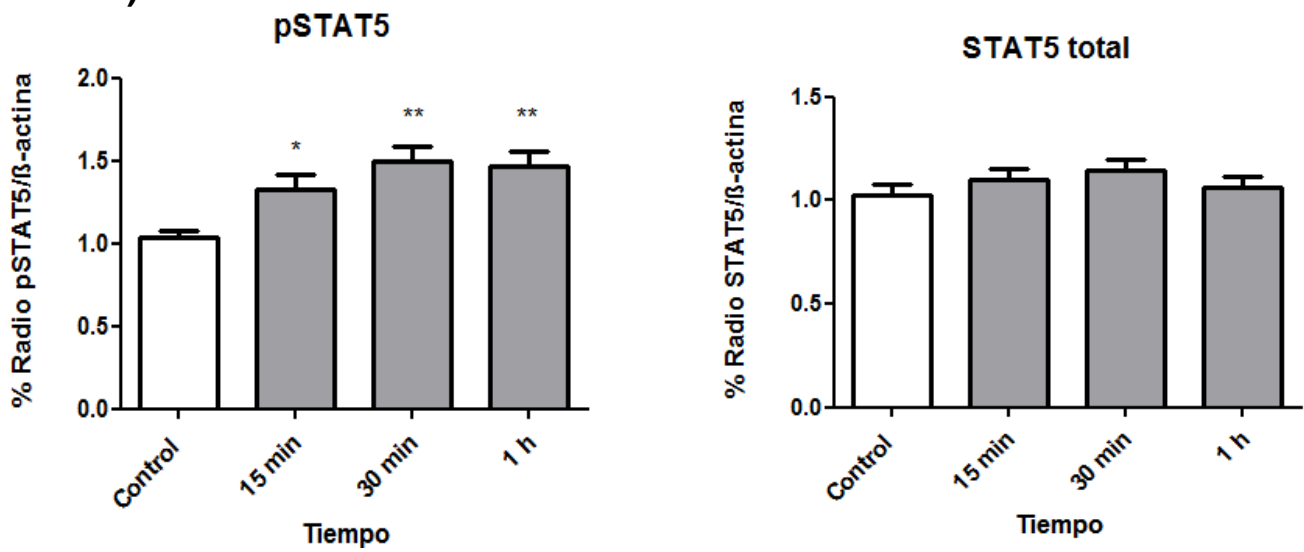


Figura 16. -Presencia de pSTAT5, STAT5 y VDAC en mitocondrias de células de cáncer de cérvix SiHa. A) Inmunoblot representativo del gel de poliacrilamida. B) Histograma de densitometría (relación proteína de interés/ β -actina citoplasmática). Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *:p<0.005.

A)



B)



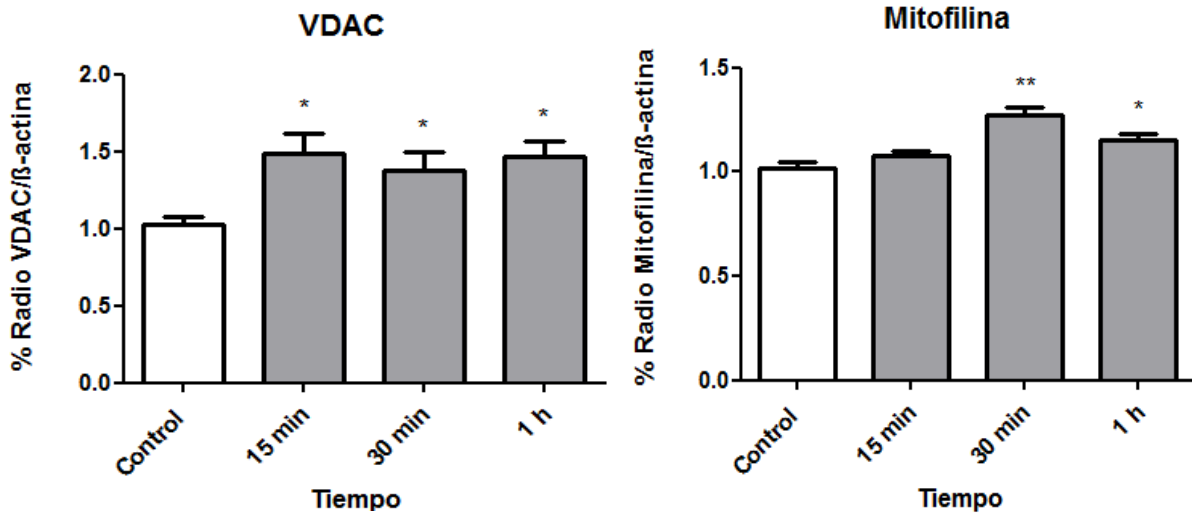


Figura 17.- Presencia de pSTAT5, STAT5 total, VDAC y mitofilina en células de cáncer de cérvix HeLa. A) Inmunoblot de pSTAT5, STAT5, VDAC y mitofilina en mitocondrias. B) Histograma de densitometría relación proteína de interés/ β -actina citoplasmática. Prueba estadística ANOVA de una vía no pareada. *:p<0.005.

DISCUSIÓN

Una de las características principales del cáncer es la proliferación sostenida, la búsqueda sobre los diferentes mecanismos que apoyan esta característica han resultado en la evidencia de grupos de moléculas que funcionan como factores de transcripción que pueden regular la expresión de genes nucleares y mitocondriales relacionados con la división celular. La vía de señalización JAK-STAT se ha asociado con la progresión del cáncer de cérvix y regula diferentes eventos biológicos, como la proliferación celular y el metabolismo. Se demostró que en líneas celulares de cáncer de cérvix el tratamiento con IL-2 aumenta la proliferación celular, igualmente se descubrió que estas líneas celulares presentan el receptor de alta afinidad de IL-2-R, la proteína JAK 3 (activa constitutivamente) y STAT5 y que el mismo tratamiento con IL-2 aumenta la fosforilación de ambas proteínas, y por lo tanto su estado activo, lo cual muestra que la vía de señalización IL-2-JAK3-STAT5 está activa en las células de cáncer de cérvix (19, 20). El metabolismo celular es un fenómeno altamente complejo y dinámico que desde el descubrimiento de su papel en el desarrollo del cáncer ha tomado importancia en la investigación básica de la enfermedad.

Nuestros resultados en la regulación negativa por STAT5 a genes de la FO apoyan los resultados del trabajo con la línea celular HEK293 de cáncer de riñón y la migración de STAT5 a la mitocondria, en dicho trabajo se propone la capacidad de regular la expresión del ADN mitocondrial además de poder unirse a la subunidad E2 de la PDC, si bien nuestros resultados son en genes nucleares no quita la posibilidad que la vía IL-2-JAK-STAT5 podría igualmente regular genes del ADN mitocondrial en las células de cáncer de cérvix. La importancia de que en células de cáncer de cérvix STAT5 pueda regular a la negativa los genes NDUFV1 y ATPFB1 es un resultado muy importante, es muy probable que al disminuir el ARN mensajero de estos genes la cantidad de proteína también sea afectada, sin embargo en las síntesis de proteínas aún existen muchos pasos de regulación y no es seguro afirmar que la disminución de la transcripción afecte a la proteína,

falta analizar el nivel de proteína de estos genes. Por otro lado en caso de que se afecta a la proteína, la actividad de los complejos 1 y la ATP sintasa se comprometerían y la actividad de la CTE disminuiría. En todo caso sería importante en el futuro medir la actividad de estos complejos ante la estimulación de IL-2 para dilucidar aún más este fenómeno biológico (35).

La disminución de la actividad de la CTE se ha descrito como una estrategia de supervivencia en células tumorales, es la capacidad de aumentar el papel de la glucólisis y disminuir el ATP producido por la CTE, esto se justifica debido a que en esta, es la mayor fuente de síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS: siglas en inglés), debido al escape de algunos electrones y su reacción con moléculas de oxígeno. Las ROS en altas concentraciones son altamente tóxicas y debido a su capacidad de reaccionar con otras moléculas como el ADN o proteínas dañando su estructura y por lo tanto su función, se han propuesto como una adversidad que las células cancerosas deben superar (53).

En nuestro grupo de investigación se demostró que la proteína STAT3, proteína hermana de STAT5, regula en células de cáncer de cérvix la expresión de genes relacionados con el efecto Warburg, los genes PDK1, HIF-1 α y GLUT1 aumentaron su expresión cuando las células de cáncer de cérvix fueron tratadas con IL-2, lo que demuestra el papel de la vía en la regulación del metabolismo celular. El aumento del GLUT1 ayuda a la absorción de glucosa de la célula, aumentando el flujo glucolítico, el factor de transcripción HIF-1 α tiene como blanco el aumento de la expresión de genes de enzimas de la glucólisis y finalmente PDK1 es un importante regulador del paso de la glucólisis hacia el ciclo de Krebs, regula negativamente a la PDH estancando el flujo a la glucólisis y dirigiendo el piruvato a la formación de lactato, el cual también se ha demostrado tener diferentes papeles, como el escape inmune, la ETM y la angiogénesis en diferentes cánceres (12). Más recientemente se demostró que STAT5 también puede regular los genes GLUT1, HIF-1 α y PDK1 al igual que puede aumentar la secreción de lactato. La prueba de que las STATs puedan regular las tres vertientes del efecto Warburg: regulación del flujo glucolítico, producción de lactato

y disminuir la actividad de la CTE regulando negativamente los genes de las subunidades de los complejos, todo en conjunto muestra la importancia de la vía de señalización en el metabolismo celular de las células de cáncer de cérvix (40).

Con relación a STAT5, al ser un factor de transcripción, no se descarta la idea de que pueda regular genes del metabolismo celular de forma directa o indirecta. Se demostró que la vía JAK/STAT, específicamente STAT5 puede regular el metabolismo de la glucosa al incrementar la expresión de la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK), enzima crucial para el cruce de la glucólisis al ciclo de Krebs. De la misma manera, STAT5 tiene como gen diana al factor inducible por hipoxia 2 (HIF-2 α) en células troncales hematopoyéticas, dicho factor regula genes importantes en la glucólisis que afectan el flujo glucolítico, fenómenos importantes del efecto Warburg (41). Aún no se tiene mucha evidencia de factores de transcripción que regulen la expresión específica de proteínas de las subunidades de la CTE, sin embargo, se sabe que el aumento de la proliferación, especialmente por CDK 1 regulan la respiración mitocondrial en células de cáncer de mama (42).

Por otro lado HIF- α puede regular la eficiencia de la cadena respiratoria al actuar sobre diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, se demostró que al usar el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) para aumentar la expresión de HIF-1 α en la línea celular de hepatoma humano HepG2, el consumo de oxígeno mitocondrial disminuía en las mitocondrias dependientes de los complejos I, II y IV. demostraron que en células de mamíferos, HIF-1 α controlaba recíprocamente la expresión de la subunidad de la citocromo c oxidasa 4 (COX4) en circunstancias de baja disponibilidad de O₂ al promover la transcripción de los genes que codifican COX4 (52).

De la misma manera se sabe poco del papel de las STAT como reguladores negativos, en el trabajo de Bedel y colaboradores (2011) se describe que en líneas celulares de cáncer colorrectal STAT3 (proteína hermana de STAT5) regula negativamente a la proteína Secuencia A relacionada con el polipéptido de clase I del MHC (MICA), igualmente los autores no mencionan el mecanismo exacto,

pudiendo ser de manera directa o indirecta (43). En este trabajo se propone por primera vez que STAT5 en su estado fosforilado puede regular la expresión de genes de la CTE. El estímulo con 10 UI de IL-2 indujo la regulación de los genes NDUFV1 y ATP5FB1 a la baja. Cuando se silenció STAT5 en las líneas celulares se observó el efecto contrario ya que la expresión del gen fue similar al control, inclusive en tiempos de 6 y 12 horas aumentó ligeramente. Estos resultados muestran que STAT5 participa en la regulación génica de los genes de la CTE.

En cuanto a la translocación de STAT5 a la mitocondria, se han reportado factores de transcripción como p53, NF- κ B, inclusive STAT3 pueden migrar a la mitocondria bajo ciertos estímulos y regular sus funciones, como el ciclo de Krebs e inclusive el funcionamiento de la CTE, ya sea al unirse directamente a los complejos o al regular su expresión génica (44).

Los resultados muestran por primera vez que en las líneas celulares de cáncer de cérvix SiHa y HeLa, STAT5 está presente en un estado fosforilado basal en la mitocondria, y la fosforilación aumenta en respuesta al estímulo con IL-2, especialmente a los 30 minutos. Este aumento de la cantidad de proteína en la mitocondria a los 30 minutos apoya los resultados anteriores de nuestro grupo que mostraron que STAT5 disminuye en su estado fosforilado en el citoplasma después de 35 minutos de la estimulación con IL-2, lo que indica que probablemente ya habría migrado al núcleo o a la mitocondria para regular la expresión génica. Nuestros resultados abren una nueva línea de investigación sobre las posibles funciones de STAT5 dentro de la mitocondria, como puede ser regular a la baja diferentes genes, al igual que en el núcleo especialmente a los relacionados con la cadena de transporte de electrones (CTE), ya que uno de los pasos importantes en el efecto Warburg es la disminución de la actividad mitocondrial y probablemente de la fosforilación oxidativa. Por otro lado se ha reportado que STAT5 puede tener funciones fuera de la regulación de la transcripción, en el trabajo de Zhang y colaboradores (2021) informan que en las células embrionarias HEK293, STAT5A además de migrar a las mitocondrias y puede interaccionar con el complejo de piruvato deshidrogenasa (PDC), una

enzima mitocondrial que conecta dos vías metabólicas clave, la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico. El STAT5A mitocondrial altera la integridad del PDC, inhibiendo así su actividad y remodelando la glucólisis celular y la fosforilación oxidativa. La translocación mitocondrial de STAT5A aumenta en condiciones hipóxicas. Esto fortalece el efecto Warburg en las células cancerosas y promueve el crecimiento celular in vitro el crecimiento tumoral in vivo. Aún no se sabe como STAT5 puede migrar a la mitocondria, ya sea de una manera directa o a través de otras moléculas de transporte que puedan ingresar a la mitocondria, la ubicación específica de STAT5 en la mitocondria tampoco se ha medido, ya que podría estar en el espacio intermembranal mitocondrial o en la matriz de esta.

Un resultado inesperado e interesante de este trabajo es que tanto VDAC como mitofilina aumentan su presencia en la mitocondria en respuesta al estímulo con 10 UI de IL-2. VDAC tiene función de canal iónico, sin embargo, en los últimos años ha demostrado tener un papel más relevante en el metabolismo celular.

A diferencia de la membrana mitocondrial interna, que solo permite el paso de ciertas moléculas a través de transportadores específicos muy diversos, la membrana externa es mucho más permeable y desempeña esencialmente un papel de filtro molecular de moléculas de peso molecular inferior a 3 a 5 kDa. VDAC, se encuentra en la unión entre el citoplasma y la mitocondria y controla la entrada y salida de metabolitos que se requieren para mantener la homeostasis energética y la supervivencia. El ATP es probablemente la molécula más importante que se desplaza a través de los VDAC (45). Otro papel de VDAC en la regulación del metabolismo, es su relación con la enzima hexocinasa (HK).

La hexocinasa es una enzima citosólica que cataliza la fosforilación de las hexosas en su sexto carbono, es particularmente importante para el catabolismo de la glucosa, ya que es la primera enzima de la glucólisis. Además, la expresión de HK se potencia en hipoxia, ya que es un gen diana de HIF-1. Se acepta comúnmente que HK se une a la membrana externa de las mitocondrias en asociación con VDAC, lo que le confiere a HK un fácil acceso al ATP. A cambio, las mitocondrias se benefician del ADP producido por HK. La fuerte relación entre

VDAC y HK confirma el papel central que tiene VDAC en la interconexión entre la regulación de la glucólisis y la respiración mitocondrial. Esta asociación HK/VDAC hace que HK sea menos sensible a su producto glucosa-6-fosfato, favoreciendo su actividad y promoviendo el efecto Warburg (46,47).

Por otro lado, la mitofilina es una proteína reguladora de las crestas mitocondriales. La mitofilina se encuentra en el espacio entre el límite interno y las membranas externas, donde forma una interacción homotípica y se ensambla en un gran complejo proteico multimérico. La regulación negativa de la mitofilina en las células HeLa mediante el uso de ARN de interferencia conduce a una disminución de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis, lo que sugiere una función mitocondrial importante (48). Se tienen pocos antecedentes de su papel en el metabolismo celular, sin embargo, su funcionamiento en el ciclo celular y la apoptosis puede ser un indicio que ambos fenómenos estén altamente relacionados y que la activación de vías de proliferación celular, como la vía JAK/STAT, podrían alterar su comportamiento en las mitocondrias. Una relación indirecta interesante de la mitofilina es el trabajo de Young y colaboradores en 2010, donde mostraron que esta proteína puede regular a la proteína de esquizofrenia 1 (DISC1). La disminución de mitofilina, disminuyó la función de DISC1 y por lo tanto indujo disfunción mitocondrial, evidenciada por una disminución de las actividades de la NADH deshidrogenasa mitocondrial, una reducción del contenido de ATP celular y una dinámica perturbada del Ca^{2+} mitocondrial. Interesantemente se ha asociado un papel metabólico de la proteína DISC1; un trabajo realizado en astrocitos encontró que la eliminación de la expresión de DISC1 provocó la disminución de la absorción de glucosa, así como una reducción de la fosforilación oxidativa y la glucólisis, resultando en la relación mitofilina-DISC1 importante procesos metabólicos (49,50).

Nuestros resultados podrían ser los primeros en demostrar un papel más importante de estas dos proteínas en el desarrollo del cáncer, especialmente en el metabolismo celular. Es probable que estos cambios puedan ser independientes de STAT5, la estimulación con 10 UI de IL-2 podría inducir muchos más cambios

en las mitocondrias de los que se tenían pensado, especialmente en proteínas clave para el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la IL-2 induce una regulación negativa en genes relacionados con la CTE, que STAT5 transloca a la mitocondria y está presente en su forma fosforilado, además se reporta el aumento de VDAC y mitofilina en la mitocondria ante la estimulación de 10UI/ml de IL-2, lo cual indica la participación de la vía de señalización IL-2/JAK/STAT5 en la desregulación del metabolismo celular del cáncer.

CONCLUSIONES

La Interleucina 2 junto con la vía STAT5 regula a la baja la expresión de genes relacionados con la CTE, además de aumentar su translocación a la mitocondria, por lo tanto se acepta la hipótesis planteada, este cambio negativo podría afectar a la síntesis de proteínas de la CTE por lo tanto disminuir su actividad, este cambio afectaría a la actividad mitocondrial y aportaría positivamente al efecto Warburg, donde las células presentan un alto flujo glucolítico y una baja actividad de la CTE.

STAT5 se encuentra en la mitocondria de las células Cacu y la estimulación de IL-2 aumenta su fosforilación y translocación, es probable que pueda tener un papel dentro de la mitocondria. Por otra parte, dicha estimulación aumenta la presencia de las proteínas mitocondriales VDAC y mitofilina, mostrando un papel más relevante de la IL-2 en la reprogramación metabólica.

PERSPECTIVAS

Debido a que STAT5 puede regular genes relacionados con la CTE de la mitocondria e igualmente translocar a esta, se plantean las siguientes preguntas:

- Mecanismo de translocación de STAT5 hacia la mitocondria.
- Papel de STAT5 en la regulación de genes del ADN mitocondrial (CTE)
- Mecanismo de STAT5 en la regulación genes mitocondriales (CTE)
- Papel de STAT5 en la síntesis de los complejos de la CTE así como su posible regulación en su actividad.
- Diferencias entre líneas celulares de cáncer de cérvix

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-674.
- 2) Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*. 41(3), 211–218.
- 3) Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- 4) Tulay P, Serakinci N. (2016). The role of human papillomaviruses in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat*;2:201-13.
- 5) Woodman, C. B., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer*. 7(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
- 6) Kim, H. P., Imbert, J., y Leonard, W. J. (2006). Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*. 17(5), 349–366.
- 7) 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 Invest*. 32:115-25.
- 8) Spolski, R., Li, P., & Leonard, W. J. (2018). Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nature reviews. Immunology*. 18(10), 648–659. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>
- 9) Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal transduction and targeted therapy*. 6(1), 402.
- 10) Valle-Mendiola A, Gutiérrez-Hoya A, Lagunas-Cruz M del C, Weiss-Steider B, Soto-Cruz I. (2016). Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer. *Mediators Inflamm.* 2016:2849523. doi: 10.1155/2016/2849523. PMID: 27293315; PMCID: PMC4880719.

- 11) 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.
- 12) Rojas-Mercado. R. 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 de Maestría. Ciudad de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 2021.
- 13) Halim, C. E., Deng, S., Ong, M. S., & Yap, C. T. (2020). Involvement of STAT5 in *Oncogenesis*. *Biomedicines*. 8(9), 316. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090316>
- 14) Humphreys, R. C., & Hennighausen, L. (1999). Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 10(10), 685–694.
- 15) Rani, A., & Murphy, J. J. (2016). STAT5 in Cancer and Immunity. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 36(4), 226–237.
- 16) Mao, Y. L., Li, Z. W., Lou, C. J., Pang, D., & Zhang, Y. Q. (2011). Phospho-STAT5 expression is associated with poor prognosis of human colonic adenocarcinoma. *Pathology oncology research. POR*, 17(2), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s12253-010-9321-3>
- 17) Xiong, H., Su, W. Y., Liang, Q. C., Zhang, Z. G., Chen, H. M., Du, W., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2009). Inhibition of STAT5 induces G1 cell cycle arrest and reduces tumor cell invasion in human colorectal cancer cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 89(6). 717–725. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.11>
- 18) Mao, Y. L., Li, Z. W., Lou, C. J., Pang, D., & Zhang, Y. Q. (2011). Phospho-STAT5 expression is associated with poor prognosis of human colonic adenocarcinoma. *Pathology oncology research. POR*, 17(2), 333–339. <https://doi.org/10.1007/s12253-010-9321-3>

- 19) Tan, S. H., Dagvadorj, A., Shen, F., Gu, L., Liao, Z., Abdulghani, J., Zhang, Y., Gelmann, E. P., Zellweger, T., Culig, Z., Visakorpi, T., Bubendorf, L., Kirken, R. A., Karras, J., & Nevalainen, M. T. (2008). Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer research*. 68(1), 236–248. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2972>
- 20) Ahonen, T. J., Xie, J., LeBaron, M. J., Zhu, J., Nurmi, M., Alanen, K., Rui, H., & Nevalainen, M. T. (2003). Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 278(29), 27287–27292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304307200>
- 21) Lee, T. K., Man, K., Poon, R. T., Lo, C. M., Yuen, A. P., Ng, I. O., Ng, K. T., Leonard, W., & Fan, S. T. (2006). Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research*, 66(20), 9948–9956. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1092>
- 22) Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218.
- 23) Dasu A, Toma-Dasu I, Karlsson M. (2003). Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Phys Med Biol.* 48: 2829–2842.
- 24) Wofford, J. A., Wieman, H. L., Jacobs, S. R., Zhao, Y., & Rathmell, J. C. (2008). IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*. 111(4), 2101–2111.
- 25) Hsu PP, Sabatini DM (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 134:703-707.
- 26) DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7: 11-20.
- 27) Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. (2011). Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 76:299-311.

- 28) Kroemer G, Pouyssegur J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*.13: 472–482.
- 29) Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 324:1029-1033.
- 30) Kim, S. H., & Baek, K. H. (2021). Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *International journal of molecular sciences*. 22(12), 6173. <https://doi.org/10.3390/ijms22126173>
- 31) Street, D., Kaufmann, A. M., Vaughan, A., Fisher, S. G., Hunter, M., Schreckenberger, C., Potkul, R. K., Gissmann, L., & Qiao, L. (1997). Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecologic oncology*. 65(2), 265–272.
- 32) Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol*. 19: 223-229.
- 33) Fatrai, S., Wierenga, A. T., Daenen, S. M., Vellenga, E., & Schuringa, J. J. (2011). Identification of HIF2alpha as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood*. 117(12), 3320–3330.
- 34) Chueh FY, Leong KF, Yu CL. (2010). Mitochondrial translocation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in leukemic T cells and cytokine-stimulated cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 26: 778-83.
- 35) Chueh, F., Chang, Y., Wu, S. and Yu, C. (2020). Signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) represses mitochondrial gene expression through direct binding to mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 527(4) .974-978.
- 36) Szczepanek, K., Lesnfsky, E.J. & Larner, A.C. (2012). Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends in Cell Biology*, 22(8). 0962-8924. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.001>
- 37) NDUFV1 NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1 [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 [cited 2024 04 03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4723>.

- 38) UQCRC1 ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 [Homo sapiens (human)] [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 [cited 2024 04 03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7384>.
- 39) ATP5F1B ATP synthase F1 subunit beta [Homo sapiens (human)] [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 [cited 2024 04 03]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/506>.
- 40) Valle-Mendiola, A., Rocha-Zavaleta, L., Maldonado-Lagunas, V., Morelos-Laguna, D., Gutiérrez-Hoya, A., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2024). STAT5 Is Necessary for the Metabolic Switch Induced by IL-2 in Cervical Cancer Cell Line SiHa. *International journal of molecular sciences*. 25(13), 6835. <https://doi.org/10.3390/ijms25136835>
- 41) Fatrai, S., Wierenga, A. T., Daenen, S. M., Vellenga, E., & Schuringa, J. J. (2011). Identification of HIF2alpha as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood*. 117(12), 3320–3330. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-303669>
- 42) Wang, Z., Fan, M., Candas, D., Zhang, T. Q., Qin, L., Eldridge, A., Wachsmann-Hogiu, S., Ahmed, K. M., Chromy, B. A., Nantajit, D., Duru, N., He, F., Chen, M., Finkel, T., Weinstein, L. S., & Li, J. J. (2014). Cyclin B1/Cdk1 coordinates mitochondrial respiration for cell-cycle G2/M progression. *Developmental cell*. 29(2), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.012>
- 43) Bedel, R., Thiery-Vuillemin, A., Grandclement, C., Balland, J., Remy-Martin, J. P., Kantelip, B., Pallandre, J. R., Pivot, X., Ferrand, C., Tiberghien, P., & Borg, C. (2011). Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer research*. 71(5), 1615–1626. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4540>
- 44) Szczepanek, K., Lesnefsky, E.J. & Larner, A.C. (2012). Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends in Cell Biology*. 22(8). 0962-8924. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.05.001>

- 45) Rostovtseva T, Colombini M. (1997). VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J. May.* 72(5):1954-62.
- 46) Amsalem Z, Arif T, Shteinifer-Kuzmine A, Chalifa-Caspi V, Shoshan-Barmatz V. (2020). The Mitochondrial Protein VDAC1 at the Crossroads of Cancer Cell Metabolism: The Epigenetic Link. *Cancers (Basel).* Apr 22;12(4):1031.
- 47) Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., & Shoshan-Barmatz, V. (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *The Biochemical journal.* 377(Pt 2), 347–355.
- 48) John, G. B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C. A., Selker, J. M., Rangell, L., Bennett, M. J., & Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Molecular biology of the cell.* 16(3), 1543–1554. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0697>.
- 49) Park, Y. U., Jeong, J., Lee, H., Mun, J. Y., Kim, J. H., Lee, J. S., Nguyen, M. D., Han, S. S., Suh, P. G., & Park, S. K. (2010). Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107(41), 17785–17790. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004361107>.
- 50) Jouroukhin, Y., Kageyama, Y., Misheneva, V., Shevelkin, A., Andrabi, S., Prandovszky, E., Yolken, R. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Aja, S., Sesaki, H., & Pletnikov, M. V. (2018). DISC1 regulates lactate metabolism in astrocytes: implications for psychiatric disorders. *Translational psychiatry.* 8(1), 76. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0123-9>
- 51) Zhang, L., Zhang, J., Liu, Y., Zhang, P., Nie, J., Zhao, R., Shi, Q., Sun, H., Jiao, D., Chen, Y., Zhao, X., Huang, Y., Li, Y., Zhao, J. Y., Xu, W., Zhao, S. M., & Wang, C. (2021). Mitochondrial STAT5A promotes metabolic remodeling and the Warburg effect by inactivating the pyruvate dehydrogenase complex. *Cell death & disease.* 12(7). 634. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03908-0>

- 52) Huang X, Zhao L, Peng R. (2022). Hypoxia-Inducible Factor 1 and Mitochondria: An Intimate Connection. *Biomolecules*. 27;13(1):50. <https://doi:10.3390/biom13010050>.
- 53) 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. <https://doi.org/10.3390/cancers12010124>

ANEXOS

RPMI 1640

Composición:

	Componentes	mg/L medio final
Sales inorgánicas	Cloruro de calcio x 2H ₂ O	62,27
	Cloruro de potasio	400
	Sulfato de magnesio	69,77
	Cloruro de sodio	5950,49
	Nitrato de sodio	72
Otros componentes	D (+)-Glucosa	2000
	L-Glutatión rojo	1
Aminoácidos	L-Arginina x HCL	241,86
	L-Asparagina x H ₂ O	50
	L-Ácido aspártico	20
	L-Cisteína	50
	L-Ácido glutámico	20
	Glicina	10
	L-Histidina	15
	L-Hidroxiprolina	20
	L-Isoleucina	50
	L-Leucina	50
	L-Lisina x HCL	40
	L-Metionina	15
	L-Fenilalanina	15
	L- Prolina	20
	L-Serina	30
	L-Threonina	20
	L-Triptófano	5
	L-Tirosina	20
	L-Valina	20
	Vitaminas	Ácido amino benzoico
D (+) Biotina		0.2
D (+) Ácido pantoténico		0.25
Cloruro de colina		3
Ácido Fólico		1
Inositol myo		35
Nicotinamida		1

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

Buffer de Lisis

Agregar:

- Tritón 0.5 mL
- PMSF 1 M 500 µL
- Ortovanadato 50 µL

- 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 µL
- Acrilamida-Bisacrilamida 30:08 3.3 mL
- Agua destilada 4.8 mL
- Persulfato de amonio 10% 50 µL
- TEMED 15 µL

Gel Concentrador

Agregar:

- TRIS pH 6.8 1M 1.25 mL
- SDS 10% 50 µL
- Acrilamida-Bisacrilamida 30:08 625 µL
- Agua destilada 2.8 mL
- Persulfato de amonio 10% 25 µL
- TEMED 15 µL

Buffer de transferencia

Agregar:

- SDS 15 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 μ L Aforar a 500 mL con TBS

Gel de Agarosa 1.5%

Agregar:

- Agarosa 1.5 g Aforar a 100 mL
- 10 μ L de cyber Green o azul