



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN
CELULAR Y CÁNCER**

**Determinación de apoptosis en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino (VIPA
Y ROVA) cultivadas en presencia de IL-2.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

Barragán Soriano José Luis

Directora de Tesis: Rosalva Rangel Corona

México, Distrito Federal

*A mi hermana:
Alma Rosa Barragán Seriano.
Porque siempre fuiste un ejemplo de superación y fuerza
porque desde el cielo me estas cuidando.*

Agradecimientos.

Agradezco a Dios todo poderoso por permitirme terminar esta etapa de mi vida y comenzar una más, sobre todo por dejarme continuar cada día lleno de sus bendiciones.

Agradezco a mis padres porque a pesar de nuestras carencias pudieron sacar adelante mis estudios llenándome de amor y su confianza cada día.
Gracias papa Fer y mama Cotí.

A mis amigos de la carrera, sobre todo a Leonardo, Carmelo, Ascensión Vian, Martha, Sandra, Blanca Space por acompañarme durante mi travesía en esta carrera.

Agradezco a Adrian por compartir su tiempo sus tristezas y sus alegrías durante varios semestres de mi carrera porque igual que yo decíamos tonterías.

A Almabella por ser una de mis mejores amigas por que cuando necesite de tí siempre estuviste para mí sin que yo te lo pidiera y sobre todo por preocuparte por mí. TQM.

A mi amiguísima Tanís por ser parte de mi vida y desde el momento que te conocí, te ganaste un lugar en mi corazón.

A Karla Medrano Ortiz. Por ser una mujer súper especial para mí, por que cuando necesite de tí siempre estuviste y a pesar de todo siempre estas y estarás en mi corazón por brindarme ese apoyo incondicional, sobre todo porque eres el amor de mi vida.

A la Dr. Rosalva Rangel Corona. Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y sobre todo por su apoyo durante mi estancia en el L-4

ÍNDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	3
A. APOPTOSIS	3
A.1 Iniciación	4
A.2 Ejecución	4
A.3 Eliminación	4
B. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA APOPTOSIS	5
B.1. Alteraciones nucleares	5
B.2. Alteraciones de la membrana	5
B.3. Alteraciones mitocondriales	6
C. VÍA INTRÍNSECA	6
C.1. Caspasas	7
C.2 Familia de proteínas Bcl-2	8
C.3 Citocromo c	9
D. VÍA EXTRÍNSECA	10
E. INTERACCIONES ENTRE LAS VÍAS APOPTÓTICAS	10
F. CÁNCER	11
G. CÁNCER CÉRVICO UTERINO	14
H. TRATAMIENTOS	15
I. BIOLOGÍA DE LA INTERLUCINA 2 (IL-2)	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS	40
BIBLIOGRAFÍA	41
APÉNDICE	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cambios morfológicos en la célula durante la apoptosis.	4
FIGURA 2. Vía Intrínseca.	7
FIGURA 3. Familia Bcl-2.	8
FIGURA 4. Vía Extrínseca.	10
FIGURA 5. Etapas del CaCu.	14
FIGURA 6. Estructura tridimensional de la citosina IL-2.	15
FIGURA 7. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular ROVA cultivada 24horas en presencia de IL-2.	26
FIGURA 8. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular ROVA cultivada 48horas en presencia de IL-2.	27
FIGURA 9. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular VIPA cultivada 24horas en presencia de IL-2.	28
FIGURA 10. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular VIPA cultivada 48horas en presencia de IL-2.	29
FIGURA 11. Expresión de β -actina en células de las líneas de CaCu VIPA y ROVA.	31
FIGURA 12. Expresión de citocromo c en la línea celular ROVA cultivada en presencia y de IL-2.	32
FIGURA 13. Expresión de citocromo c en la línea celular VIPA cultivada en presencia y ausencia de IL-2.	33
FIGURA 14. Comparación entre las líneas de CaCu ROVA Y VIPA cultivadas en presencia de IL-2.	34

ABREVIATURAS

APF-1.....PRIMER FACTOR DE PROTEASAS APOPTÓTICO

ATP.....ADENOSIN TRIFOSFATO

BH.....HOMOLOGÍA DE LOS DOMINIOS

CaCu.....CÁNCER CÉRVICO UTERINO

cDNA.....ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO COMPLEMENTARIO

DD.....DOMINIO DE MUERTE

DEds.....DOMINIOS EFECTORES DE MUERTE

DED.....DOMINIO EFECTOR DE MUERTE

DISC.....COMPLEJO DE SEÑALIZACIÓN DE MUERTE

DNA.....ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

FADD.....DOMINIO DE MUERTE ASOCIADO A FAS

IAPS.....PROTEÍNA INHIBIDORA DE LA APOPTOSIS

IL-2.....INTERLUCINA- 2

ITS.....INFECCIONES DE TRASMISIÓN SEXUAL

KD.....KILODALTON

MMP.....PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

µg.....MICROGRAMOS

µL.....MICROLITROS

mL.....MILILITROS

NIC.....NEOPLASIA CELULAR INTRAEPITELIAL

NK.....ASESINOS NATURALES

Pb.....PARES DE BASES

PCR.....REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

RNA_m.....ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO

RT.....RETROTRANSCRIPSIÓN

SMAC.....SEGUNDO ACTIVADOR MITOCONDRIAL DE CASPASAS

TNF.....FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

UI.....UNIDADES INTERNACIONALES

VPH.....VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

RESUMEN

El Cáncer es una enfermedad letal que ocupa los primeros lugares de mortalidad a nivel mundial, en particular el cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en la población femenina a nivel mundial, se estima que causa alrededor de 500,000 muertes al año. En países en vías de desarrollo, su incidencia es de 11 casos por cada 100,000 mujeres. En nuestro país, es una de las principales causas de muerte siendo responsable de 3959 decesos de mujeres en etapa reproductiva durante el 2010. Pese a los beneficios de las terapias actualmente utilizadas para esta patología, algunas resultan ser ineficientes en pacientes con estadios avanzados o en aquellos que presentan metástasis, cabe mencionar que el blanco de estos tratamientos no sólo son las células tumorales ya que también dañan células sanas. Estas limitaciones han generado la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que ofrezcan mejores resultados en el tratamiento de esta enfermedad. Actualmente, existe un fuerte interés en el uso de diversas citocinas, como la Interleucina-2 (IL-2), utilizadas como agentes antineoplásicos en el tratamiento para cierto tipo de cáncer. Al respecto, nuestro grupo de investigación estudia el efecto antitumoral de IL-2 sobre células de CaCu. Datos preliminares muestran que IL-2 induce apoptosis en las líneas celulares CALO e INBL, la cual se determinó por la fragmentación de DNA, positividad a Anexina-V y la determinación de citocromo c en células de ambas líneas celulares cultivadas en presencia de 100UI/ml de IL-2. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar si IL-2 induce muerte celular por apoptosis en otras líneas de CaCu como VIPA Y ROVA. Para ello, se realizaron cultivos de estas líneas celulares de CaCu en presencia de 100UI/ml de IL-2 a diversos tiempos. La muerte por apoptosis se evaluó por la detección de Anexina-V-FITC por citometría de flujo, así mismo, se determinó la presencia del mensajero para citocromo c por medio de la técnica de RT-PCR, ya que éstos son iniciadores fundamentales de la muerte por apoptosis.

Los resultados obtenidos para la detección de Anexina-V-FITC en las líneas celulares de CaCu cultivadas en presencia de IL-2, muestran para ROVA una intensidad de fluorescencia de, 60.4%, y 66.2% para 24 y 48 horas respectivamente, mientras que para la línea VIPA a los mismos tiempos fue de 59.1% y 54.2% respectivamente, cabe mencionar que la presencia de Anexina-V es factor determinante de muerte por apoptosis ya que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina, la cual es un fosfolípido que conforma la membrana interna de la célula y al llevarse a cabo el proceso de apoptosis este fosfolípido se trasloca al exterior de la membrana celular.

Por otro lado, los resultados de la expresión del mensajero para citocromo c, en las líneas celulares de CaCu ROVA y VIPA cultivadas en presencia de IL-2, muestran una mayor expresión del RNAm para citocromo c en comparación del mensajero obtenido de células cultivadas en ausencia de IL-2, donde se observa una baja expresión de mensajero. Indicando que citocromo c está siendo regulado a la alta por IL-2. Basándonos en la detección de fosfatidilserina y la regulación de la expresión del RNAm para citocromo c podemos concluir que IL-2 induce muerte por apoptosis en las líneas celulares de CaCu ROVA y VIPA. Tomando en cuenta los resultados arriba mencionados podríamos proponer a IL-2 como una alternativa terapéutica para el tratamiento del CaCu.

MARCO TEÓRICO

En todo organismo multicelular adulto debe de existir un equilibrio entre la generación ó proliferación y la desaparición ó muerte de las células (apoptosis) que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante. La alteración de este equilibrio conduce a alteraciones patológicas como el cáncer (Jordán, 2003).

A. APOPTOSIS

Apoptosis ó muerte celular programada, es un proceso fisiológico esencial que juega un papel crítico en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos (Ting et al, 2005). La célula muere en respuesta a una variedad de estímulos durante la apoptosis y lo hace de una manera controlada (Dash, 2000). El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera es la iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda ó de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis y por último, en la tercera etapa ó de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

A.1. Fase de iniciación.

La apoptosis puede ser iniciada por diversos estímulos, tanto fisiológicos como patológicos. Sin embargo, todos ellos coinciden en una de dos vías (Meléndez y Ceballos, 2008). Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo c de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan su proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos), o física (radiaciones), con un mismo estímulo genera efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

A.2. Fase de ejecución.

Cuando prevalecen las señales de suicidio, la cromatina se condensa en la región periférica del núcleo, se disuelve la membrana nuclear, se desestructura el citoesqueleto, la célula se encoge alejándose de las células vecinas y por último se rompe en burbujas ordenadas rodeadas por membranas (cuerpos apoptóticos) (Figura 1) (Merino y Noriega, 2005).

A.3. Fase de eliminación.

Los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por receptores específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas (Cáscales, 2003).



Figura 1. Cambios morfológicos en la célula durante la apoptosis. Los cambios morfológicos asociados a la apoptosis incluyen la condensación del citoplasma, vesiculación de la membrana y fragmentación de la membrana (Liu et al, 1996).

B. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA APOPTOSIS

Durante el proceso de apoptosis la célula sufre una serie de cambios que incluyen, alteraciones nucleares y pliegues en la membrana plasmática, cambios mitocondriales y contracción celular (Ramírez et al 1999).

B.1. Alteraciones nucleares:

El núcleo de la célula apoptótica sufre cambios tanto en la cromatina como en la membrana nuclear. La cromatina nuclear se condensa formando unos grupos densos que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear (Figura 1). La membrana nuclear permanece intacta, aunque se produce una redistribución de los poros nucleares. Estos cambios se asocian a daños en proteínas nucleares que son degradadas. Se ha demostrado afectación en la topoisomerasa, las láminas ó las proteínas nucleares reguladoras de la mitosis (Ramírez et al, 1999).

B.2. Alteraciones de la membrana:

Si bien la apoptosis se asocia con la falta de alteraciones, en la membrana, lo cierto es que la membrana celular se de forma y sufre numerosos abombamientos, la cisteínas del retículo endoplásmico se ensanchan y fusionan, los fosfolípidos de la membrana celular cambian de orientación y se exponen al exterior en los estadios finales se observan trozos de membrana celular que se rompen formando los denominados cuerpos apoptóticos (Ramírez et al, 1999).

Uno de los fosfolípidos que componen la membrana celular es la fosfatidilserina (PS), la cual se encuentra presente en la cara interna de la membrana plasmática, pasa al exterior de la superficie celular durante la apoptosis Recientemente se ha propuesto que además de la PS se libera otro fosfolípido, posiblemente fosfatidilcolina (PC), que actúa como quimio-atrayente ayudando al reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por las células fagocíticas (Kruidering y Evan 2000; Leyton y Quest, 2004).

B.3. Alteraciones mitocondriales.

Uno de los cambios más tempranos en la célula apoptótica es una pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, estas alteraciones proceden de los cambios de la superficie celular o la degradación del ADN (Ramírez et al, 1999).

La apoptosis se rige a través de dos vías principales la vía mitocondrial (intrínseca) y la vía del receptor de muerte celular (extrínseca) (Neumann et al, 2009).

C. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL

Esta vía es activada por múltiples estímulos internos como, estrés celular, especies reactivas de oxígeno, daño en el DNA, privación de los factores de crecimiento (Czerski y Núñez 2004). Estos estímulos provocan que las proteínas de la familia Bcl-2 hagan un poro en la membrana de la mitocondria (Figura 2). La permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) está estrechamente regulada por miembros de la familia Bcl-2, incluyendo a Bcl-2 y Bax que inhiben o promueven respectivamente la MMP (Rea B et al 2008).

Como respuesta al daño interno en la célula, principalmente por daño al DNA, el gen p53 actúa induciendo apoptosis por activación de Bax y por unión directa con Bak, la vía mitocondrial es iniciada por la traslocación de Bax en la membrana mitocondrial (Ying et al, 2011). Al trasladarse Bax en la membrana mitocondrial se permeabiliza la mitocondria formando un poro en esta. Lo anterior provoca la liberación del citocromo c al citosol, lo cual se acompaña de la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la desestabilización de la membrana externa de la mitocondria (karp, 1996).

En el citosol, el citocromo c se une al primer factor apoptótico (Apaf-1) y una vez unido se forma el complejo conocido como apoptosoma, que recluta y activa a la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar a la caspasas 3, 6 y 7 (karp, 1996).

C.1. Caspasas

Las caspasas son endoproteasas que tienen especificidad estricta gracias a un residuo aspártico. Algunas caspasas son importantes mediadores de la respuesta inflamatoria y otras están involucradas en la apoptosis. (Chauvier et al, 2011).

La Caspasa 3 juega un papel directo en el corte proteolítico de las proteínas celulares responsables para la progresión de la apoptosis. Las caspasas son requeridas para llevar a cabo la inducción de la apoptosis (Pourkarimi et al, 2011). La caspasa 3 juega un papel esencial en los cambios nucleares de las células apoptóticas.

Con el fin de prevenir la activación no regulada de las caspasas, las células eucariotas poseen una familia de inhibidores conocidos como inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAPs) que bloquean la actividad de estas enzimas. Existen diversos miembros de esta familia entre los que destacan la XIAP, que posee un alta afinidad por diversas caspasas y la survivina, proteína muy pequeña e interesante, dado que también tiene un papel en el ciclo celular (Meléndez y Ceballos, 2008).

Para que la vía intrínseca de la apoptosis se lleve a cabo, es necesario que las proteínas (IAPs) se inhiban y es aquí en donde entra las proteínas Diablo o SMAC. Al ser liberado de la mitocondria, Diablo se une a las IAPs, permitiendo la activación de las caspasas y, por ende, la apoptosis (Belanger et al, 2005).

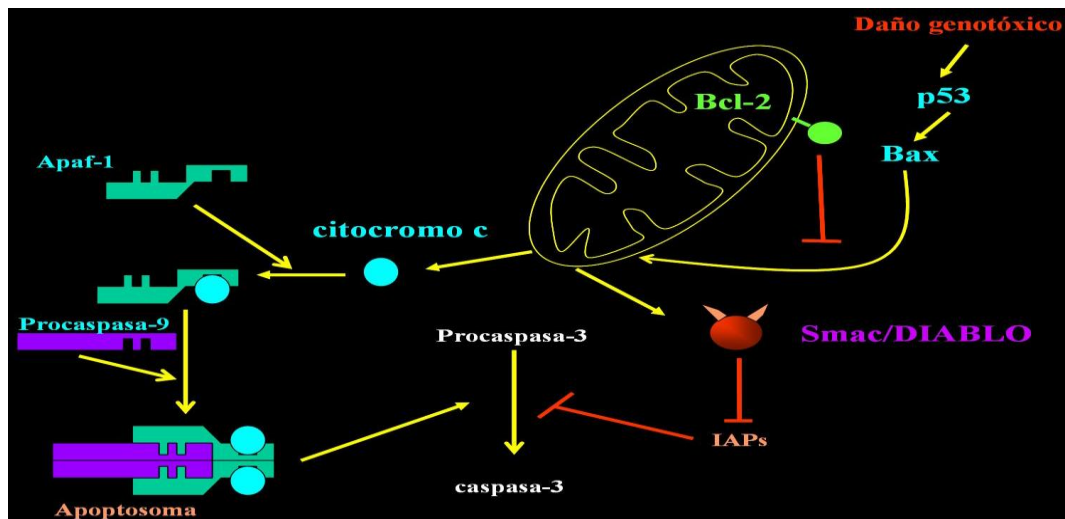


Figura 2. Vía Intrínseca. La vía intrínseca es gatillada por fenómenos de estrés celular como los generados por agentes genotóxicos y depende de la actividad mitocondrial (Cuello et al, 2006).

C.2. Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 han sido consideradas como uno de los principales reguladores en la ruta intrínseca del proceso apoptótico (Vander, 1999). En 1993 un conjunto de proteínas Bcl-2 con funciones pro-apoptótico fue identificado (Ghibelli y Diederich, 2010). Esta familia de proteínas Bcl-2 regula la apoptosis (Tejido O., et al. 2010). La familia de genes Bcl-2 está compuesta por tres subfamilias que contiene entre uno y cuatro homólogos de dominios BH (BH1, BH2, BH3, BH4) de BCL-2. La subfamilia de genes anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL2A1, BCL-B) codifican proteínas que comprenden los cuatro dominios BH (Figura 3). La mayoría de esta subfamilia también contienen dominios transmembranales (TM), por lo que generalmente están asociadas a membranas. La subfamilia pro-apoptótica (BAX, BAK, BOK) carece de dominios BH4, promueve la apoptosis mediante la formación de poros en las membranas mitocondriales. La otra subfamilia pro-apoptótica es un grupo estructuralmente diverso que sólo presenta un dominio BH (BH3-only) en homología (BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA Y HRK) (Figura 3). La subfamilia que tiene un único dominio BH3, promueven la apoptosis cuando está sobre expresada, comparte homología en su secuencia, pero se regulan de forma distinta. PUMA, NOXA y BID en menor medida son

reguladas transcripcionalmente por el gen conocido como guardian del genoma (p53), debido al incremento de daño al ADN. Bid también, se puede activar por proteólisis de caspasa-8 (Rebecca et al, 2009). Bcl-2. Esta también ampliamente distribuida en los organelos celulares (Díaz et al, 2008).

La familia de proteínas Bcl-2 juega un importante papel en la regulación de la apoptosis induciéndola con una variedad de estímulos como la liberación de citocromo c (Belanger et al, 2005).

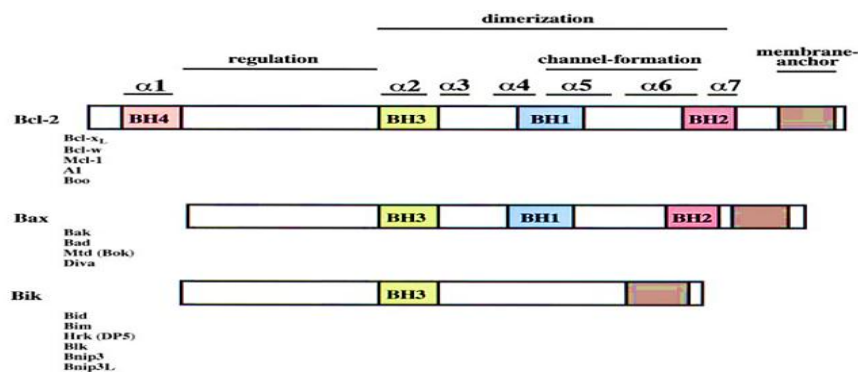


Figura 3. Familia Bcl-2. Formada por proteínas pro y anti apoptóticas clasificadas en tres grupos de acuerdo a sus dominios BH.

C.3. Citocromo c

Los citocromos constituyen una familia de proteínas coloreadas de allí su nombre, del griego (*chroma*, "color") los citocromos son generalmente ocupados como transportadores de electrones como en los complejos del citocromo *b*, *c*. El citocromo *c* es un integrante de la cadena de transporte de electrones. Esta pequeña proteína contiene un poco más de 100 aminoácidos y se fija laxamente a la cara externa de la membrana interna de la mitocondria (Alberts et al, 2004).

El citocromo *c* se sintetiza en el citoplasma celular a partir de transcritos nucleares y más tarde se transporta al espacio intermembranario mitocondrial donde reside de forma fisiológica (Comella et al, 1999). La membrana interna de la mitocondria presenta múltiples complejos enzimáticos (cadena transportadora de electrones, la ATP sintetasa). Además, posee unas invaginaciones denominadas crestas mitocondriales, donde se encuentra secuestrado y unido al fosfolípido de la membrana, el 85% del citocromo-*c* (De Toro, 2006).

Por otro lado, el citocromo c es un participante de la vía intrínseca de la apoptosis, la formación de MMP está estrechamente regulado por miembros de la familia Bcl-2, incluyendo a Bcl-2 y Bax que inhiben o promueven MMP respectivamente (Rea et al, 2008). La liberación de citocromo c de la mitocondria proporciona la señal para el inicio del ensamble del apoptosoma (Cain et al, 2002).

El citocromo c está presente en el espacio de la intermembrana de la mitocondria se libera al citosol donde se une a Apaf-1, se ensambla para formar un complejo multi – molecular (apoptosoma) que recluta y activa al iniciador caspasa -9 (Anichini et al, 2006).

D. VÍA EXTRÍNSECA

La vía extrínseca es la vía en la que una señal externa interacciona con una serie de receptores de muerte de la membrana celular como CD95/Fas, el receptor de necrosis tumoral (TNF) o (TRAIL) (Marce, 2004).

La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos FasL y TNF a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNF-R1, TRAIL-R1, etc.). La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte (DD) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína (FADD por sus siglas en ingles Fas Associated Death Domain). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte (DEDs) capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así se forma un complejo de señalización y muerte (DISC; Death-Inducing Signaling Complex) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 y 10. La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte (Figura 4). La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que a su vez activa a las caspasas ejecutoras como lo es caspasa 3 (Lizarbe, 2007).

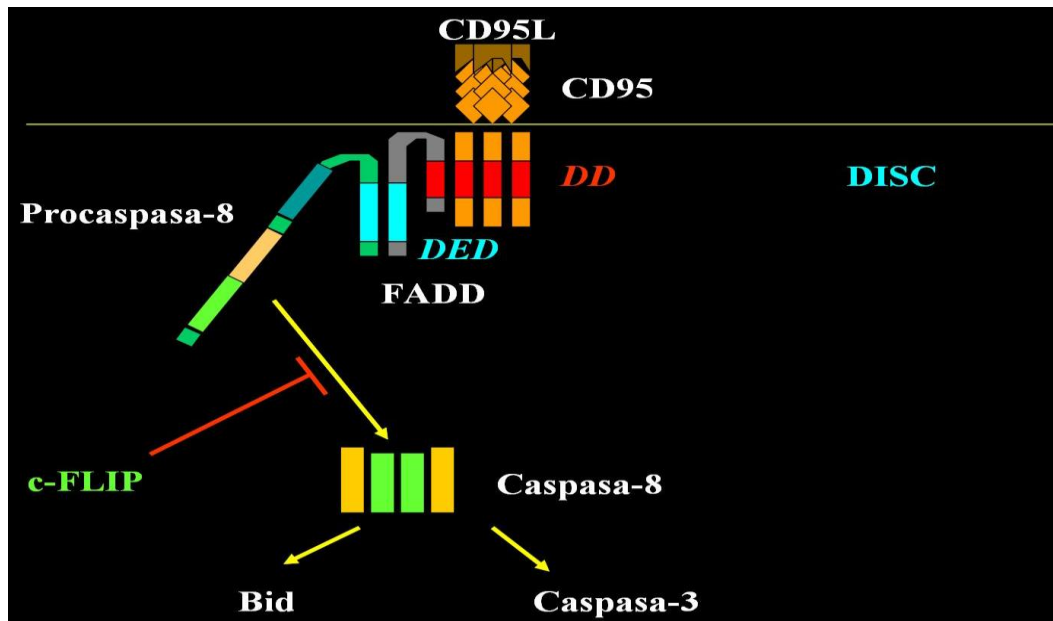


Figura 4. Vía Extrínseca. Las células de los mamíferos expresan receptores en su membrana plasmática. La unión de ligandos a estos receptores desencadena la activación de las caspasas y una cascada de reacciones que finalizan con la muerte celular (Sánchez R., et al.2008).

E. INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS APOPTÓTICAS

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. El acoplamiento y la integración de las dos vías se deben a Bid un miembro de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de BID incrementando enormemente su actividad proapoptótica que resulta en su traslocación a la mitocondria donde promueve la liberación de citocromo c (Arango y LLanes, 1997).

Las evidencias indican que la apoptosis insuficiente se puede manifestar como cáncer o auto-inmunidad, mientras que la muerte acelerada se aprecia en enfermedades degenerativas agudas (Rojas et al 2009).

F. CÁNCER

El cáncer se puede definir como el crecimiento tisular producido por la liberación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Casi todos los cánceres forman tumores en alguna parte del cuerpo (piel, boca, senos, estomago, colon y útero). Pero no todos los tumores son malignos; la mayor parte son benignos. Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento localizado (no crece en forma agresiva) y suelen estar separados de los tejidos vecinos por una capsula. Los tumores benignos tienen un crecimiento lento y una estructura semejante al tejido del que proceden. El principal atributo de los tumores malignos es una capacidad de

diseminación fuera del lugar de origen (metástasis). La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión ó infiltración, produciendo crecimientos secundarios, en lugares distantes, conocidos como metástasis (Calvo et al, 2003).

Los canceres se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de las células epiteliales se denominan Carcinomas como el carcinoma de cérvix, los que derivan del tejido conjuntivo o de fibras musculares sarcomas y leucemia, derivadas de células hematopoyéticas, así como los derivados del sistema nervioso (Alberts et al, 2004). El desencadenamiento del proceso canceroso depende de numerosos factores, que pueden ser ordenados en dos grupos principales (Hernández y Rios, 1999).

- Factores internos: Se conocen como una predisposición genética, lo que quiere decir que en ciertas familias se puede predisponer a un daño genético que hace que algún miembro presente una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Esto ocurre en un solo porcentaje que va del 5% al 10% del total de los casos (Palacio B. 2004).
- Factores externos: Son factores que condiciona el medio, los cuales pueden ser contaminación de aire, agua y comida; factores de dieta; obesidad; inactividad física; tabaquismo; alcohol; radiación solar; factores hormonales; exposiciones tempranas en la vida; virus: drogas y ocupación(Palacio, 2004).

G. CÁNCER CÉRVICO UTERINO

El cáncer cérvico uterino (CaCu) surge por el crecimiento incontrolable de células anormales en el cuello uterino, es decir en la entrada del útero (Ashford y Collymore 2004).

El útero es un órgano de gran importancia en la mujer, por ofrecer al ovulo fecundado el sitio ideal para su anidación, desarrollo embrionario y fetal, cuando llega el momento del parto, ejerce un papel inminente dinámico para desalojar el producto y es cuando el útero puede sufrir traumatismo de mayor o menor intensidad, generalmente se asientan lesiones que posteriormente evolucionan a un carcinoma. También, es un órgano que está sujeto a la acción cíclica hormonal de la mujer, sobre todo en lo que se refiere a sus epitelios, en donde se reflejan diversas condiciones del medio interno y factores exógenos, que van desde las infecciones bacterianas, de virus y parasitarias del medio vaginal, hasta irritaciones producidas por cuerpos extraños que ejercen sus influencias en sus epitelios y con predilección en la zona transicional. Es quizás por todos estos factores

que es el cuello uterino el sitio de mayor incidencia de cáncer en la mujer (Cardona, 1968). Siendo la segunda neoplasia (alteración de la proliferación y diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor), más común en países en vías de desarrollo, donde se diagnosticaron el 80% de los casos (Consensos Statement.1997).

El cáncer cérvico uterino se origina en epitelio estratificado, normalmente muy cerca de su unión con el epitelio columnar del canal cervical. La causa de su confinamiento a esta región particular del epitelio es algo desconocido todavía pero al menos este hecho hace fácil estudiar los cambios que preceden a la aparición del cáncer (Cairns, 1981).

El CaCu es una enfermedad de lenta progresión que se desarrolla en ocasiones como consecuencia de una infección persistente por alguno de los tipos del virus del papiloma humano (VPH) (Gutiérrez et al, 2008). Los factores que más se asocian al cáncer cérvico uterino, es en el inicio temprano de relaciones sexuales, número de parejas sexuales, infecciones virales y bacterianas, multiparidad, uso de anticonceptivos orales, dietéticos, tabaquismo, antecedentes de infecciones por el virus del papiloma humano (existen aproximadamente 100 tipos de este virus que se encuentran clasificados por números según las lesiones que ocasionan y el sitio de infección) constituye los más importantes factores de riesgo para esta enfermedad. No se puede dejar mencionar los antecedentes previos de una lesión epitelial (Brostoff et al, 1993; Nazzal et al, 2006; Carrillo et al, 2004).

Casi todos los casos de cáncer de cuello uterino se deben a tipos específicos de virus transmitidos por la vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH) (López y Lizano, 2006). La infección del (VPH), es la enfermedad de trasmisión sexual más común en el mundo (Hernán, 2003).

En años recientes se ha notificado la existencia de más de 100 tipos de VPH, siendo las variantes 16, 18, 31,33,35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 las consideradas como de alto riesgo por encontrarse asociadas al CaCu en más del 95% de los casos. El comportamiento de los mecanismos efectores varía según el estadio y el tipo de HPV que infecta (León y Faxas, 2004). Por otra parte se ha informado que los tipos de VPH, como el 6, 11, 42, 43 y 44 muestran una débil asociación a este cáncer, denominándolos de bajo riesgo (Tirado et al, 2005).

En México se ha encontrado que alrededor de 99.7% del CaCu puede atribuirse a ciertos tipos de VPH, el 16 representa la mayor porción (50%), seguido por el VPH 18(12%). Los tipos 16 y 18 son los responsables de la mayoría de los cánceres de cérvix. No obstante, el VPH no constituye una causa suficiente de esta enfermedad; son necesarios ciertos factores como porcentaje de infecciones persistentes por VPH para que se logre en algún momento progresar y dar al cáncer (Alonso et al ,2000; Nazzal et al, 2006).

El CaCu es una enfermedad progresiva, por lo cual los investigadores la dividen en estadios del I al IV (Combita et al, 2003).

Estadio 0 ó carcinoma *in situ*. El carcinoma *in situ* es un cáncer muy temprano. Las células anormales se encuentran solo en la primera capa de células que recubren el cuello uterino y no invaden los tejidos más profundos del cuello uterino.

Estadio I. El cáncer afecta el cuello uterino, pero no se ha diseminado a los alrededores.

I-a: Una cantidad muy pequeña de células cancerígenas, solo visible por microscopio, se encuentra ya en el tejido más profundo del cuello uterino.

I-b: Una cantidad mayor de células cancerígenas se encuentra en dicho tejido.

Estadio II. El cáncer se ha diseminado más allá del cuello uterino, pero hasta la pared pélvica o hasta el tercio inferior de la vagina.

II-A: El cáncer sea diseminado fuera del cuello uterino a los tercios superiores de la vagina.

II-b: El cáncer se ha diseminado al tejido alrededor del cuello uterino.

Estadio III. El cáncer se ha diseminado a toda el área pélvica. Puede haberse diseminado a la parte inferior de la vagina, o infiltrar los uréteres (los tubos que conectan los riñones a la vejiga).

Estadio IV. El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

IV-a: Diseminación a la vejiga o al recto (órganos cerca del cuello uterino)

IV-b: Diseminación a órganos distales como pulmones (Figura 5).

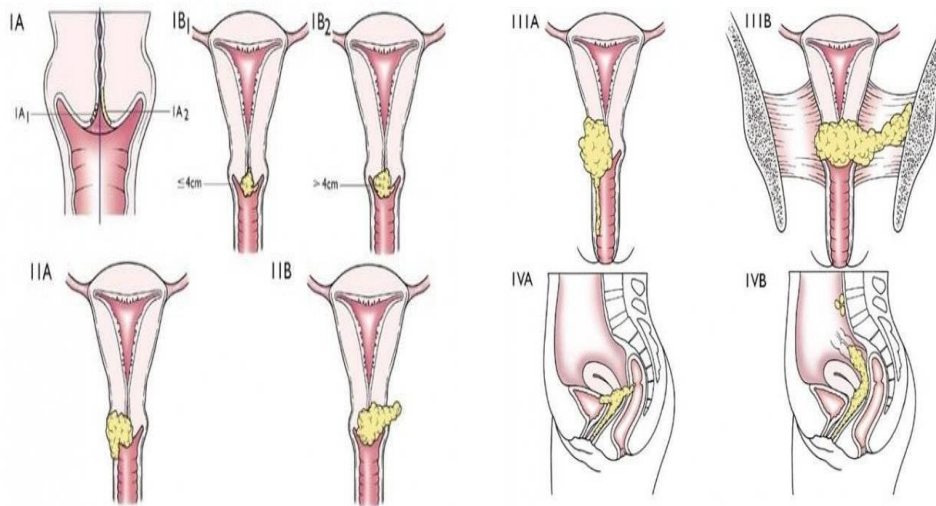


Figura 5. Etapas del CaCu.

H. TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER CÉRVICO UTERINO

A pesar de su alta incidencia y de las múltiples investigaciones reportadas se ha escrito sobre el tratamiento del CaCu, tanto en publicaciones nacionales como extranjeras, la discusión de su tratamiento sigue siendo un tema de actualidad. Los principios fundamentales de la radioterapéutico y la quirúrgica, aunque en apariencia conocidos, son con frecuencia mal aplicados, teniéndose como resultado un alto porcentaje de recurrencias desgraciadamente muy comunes (García, 2008).

Cirugía.- Se utiliza por lo general cuando el tumor es pequeño y está bien delimitado, se extirpa el tejido dañado con un poco del que lo rodea, para asegurar la eliminación total de las células malignas (Mora y Crespín, 1992).

Criocirugía: su principal objetivo es la destrucción celular en un área determinada mediante técnicas de congelación local. Los factores que contribuyen a la criodestrucción de los tejidos son físicos (congelación) vasculares (criotrombosis) e inmunológicos. (Sandoval y Santillán, 2005).

Radioterapia.- La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de un tipo de energía (llamada radiación ionizante) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores (Hellman, 1996; Lavelly, 1995; Blagostklonny, 2003). El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano de alrededor (Cameron, 1995).

Quimioterapia.- Consiste en la administración de fármacos citotóxicos capaces de destruir o inhibir el crecimiento y la reproducción de las células malignas (Avendaño y Meléndez,

2008). La apoptosis juega un rol crítico en la homeostasis celular e impide el desarrollo de células tumorales.

El uso de Interleucina-2 (IL-2) en terapia génica contra cáncer se ha empleado ampliamente en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas, plasmocitoma, carcinoma de mama, linfomas y en cáncer cervical. Particularmente, el efecto adyuvante de IL-2 en cáncer cervical se ha probado en modelos tumorales asociados al VPH. Se ha demostrado que el tratamiento con la proteína recombinante y con el gen de IL-2, administrados por vía intratumoral, reduce significativamente el avance de los tumores asociados al VPH e inhibe la formación de tumores recurrentes después de ser eliminados por cirugía (Bermúdez et al, 2005).

I. BIOLOGÍA DE INTERLEUCINA 2 (IL-2)

Las interleucinas son un extenso grupo de citocinas que van desde IL-1 hasta IL-17 y son producidas principalmente por los linfocitos T cooperadores, aunque los monocitos mononucleares y algunas células tisulares, también producen algunas de ellas (Figura 6). La (IL-2) es el principal factor de crecimiento de linfocitos T y células NK, es responsable de la regulación y maduración de la respuesta inmune (Lindholm, 2002).

Posee la acción de activar a los linfocitos B, macrófagos y células NK. Además ejerce una función sobre los propios linfocitos T, en cuanto a su proliferación, secreción de otras linfocinas, aumento de la expresión de receptores de membrana para otros factores e inducción de la expresión de moléculas de clase II del HLA (Roitt et al, 2000).

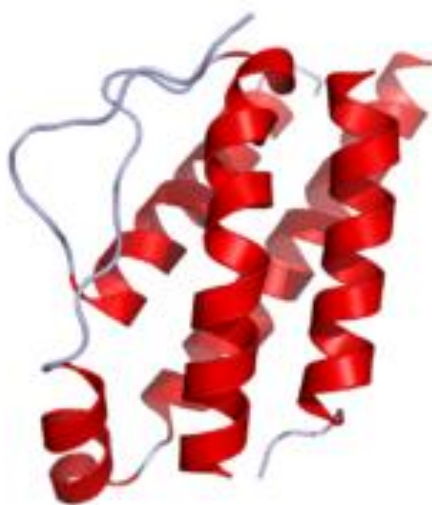


Figura 6. Estructura tridimensional de la citocina IL-2

Su efecto antitumoral es mediado por promover la activación de las células NK, células asesinas activadas por linfocinas (LAK) y otras células citotóxicas, así como la inducción de IFN- α , TNF- γ .

IL-2 es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por antígenos y es responsable de la expansión clonal de los linfocitos T, tras el reconocimiento del antígeno. Por esta razón, a IL-2 se le denominó originalmente factor de crecimiento de los linfocitos T. IL-2 actúa principalmente sobre las células que la sintetizan (es decir, actúa como un factor de crecimiento autócrino) (Roitt et al, 2000).

IL-2 se produce en linfocitos CD4⁺ y en menor grado en linfocitos CD8⁺. La activación de los linfocitos T por los antígenos y co-estimuladores estimula la transcripción.

Se sabe que las células tumorales no linfoides humanas son capaces de producir citocinas, existe la posibilidad de una estimulación autócrina del crecimiento celular del tumor, lo cual conduce a mantener en el microambiente tumoral las condiciones adecuadas para continuar con esta proliferación. El efecto de IL-2 en células transformadas ó células no linfoides incluye cambios en la sensibilidad de las células tumorales a otras citocinas (Valle, 2001).

También, ha sido utilizada independientemente ó en combinación en la inmunoterapia adoptiva tanto en animales como en humanos para inducir regresión de tumores en estadios avanzados; mostrando una modesta respuesta antitumoral, no obstante su aplicación vía sistémica altera vías de regulación hematopoyéticas importantes y puede provocar serios efectos secundarios algunos de ellos son: fiebre, dolor de cabeza, síndrome de goteo capilar (Ayala, 2005).

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (Munro, 2006). Se le atribuyen 7.2 millones de defunciones ocurridas en el 2008 (OMS). En México el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasia en mujeres mayores de 25 años. El cuello del útero es la parte del organismo más susceptible al cáncer en mujeres (Robles C et al, 1996). El sistema nacional de salud mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de CaCu y se registran anualmente 4,031 muertes (INEGI, 2009).

Sin embargo, este tipo de cáncer es absolutamente prevenible y su tratamiento es relativamente fácil, cuando el diagnóstico es oportuno. Vacunas contra el VPH y las pruebas de ADN contra VPH son las últimas tecnologías innovadoras que ofrecen una solución potencial al impacto negativo del CaCu en México. Sabemos que es de etiología infecciosa, pero desde la perspectiva de salud pública, estamos conscientes de que los programas de control no han funcionado como se esperaba (Hidalgo, 2006).

Por esta razón, para pacientes en las que el cáncer es detectado en estadios avanzados se están desarrollando tratamientos alternativos como, lo es, el uso de citocinas. En el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación Celular y Cáncer de la FES-Zaragoza, se han obtenido resultados favorables *in vitro* con el uso de citocinas para inhibir la proliferación de líneas celulares de cáncer cérvico uterino, se encontró que a bajas concentraciones de IL-2 se estimula la proliferación celular y en altas concentraciones de la citocina se induce la muerte celular. Por lo antes mencionado, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la apoptosis en las líneas de CaCu VIPA y ROVA de igual forma se determinará la expresión del RNAm para citocromo c y se evaluará la regulación de este gen apoptótico en presencia de IL-2 en estas líneas celulares de CaCu, tratadas con IL-2. Es importante identificar la vía de inducción de muertes mediada por esta citocina en otras líneas celulares HPV positivas, así como identificar si entre los genes que se están regulando se encuentra el citocromo c, pieza clave del proceso apoptótico por la vía intrínseca. Esto con el propósito de generalizar los resultados del efecto inductor de muerte por apoptosis (por vía intrínseca) en células de CaCu HPV positivas.

HIPÓTESIS

Se sabe que la interleucina 2 (IL-2) en altas concentraciones (100 UI/ml) induce la muerte por apoptosis en células de CaCu CALO e INBL. También, se conoce que la vía intrínseca de la muerte celular programada activa la liberación de citocromo c en citosol, entonces si cultivamos células de CaCu VIPA y ROVA en presencia de 100UI/ml de IL-2 podremos determinar la muerte celular programada en estas líneas celulares y por medio de la técnica de RT-PCR determinar la presencia del RNAm para citocromo c.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la muerte vía apoptosis y la expresión del RNAm para citocromo c en líneas celulares de cáncer cérvico uterino, VIPA y ROVA, cultivadas en presencia de 100UI/ml de IL-2 a diferentes tiempos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecimiento y cultivo de las líneas celulares VIPA y ROVA.
2. Determinar la apoptosis por medio de la detección del anticuerpo monoclonal Anexina-V en células cultivadas 1 y 2 días en presencia de IL-2 100 UI/ml
3. Extraer y purificar el RNAm de las líneas VIPA y ROVA cultivadas con 100UI/ml IL-2, a diferentes tiempos.
4. Retrotranscribir (RT) las muestras de RNAm obtenidas para posteriormente amplificar (ADNc) a través de la técnica de PCR, por medio del diseño de oligonucleótidos específicos para citocromo c.
5. Comparar los resultados obtenidos de la expresión del mensajero para citocromo c de las líneas celulares de CaCu en presencia y ausencia de IL-2.

MATERIALES Y MÉTODO

- **MATERIAL BIOLÓGICO**

Líneas celulares de CaCu

Nombre	Estadio Clínico	Características
VIPA	Carcinoma estadio II B VPH (18)	Carcinoma Epidérmico
ROVA	Carcinoma estadio III B VPH (18)	Carcinoma Epidérmico

Tabla 1. Estadios clínicos y tipo de VPH de las líneas celulares VIPA y ROVA

ANEXINA-V

La Anexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido: fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es traslocado a la cara externa, de dicha membrana, cuando comienza el proceso de apoptosis. Por esta razón, la determinación de Anexina-V es utilizada como una prueba para evaluar apoptosis.

Para la realización esta técnica fue necesario el uso de diversos controles

- **REACTIVOS**

PBS

Etanol 70%

Ioduro de Propidio

Anticuerpo monoclonal Anexina-V FITC.

- 1 Células con Hepes (células sin nada). Región del diagrama "Q2"
- 2 Células positivas a IP (células positivas a necrosis) Región del diagrama "Q1"
- 3 Células con camptotecina (positivas a apoptosis)
- 4 Células con doble marca (positivas a necrosis y a FITC) Región del diagrama "Q3"
- 5 Células con tratamiento (IL-2) Región del diagrama "Q4"

1.- Células con Hepes. Se Cultivaron 5×10^5 células en medio de cultivo (RPMI 10% SFB), y fueron sincronizadas posteriormente se decanto el medio de cultivo y se realizo un lavado con PBS, obteniendo las células para colocarlas en 1ml solución Buffer Hepes.

2.- Células positivas a IP. Se Cultivaron 5×10^5 células en medio de cultivo (RPMI 10% SFB) y fueron sincronizadas, posteriormente se centrifugaron y al botón celular obtenido se le añadieron 400µl de Etanol al 70% y se dejaron reposar durante 15 minutos, al paso de este tiempo se lavaron con PBS, y se les agrego 1ml de Hepes, seguido de 5 µl de IP.

3.- Células con camptotecina. Se cultivaron 5×10^5 células en RPMI 10% SFB y fueron sincronizadas, después se lavaron con PBS y se les agrego medio de cultivo y camptotecina, dejándolas en presencia de esta durante 24 horas.

4.- Células con doble marca. Se cultivaron 5×10^5 células en RPMI 10% SFB y se sincronizaron, posteriormente se les agrego medio de cultivo con 8µl camptotecina y se dejaron reposar durante 24 horas. Transcurrido el tiempo fueron lavadas con PBS y al botón celular recuperado se le agregaron 400µl de Etanol al 70 %, el cual después fue retirado realizando un lavado con PBS, para después agregarle 200µl de Anexina-V FIT-C y 5 µl de IP.

5.-Células con tratamiento. Se cultivaron y sincronizaron 5×10^5 células en medio de cultivo (RPMI 10% SFB) junto con 100 UI/ml de IL-2, las cuales se dejaron reposar durante uno y dos días respectivamente, posteriormente fueron lavadas con PBS y se les agrego 200µl de Anexina-V FIT-C.

6.-Se determino la fluorescencia de Anexina-V FIT-C en el citómetro de flujo.

RT-PCR

Oligonucleótidos Invitrogen

Secuencia de los oligonucleótidos o primers utilizados para la amplificación del Citocromo.

Citocromo c

Sentido: ttggcaatccgcatcagta

Antisentido: Cccgacagtgccctagaagag

- **Reactivos RT**

Amortiguador 5X (Invitrogen)
DTT 0.1 M (Invitrogen)
Enzima MMLV-RT (Invitrogen)
DNTP'S 5 mM Mix (Fermentas)
Oligo (DT) 15 primer 500µg/ml (Promega)

- **Reactivos PCR**

Amortiguador 5X Green Go Taq (Promega)
DNTP'S 10nM Mix (Fermentas)
Enzima Go Taq DNA Polimerasa 5U/µl (Promega)

Electroforesis

Agarosa (Invitrogen)
Marcador de peso molecular Gene Ruler de 34 a501 Pb (Fermentas)
Marcador de peso molecular de 100-1500Pb (Promega)
Buffer de Carga Blue / Orange 6X (Promega)

- Cultivo e inducción de las líneas celulares

Las líneas celulares VIPA y ROVA se cultivaron en cajas para cultivo celular con 5ml de medio de cultivo (RPMI con 10% de Suero Fetal Bovino), en condiciones de 5% de CO₂ y 37°C de temperatura, y se obtuvo 1 millón de células, que eran las necesarias para la inducción con IL-2 (100 UI/ml) en cada uno de los tiempos predeterminados.

- Extracción de RNA método del Trizol

Después de que se cumplieron los tiempos establecidos de la inducción, las células se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos, obteniendo un botón celular al cual se le agregó 1ml de Trizol® (lisis celular) se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, pasado el tiempo se pasó a un tubo el cual se le agregó 200 µl de Cloroformo (Separación de proteínas) se agitó vigorosamente durante 5 minutos, después se pasó a la centrífuga, aquí se forman dos fases una acuosa y otra orgánica, de la cual se tomó

la fase acuosa en donde se encuentra el RNA, se le agregaron 500ml de Isopropanol (Condensación del RNA) después se dejó reposar 24 horas a menos 70 grados transcurrido el tiempo se centrifugo a 7500 rpm durante 10 minutos, se decanto con pipeta el sobrenadante y se le agrego 500µL de Etanol (Purifica), se centrifugo de igual forma que la anterior y se decanto el sobrenadante, hecho esto se puso a secar durante dos horas y se le colocaron 20ml de agua (DPC) entonces ya tenemos RNAm (stock). Se procedió a su cuantificación en un espectrofotómetro (Eppendorf, USA) a una absorbancia de 260nm, 280nm y la relación entre las absorbancias y así realizar los cálculos correspondientes para lograr una concentración en µg/µl, para ello se ocupara la siguiente formula.

$$\text{RNA} = (\text{ABS } 260\text{nm}) (402\mu\text{g}) (\text{volumen de la dilución})/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

- RT (Retrotranscripción).

De acuerdo a la concentración de RNAm obtenido se determino el volumen de la solución necesaria para tomar 2µg/µl de RNAm requerido en la técnica. Se procedió a la retrotranscripción de cada una de las muestras bajo condiciones determinadas se incubo en el termociclador durante 1 hora a 42°C. y a si se obtuvo el DNA complementario (cDNA).

Reactivo	µl/ RX
Amortiguador 5x	6
dtc 0.1M	2
dNTP' S 5Mm (Mix)	4
Enzima MMLV-RT	1
Oligo DT	2
Muestra de RNAm	2
	13

Tabla 2. Reactivos para RT

- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Los productos que obtuvimos de la retrotranscripción, fueron utilizados para la amplificación del cDNA de citocromo c en presencia de los oligonucleótidos correspondientes. La amplificación se llevo a cabo bajo condiciones determinadas en el termociclador.

Reactivo	μl/ RX
Amortiguador Green	6
dNTP' S 10 Mm (mix)	0.8
Primers	
Sentido	1
Anti sentido	1
Gotag polimerasa	0.15
Muestras de DNAc	4
Agua libre de RNAsas	7.05

Tabla 3. Reactivos para PCR

- ELECTROFORESIS.

Se preparo gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X se le añadió 30 μl de bromuro de etidio. Ya polimerizado se le coloco en el primer pozo del gel, el control de peso molecular (escalera PB) para ubicar por su peso molecular el citocromo c, posteriormente se colocaron 4 μl de cada una de las diferentes muestras (productos PCR) en los pozos del gel. Se corrió el gel en una cámara de electroforesis (Owl, USA), Cubierto de TBE 0.5 % A 80-90 Volts durante 60 min. Finalmente se coloco el gel en un transiluminador (UVP, USA) que con ayuda de la luz ultra violeta se observaron los productos y a si se logro localizar las bandas de Citocromo c.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR MEDIO DE ANEXINA-V

Con el propósito de evaluar si Interleucina-2 (IL-2) es capaz de inducir muerte por apoptosis en las líneas de cáncer cérvico uterino VIPA y ROVA. Se utilizó la prueba para determinar Anexina-V.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR ROVA CULTIVADA DURANTE 24 HORAS EN PRESENCIA DE IL-2

Para poder determinar la apoptosis en las células de esta línea celular, se obtuvieron células cultivadas por 24 horas en presencia de 100 UI/ml de IL-2. Una vez transcurrido este tiempo las células fueron fijadas, agregándoles posteriormente Anexina-V conjugada con FITC y se midió intensidad de fluorescencia por medio de un citómetro de flujo (BD FACS ARIA II).

En el histograma de intensidad de fluorescencia se observa que las células cultivadas en presencia de IL-2 presentaron un incremento considerable de fluorescencia para FITC (células positivas a apoptosis) en comparación de las células cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 7a). Por otro lado el esquema de cuadrantes de poblaciones muestra que en la región Q1 se encuentran el 1.0% de las células que son positivas a ioduro de propidio (células positivas a necrosis (IP); en la región Q2 un 10.8% de células tienen doble marca (IP +, FITC⁺); en la región Q3 el 27.8% de células no presentan marca (IP⁻, FITC) y en la región Q4 el 60.4% de células son positivas a FITC (células positivas a apoptosis) (Figura 7b).

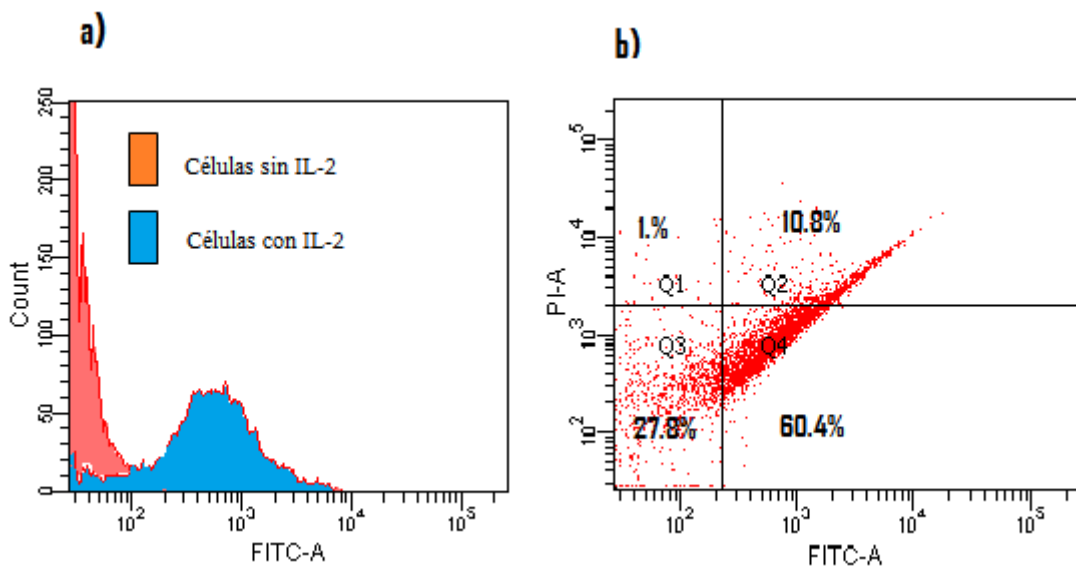


Figura 7. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular ROVA, cultivada en presencia de IL-2. El histograma a): Intensidad de fluorescencia en las células cultivadas en presencia de IL-2 que muestra un desplazamiento de intensidad con respecto al control. b): regiones de poblaciones celulares; Q1 indica células positivas a ioduro de propidio (PI) por tanto muriendo por necrosis; Q2 células con doble marca que están muriendo por necrosis y apoptosis; Q3 sin marca negativas a la fluorescencia; Q4 células positivas a FITC que están muriendo por apoptosis. Se observa un incremento de hasta un 60.4% de células en apoptosis cuando son cultivadas en presencia de IL-2.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR ROVA CULTIVADA DURANTE 48 HORAS EN PRESENCIA DE IL-2.

Se determinó la apoptosis en la línea celular de CaCu ROVA, cultivada durante 48 horas en presencia de IL-2 por medio de la detección de la Anexina-V conjugada con FITC. Los resultados obtenidos se muestran en el histograma de intensidad de fluorescencia, observando una mayor intensidad de fluorescencia de las células cultivadas en presencia de IL-2 en comparación con las células cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 8a). De igual forma estos resultados se confirman en el histograma de cuatro puntos donde se observa este mismo resultado pero dado en porcentajes en cada región de este; Q1, muestra un 0.6% de células positivas a ioduro de propidio (PI); en la región Q2 observamos que el 12.7% de células sin marcar; región Q3 FITC, presenta doble marca (IP +, FITC⁺); con un 20.4%. Los datos mostrados en la región Q4 del diagrama de cuatro puntos, muestran un 66.2% de células positivas a FITC (células positivas a apoptosis) (Figura 8b).

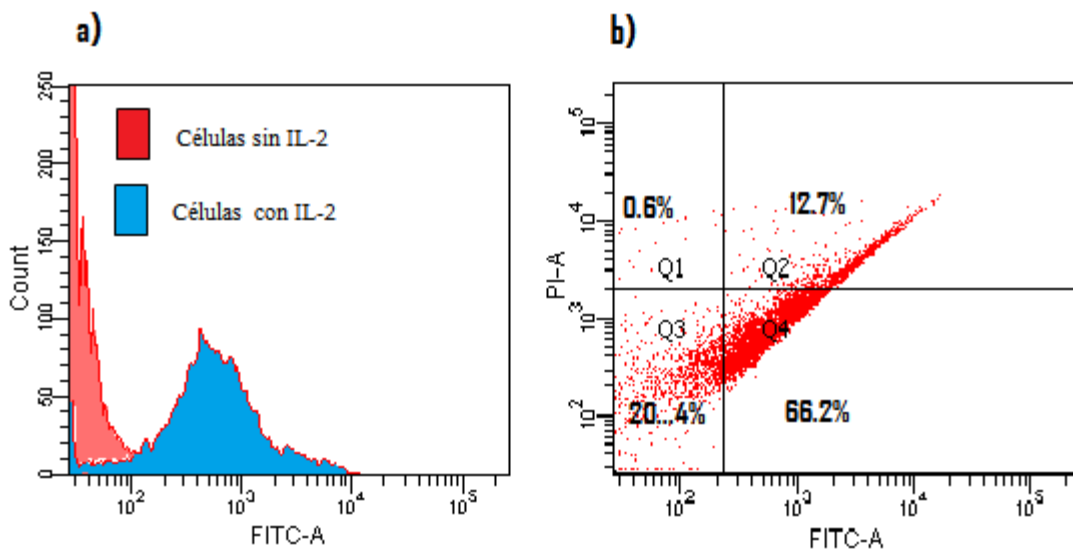


Figura 8. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular ROVA, cultivada en presencia de IL-2. El histograma de Intensidad de fluorescencia en las células cultivadas en presencia de IL-2 muestra una mayor intensidad de fluorescencia con respecto al control (células cultivadas en ausencia de IL-2). b): regiones de poblaciones celulares; Q1 indica células positivas a ioduro de propidio (PI) por tanto muriendo por necrosis; Q2 células con doble marca que están muriendo por necrosis y apoptosis; Q3 sin marca negativas a la fluorescencia; Q4 células positivas a FITC que están muriendo por apoptosis. Se observa un incremento de hasta un 66.2% de células en apoptosis cuando son cultivadas en presencia de IL-2.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR VIPA CULTIVADA DURANTE 24 HORAS EN PRESENCIA DE IL-2.

Se determinó la apoptosis en la línea celular VIPA, cultivada durante 24 horas en presencia de IL-2, por medio de la detección de la Anexina-V conjugada con FITC. Los resultados obtenidos se muestran en el histograma de intensidad de fluorescencia, en donde las células de CaCu cultivadas en presencia de IL-2 presentaron una mayor intensidad de fluorescencia esto se observó comparando con células cultivadas en ausencia de IL-2, las cuales presentan una menor intensidad e fluorescencia (Figura 9a). A si mismo estos se corroboran en los datos observados, en el histograma de de 4 puntos, donde se muestra los resultados por porcentajes: Q1, presenta un 0.5% de células positivas a ioduro de propidio (IP); en la región Q2 el 27.9% son de células sin marcar; en la región Q3 el 12.6% de las células presenta doble marca (IP +, FITC⁺) (Figura 9b), en la región Q4 del diagrama de cuatro puntos, se encuentran las células positivas a FITC 59.1% (células positivas a apoptosis) (Figura 9b).

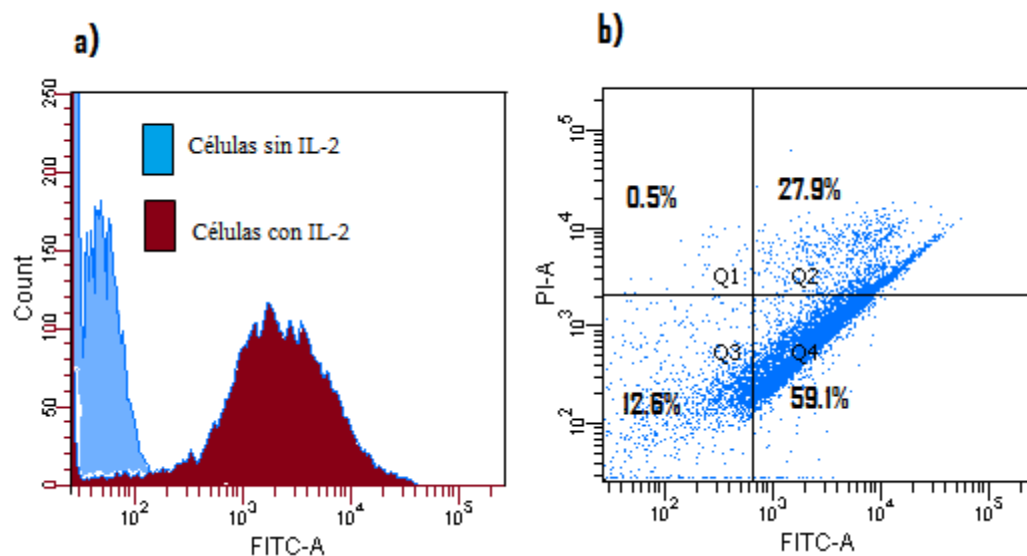


Figura 9. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular VIPA, cultivada en presencia de IL-2. El histograma a): Intensidad de fluorescencia en las células cultivadas en presencia de IL-2 que muestra un desplazamiento de intensidad con respecto al control. b): regiones de poblaciones celulares; Q1 indica células positivas a ioduro de propidio (PI) que por tanto están muriendo por necrosis; Q2 presenta células con doble marca para FITC e indican células que mueren por necrosis o apoptosis; Q3 células sin marca negativas a (células sin nada) fluorescencia la fluorescencia; Q4 células positivas a FITC que están muriendo por apoptosis. Se observa un incremento de hasta un 59.1% de células en apoptosis cuando son cultivadas en presencia de IL-2.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR VIPA CULTIVADA DURANTE 48 HORAS EN PRESENCIA DE IL-2.

Se determinó la apoptosis en la línea celular VIPA, cultivada en presencia de IL-2 durante 48 horas, por medio de la detección de la Anexina-V conjugada con FITC. El histograma de intensidad de fluorescencia, se presenta una mayor fluorescencia para las células de CaCu cultivadas en presencia de IL-2, mientras que las células cultivadas en ausencia IL-2 no se observa este aumento en la fluorescencia. De forma semejante estos resultados se muestran en el histograma de cuatro puntos (Figura 10b), los resultados demostrados se muestran por porcentajes: en la región Q1, el un 0.7% de células son positivas a ioduro de propidio (IP); en la región Q2 el 26.3% de células sin marcar (solo células); región Q3 las células que presentan doble marca (IP +, FITC⁺); representada con un 18.8%, en la región Q4 del diagrama de cuatro puntos se encuentran las células que dieron positivas a FITC representadas por un 54.2% (figura 10b).

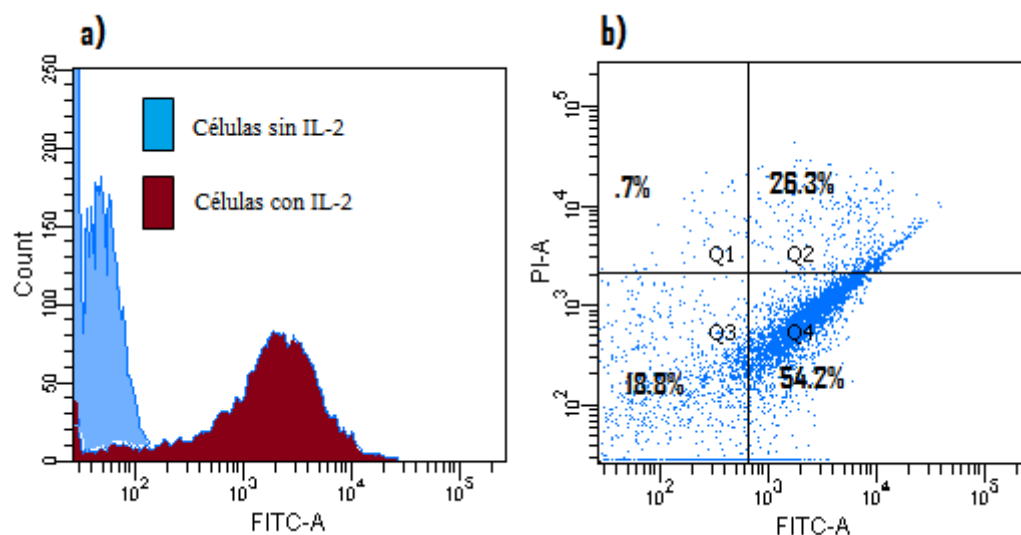


Figura 10. Determinación de apoptosis por medio de la presencia de Anexina-V en la línea celular VIPA, cultivada en presencia de IL-2. El histograma a): Intensidad de fluorescencia en las células cultivadas en presencia de IL-2, muestra un desplazamiento de intensidad con respecto al control (células sin IL-2). b): Diagramas de regiones celulares; Q1 indica células positivas a ioduro de propidio (PI) por tanto muriendo por necrosis; Q2 células con doble marca que están muriendo por necrosis y apoptosis; Q3 células sin marca negativas a la fluorescencia; Q4 células positivas a FITC que están muriendo por apoptosis. Se observa un incremento de hasta un 54.2% de células en apoptosis cuando son cultivadas en presencia de IL-2.

COMPARACION DE RESULTADOS PARA LA DETERMINACION DE APOPTOSIS EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CaCu ROVA Y VIPA.

Al compara los resultados de la determinación de apoptosis por medio de la detección Anexina-V, se observo que la línea celular de CaCu ROVA cultivada en presencia de IL-2 presenta una diferencia de 1.3% de intensidad de fluorescencia en las primeras 24 horas de cultivo en comparación con la línea celular de CaCu VIPA, por otro lado se observo que para el cultivo durante 48 horas, la línea celular ROVA presento una diferencia de 12% más de intensidad de fluorescencia que la línea celular VIPA.

Línea celular	24 horas	48horas
ROVA Estadio III B	60.4%	66.2%
VIPA Estadio IIB	59.1	54.2%
	1.3%	12%

Tabla 4. Resultados para la determinación de apoptosis en las líneas celulares de CaCu ROVA y VIPA. Se observa que la línea celular de CaCu ROVA presenta una mayor apoptosis que la línea celular VIPA con una diferencia de 1.3 y 12% de apoptosis para los tiempos de 24 y 48 horas respectivamente.

Después de confirmar que las líneas celulares de CaCu VIPA y ROVA cultivadas en presencia de IL-2 son inducidas a muerte por apoptosis. Se evaluó la regulación de la expresión del mensajero para citocromo c en estas células. Para ello, se cultivaron células a 30 min., 2 horas, 2 días, 4 días, y 6 días en presencia de 100UI/ml de IL-2. Se extrajo el RNAm, se retrotranscribió y se realizó un PCR con primer sentido y anti-sentido para citocromo c. Con el propósito de contar con las condiciones más adecuadas para la PCR se obtuvieron productos de amplificación para β -actina.

EXPRESION DE β -ACTINA

Se sabe que la B-actina es una proteína constitutiva de la célula, es una de las proteínas estructurales del citoesqueleto de las células eucariotas la cual participa en múltiples procesos biológicos como migración, división celular, endocitosis, mantiene la morfología celular, etc., por lo cual continuamente se está transcribiendo. Por esta razón, la expresión de β -actina es utilizada como un parámetro interno de la técnica RT-PCR y la ausencia de esta proteína se interpreta como un error de la técnica. Por lo cual, la amplificación de β -actina, tanto para las muestras cultivadas en ausencia y presencia de IL-2 sirve como control de los productos de amplificación de los primers de interés.

Los resultados obtenidos para la amplificación de β -actina en células de las líneas VIPA y ROVA cultivadas a 30 minutos, 2 horas y 2 días, 4 días, 6 días, días en presencia o ausencia de 100 UI/ml de IL-2, se observa un producto de amplificación de 234 pb con una mayor expresión en las células cultivadas en presencia de IL-2 (Figura 11(+)) de igual forma también se expreso para las células cultivadas en ausencia de IL-2 pero de menor forma que las cultivadas en presencia de IL-2. Al obtener productos de amplificación para β -actina en las condiciones antes descritas, se confirmo que el protocolo diseñado para la técnica de PCR nos garantiza la amplificación confiable de los primers a utilizamos para citocromo c (Figura 11).

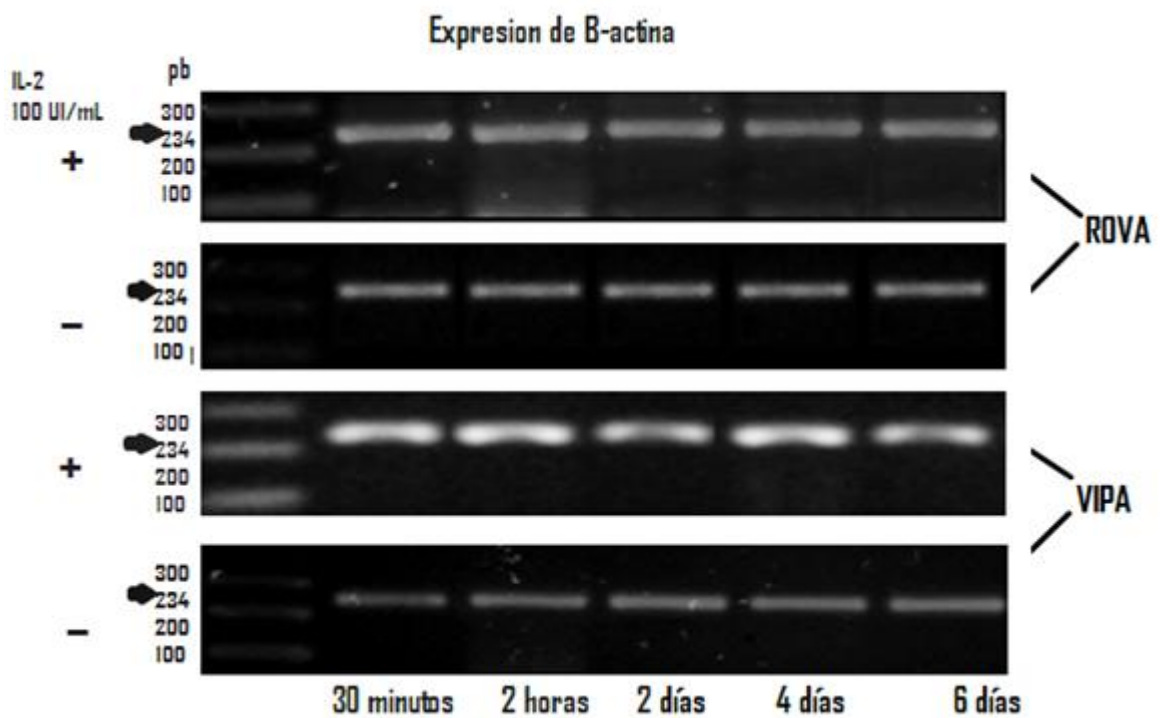


Figura 11. Expresión de β -actina en células de las líneas de CaCu VIPA y ROVA. Se cultivaron células de ambas líneas celulares en presencia y ausencia de 100UI/ml de IL-2 a 30 min, 2 horas 2 días, 4 días y 6 días. Para ambas líneas celulares se obtuvo un producto de amplificación de 234 pb, con un incremento en las células cultivadas en presencia de IL-2(+) ya que las cultivadas en ausencia de IL-2(-) se observa unas bandas de menor intensidad.

Una vez confirmado que las condiciones de la PCR son adecuadas para la amplificación de cualquier par de primer de interés, se procedió a realizar la amplificación para citocromo c en las líneas celulares VIPA y ROVA cultivadas en presencia y ausencia de IL-2.

EXPRESIÓN DE CITOCROMO C EN LA LÍNEA CELULAR ROVA

Los resultados obtenidos para la línea celular ROVA, muestran un producto de amplificación de 183pb esperado para citocromo c. El RNAm para citocromo c, está presente tanto en las células de CaCu cultivadas en presencia (+) como en las cultivadas en ausencia de IL-2 (-). Sin embargo, en el caso de las muestras estimuladas con IL-2 (Figura 12 (+)) se observa una mayor expresión del amplificado en los tiempos de 2 horas y 2 días en comparación con los tiempos de 30 minutos 4 días y 6 días células cultivadas en presencia de IL-2. Por otro lado en las células cultivadas en ausencia de IL-2 se observa una menor intensidad en los productos obtenidos (Figura 12 (-)).

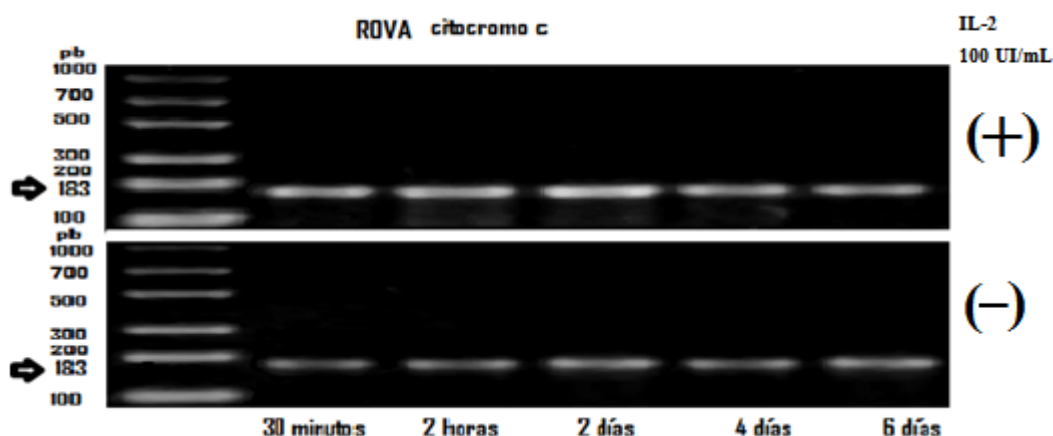


Figura 12. Expresión de citocromo c en la línea celular de CaCu ROVA. Se cultivo la línea celular ROVA en presencia y ausencia de IL-2 por 30 minutos, 2 horas, 2 días, 4 días y 6 días. Los resultados indican la presencia de un amplificado de citocromo c en ambas muestras. Con una mayor expresión del amplificado para las muestras estimuladas con IL-2(+), 30 minutos, 2 horas, 2 días. Por su parte las muestras no estimuladas (-) presentan una menor intensidad de las bandas de la expresión en células cultivadas en ausencia de IL-2.

EXPRESIÓN DE CITOCROMO C EN LA LÍNEA CELULAR VIPA

Se cultivo la línea celular VIPA en presencia y ausencia de IL-2. En los siguientes tiempos; 30 minutos, 2 horas, 2 días, 4 días, y 6 días. Los resultados indican un amplificado de 183 pb, las cuales indican que es el tamaño de amplificación de citocromo c. Podemos observar que en las células de CaCu cultivadas en presencia de IL-2 presentan una mayor amplificación del RNAm de citocromo c, donde se observa una banda de mayor expresión (Figura 13 (+)), en el los tiempos de 2 horas y 2 días de esto es en comparación a las células cultivadas en ausencia de IL-2 (Figura 13 (-)) donde se observa una menor expresión del RNAm para citocromo c.

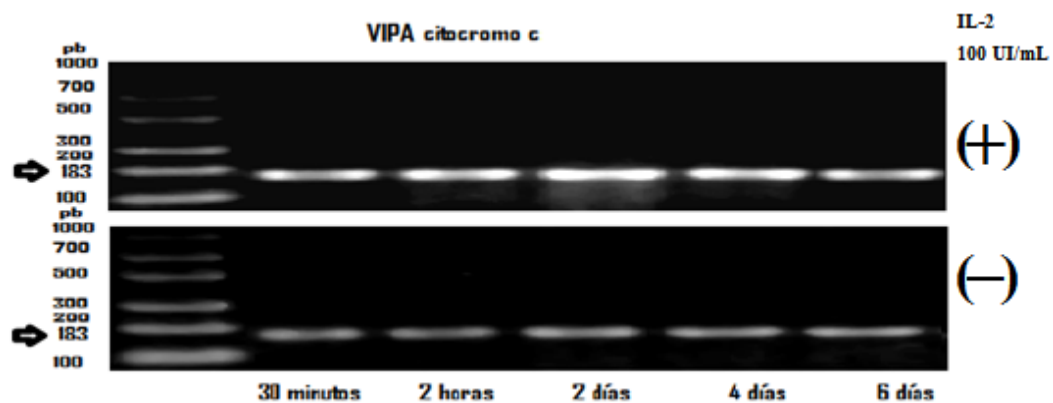


Figura 13. Expresión de citocromo c en la línea celular VIPA. Se cultivo la línea celular VIPA en presencia y ausencia de IL-2 por 30 minutos, 2 horas, 2 días, 4 días y 6 días. Los resultados indican la presencia de un amplificado de citocromo c en ambas muestras. Con una mayor expresión del amplificado para las muestras estimuladas con IL-2(+), 30 minutos, 2 horas 2 días. Por su parte las muestras no estimuladas (-) presentan una menor intensidad de las bandas de la expresión en células cultivadas en ausencia de IL-2.

COMPARACIÓN ENTRE LAS DOS LÍNEAS CELULARES DE CaCu CULTIVADAS EN PRESENCIA DE IL-2

Comparando los resultados de la determinación de RNAm para citocromo c en las líneas celulares de CaCu (VIPA y ROVA) cultivadas en presencia de IL-2. Se observa que la línea celular de CaCu VIPA presenta un mayor amplificado del RNAm para citocromo c esto es en comparación a la línea celular ROVA en donde se observa una menor amplificación del RNAm para citocromo c en todos los tiempos de cultivo de una forma mas marcada en el tiempo de cultivo de 2 horas y 2 días para ambas líneas (Figura 14).

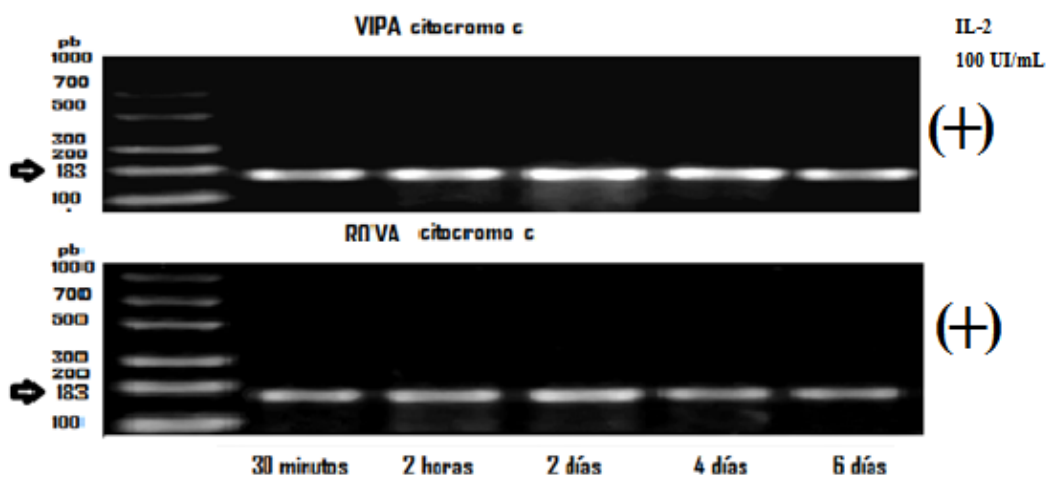


Figura 14. Comparación entre las líneas de CaCu ROVA Y VIPA cultivadas en presencia de IL-2. Se compararon las líneas celulares de CaCu VIPA Y ROVA cultivadas en presencia de IL-2, donde se observa un amplificado de 183 pb el cual es el tamaño de citocromo c en ambas líneas celulares, cabe destacar que se observa una mayor expresión del RNAm para citocromo c en la línea celular de CaCu VIPA observándose una mayor expresión en los tiempos de 2 horas y 2 días. Mientras que para la línea celular ROVA se observa una menor amplificación del mensajero en comparación con la línea celular VIPA de igual forma se observa una mayor expresión del RNAm para citocromo c en los tiempos de 2 horas y 2 días.

DISCUSIÓN

Interleucina 2 (IL-2) es un potente activador de linfocitos T, células NK, macrófagos, linfocitos B y estimula la liberación de varias citocinas. Su efecto antitumoral esta dado por la activación de células NK por algunas linfocinas (LAK) (Yang, 2003). El uso de IL-2, como terapia contra el cáncer se ha empleado en diversos modelos tumorales preclínicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma de cabeza y cuello, sarcomas plasmocitoma, carcinoma de mama y linfomas (Lui, 2004; Deshumukh, 2001).

También, se ha reportado que la proliferación de células de CaCu se inhibe cuando son cultivadas en presencia de IL-2. El efecto de inhibición y proliferación se atribuye a la expresión del receptor para IL-2 en estas células tumorales (Rangel, 1998).

Al respecto, Rangel 1998 demuestra que las líneas celulares de CaCu CALO e INBL pueden ser inducidas a muerte por apoptosis cuando son cultivadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2. Por lo antes mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la transcripción del RNAm para citocromo c y la evaluación de apoptosis mediada por 100 UI/ml de IL-2 en un modelo experimental *in vitro*.

Como se sabe la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, pero no así la distribución de sus componentes, de hecho el ejemplo más representativo de estos cambios en la reubicación de la fosfatidilserina, que es un fosfolípido que normalmente se encuentra ubicado en la monocapa interior de la membrana plasmática de la célula y cuando esta entra en el proceso de muerte por apoptosis es traslocada a la monocapa externa. La presencia de este fosfolípido es utilizado para la detección de apoptosis ya que hay algunas proteínas que tiene alta afinidad por este fosfolípido como es el caso de la Anexina-V la cual al estar conjugada con FITC emite fluorescencia que se mide por citometría de flujo, por lo tanto la presencia de esta proteína es sinónimo de apoptosis.

Por lo tanto, los resultados de citometría de flujo obtenidos al medir la presencia de fluorescencia para Anexina-V-FITC en la línea celular VIPA cultivada en presencia de 100 UI/ml de IL-2 durante los periodos de 24 y 48 horas, muestran un porcentaje de 54.2% a 59.1%, respectivamente, de intensidad de fluorescencia para Anexina-V-FITC, indicando que IL-2 está induciendo la muerte por apoptois.

Por otra parte, para la línea celular ROVA, cultivada en las condiciones antes mencionadas, obtuvimos resultados semejantes a los de la línea VIPA en donde los porcentajes de fluorescencia para Anexina-V-FITC van de 60.4 a 66.2% estos datos corroboran la hipótesis de que las líneas celulares VIPA Y ROVA mueren por apoptosis inducida por IL-2, determinada por la localización de fosfatidilserina, traslocada durante la inducción de apoptosis. Por lo cual el haber detectado la presencia de fosfatidilserina, a través de células positivas a Anexina-V, nos indica que IL-2 induce la muerte por apoptosis en células de carcinoma de cérvix VIPA y ROVA sin mostrar grandes diferencias en el porcentaje de células positivas a Anexina-V después de 24 horas de cultivo en presencia de IL-2.

Los resultados de la determinación de Anexina-V para evaluar apoptosis en las líneas celulares VIPA y ROVA más los datos reportados por Del Río 2011, que demuestra la fragmentación de DNA en las líneas de CaCu CALO e INBL cultivadas en presencia de 100U/ m de IL-2 dan sustento a nuestra propuesta de muerte por apoptosis inducida por IL-2 en este tipo de células tumorales.

Hasta el momento hemos proporcionado información que demuestra que IL-2 induce apoptosis en 4 líneas celulares de CaCu. Sin embargo, no esclarecemos que vía apoptótica se activa en este proceso. Por lo que es importante considerar que la muerte celular por apoptosis regula mecanismos relacionados con la liberación de moléculas apoptóticas como es el citocromo c, un componente crítico de la cadena de electrones, cuya liberación desde la mitocondria es considerado como una consecuencia de la activación de la vía apoptótica intrínseca ya que recluta a proteínas como apaf-1 y caspasa 9 para conformar al apoptosoma que activa a caspasas efectoras como caspasa 3. Por lo antes mencionado si determinamos la presencia del mensajero para citocromo c en células tratadas con IL-2 podremos proponer que mueren por apoptosis.

Dada la importancia de citocromo c en la regulación de la apoptosis en este trabajo se hizo la determinación por RT-PCR de los productos de amplificación para esta molécula. Y dado que esta técnica debe contar con un control interno para mayor confiabilidad se determinó la presencia de los productos de β -actina que nos indican, que las condiciones de la técnica de PCR son adecuadas para la amplificación de cualquier primer, como el de citocromo c. Se elige a β -actina por ser una proteína constitutiva de las células y su síntesis constante, por lo que la presencia de su producto de amplificación en una célula es una prueba positiva para la técnica RT-PCR.

Por lo tanto, el hecho de haber obtenido productos de amplificación para esta proteína en el RNAm extraído de las células VIPA y ROVA cultivadas en ausencia y presencia de IL-2 nos garantiza que las condiciones para la PCR son adecuadas para obtener productos de amplificación de cualquier par de primers de interés como los utilizados para citocromo c.

La determinación por PCR de la expresión del mensajero para citocromo c, tanto en células cultivadas en ausencia como en presencia de IL-2 lo explicamos de la siguiente manera. La presencia del mensajero para citocromo c en las células cultivadas en ausencia de IL-2 se atribuye a que citocromo c, es una molécula normalmente asociada a la membrana interna de la mitocondria ya que es un componente muy importante en la cadena de transporte de electrones. Por lo que su presencia en estas células era de esperarse por su participación en la síntesis de ATP (Karp, 1996).

Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas en presencia de IL-2 los resultados muestran un aumento considerable en la expresión del mensajero para citocromo c. En las células cultivadas en presencia de IL-2. Estos datos son importantes si se toma en cuenta que citocromo c participa en la vía intrínseca de la apoptosis, teniendo un papel como inductor de apoptosis, que se ha reportado en diversos trabajos relacionados con esta vía de muerte celular (Herrera, 2012). Por lo que la regulación al alta de la expresión del mensajero para citocromo c, inducida por IL-2, es por sí misma una aportación relevante de este trabajo.

No obstante, podemos hacer otra contribución para esclarecer el mecanismo molecular de IL-2 para inducir apoptosis en células de CaCu. Esto es al observar que la mayor expresión del mensajero para citocromo c que se detecto es en la línea celular VIPA a diferencia de la línea ROVA lo que podemos atribuir al estadio de cada línea celular. Ya que VIPA corresponde a un estadio IIB, mientras que ROVA se clasifica en un estadio IIIB que es un estadio más avanzado. Nuestros datos de PCR y citometría indican que tenemos una menor regulación de la expresión del mensajero para citocromo c en las células de estadio avanzado, que sugiere una mayor inducción de apoptosis. Aumento que se ve reflejado en el porcentaje de intensidad de fluorescencia para Anexina-V en ROVA que es de 60.4% y 66.2 en los tiempos de cultivo de 24 y 48 horas respectivamente. En base a estos resultados proponemos que las células en estadios avanzados son más susceptibles a morir por apoptosis, sobre todo en las primeras 24 horas en presencia de IL-2.

Esto sugiere que IL-2 exógena puede jugar un papel importante en la inducción de muerte por apoptosis en las líneas celulares de CaCu. Estos datos se correlacionan con los resultados de (Rangel et al, 2010), quienes demuestran que las líneas de cáncer

cervicouterino CALO e INBL son inducidas a muerte por apoptosis cuando son cultivadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2 exógena. Por lo que se puede generalizar la propuesta del uso de IL-2 como una alternativa terapéutica para pacientes con CaCu sin importar el estadio, ya que se observa el efecto antitumoral de IL-2 en líneas celulares de diferentes estadios, sin embargo, nuestros resultados indican que IL-2 a 24 horas es 1.3% más eficiente en inducir la muerte de las células de la línea celular ROVA estadio avanzado a comparación de la línea celular VIPA. Lo que implicaría que citocromo c estaría siendo utilizado para formar el apoptosoma, inmediatamente después de ser sintetizado disminuyendo el RNAm citoplasmático para esta proteína lo cual explicaría que tengamos productos de amplificación menores para citocromo c en células ROVA en comparación de las células VIPA.

Podría pensarse que el uso de IL-2 como alternativa terapéutica, sólo podría limitarse para tumores de CaCu en estadios avanzados, sin embargo, nuestros resultados de citometría para la detección de Anexina-V a 48 horas muestran que el porcentaje de células positivas a Anexina-V es similar en ambas líneas celulares. Es decir que el incremento de la expresión del mensajero para citocromo c se da en las primeras 24 horas de la línea VIPA lo que le permite alcanzar un máximo en la inducción de apoptosis durante a las 48 horas.

Finalmente, con los datos aquí reportados podemos proponer que la vía apoptótica que activa IL-2 en células de CaCu, es la intrínseca ya que los resultados de la RT-PCR realizada en este trabajo, muestran una regulación positiva de la expresión del mensajero par citocromo c, en aquellas células, de las líneas VIPA y ROVA, que fueron cultivadas en presencia de 100 UI/ml de IL-2. Estos datos confirman que IL-2, al igual que en las líneas CALO e INBL, induce la muerte por apoptosis de las células de las líneas VIPA y ROVA. Proponemos que IL-2 regula la síntesis de citocromo c, que es liberado de la mitocondria para inducir la muerte por apoptosis de las células de CaCu.

CONCLUSIÓN

- 100 U/ml de IL-2 induce apoptosis en líneas celulares de CaCu ROVA y VIPA
- La transcripción de RNAm para citocromo c en células de cáncer cérvico uterino VIPA y ROVA está siendo codificada constantemente.
- 100 UI/ml de IL-2 aumenta la expresión de citocromo c en células de cáncer cérvico uterino ROVA y VIPA.
- La expresión de citocromo c es mayor durante las primeras las 24 horas en la línea celular VIPA.

PERSPECTIVAS

Con el propósito de identificar otras proteínas inductoras de apoptosis por la vía de intrínseca, así como establecer la posible activación de la vía extrínseca se recomienda.

- 1.- Determinar la expresión del RNAm para las proteínas pro-apoptóticas Bid, Bax, Bcl-2.
- 2.- Determinar la expresión del RNAm para las proteínas que participan en la vía extrínseca como caspasa 8.
- 3.- Identificar la presencia de Bid, Bax, Bcl-2 por western blot.
- 4.- Determinar la presencia de caspasas inductoras y efectoras activas.

BIBLIOGRAFIA

- 📖 Albert's B., Bray D., Lewis J. 2004. Biología molecular de célula; 3ª Ed. Editorial Omega. 721-729.
- 📖 Alonso P. Lazcano E., Hernández M. 2000. Cáncer Cervico-uterino Diagnostico, Prevención y control. 2ª Ed. Editorial Médica Panamericana. México.121-385
- 📖 Anichini A., Mortarini R., Sensi M., Zanon M. 2006. APF-1 signaling in human melanoma. *Cáncer Letters*. (238): 168-179.
- 📖 Ashford L., Collymore Y. 2004. La prevención del cáncer cervical a nivel mundial. Alliance for cervical cáncer prevention.1-25.
- 📖 Avedano C. & Menendez J.2008. Medicinal chemistry of anticancer drugs. Elsevier Oxford, Reino Unido. (1): 1-400.
- 📖 Ayala A. 2005. Efecto de la IL-2 Encapsulada en liposomas neutros y aminoácidos sobre la proliferación de las líneas celulares de CaCu, CALO e INBL. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Zaragoza UNAM. Méx. DF.
- 📖 Belanger S., Cote M., Rancourt C., Pinche A., 2005. Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*. (97): 796-806.
- 📖 Bermudez V., Peralta O., Madrid V. 2005. Terapia génica con citocinas contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública Mex*. (6): 458-468.
- 📖 Blagosklonny M. 2003. A new science-business paradigm in anticancer drug development. *Trends in Biotechnology* (21): 103-106.
- 📖 Brostoff J, Scadding GK, Male DK, Roitt IM. 1993. Cáncer. En: *Immunologie Clinque*. France: De Boeck University Bruxelles. (16): 281-291.
- 📖 Cain K., Bratton B., Cohen M. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*. (84): 203-214.
- 📖 Calvo JC., Choconta K., Díaz D., Orozco O., Bravo M., Espejo F., Salazar L., Guzman F., Patorroyo M. 2003 An alpha hélix conformationally restricted peptide is recognized by cervical carcinoma patient' s será. *J Med Chem*. (25): 5389-5394.
- 📖 Cameron R. 1995. *Oncología practica*.1ª Ed. Editorial Panamericana, Argentina, 1-769 pp.

- Cardona H. 1968. Pesquisa del cáncer de cuello uterino. Revista médica, Volumen. (36): 10-19
- Carnis J. 1981. Cáncer: Ciencia y Sociedad. Ed. Reverte, S.A. España. (2): 84-291.
- Carrillo A, Mother A, Meneses A, MC, Frías M, Solorza G y Lizano M. 2004. Utilidad en la combinación de oligonucleotios universales para la detección de virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. Salud pública de México, 46(1):7-15.
- Cascales A. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. Anal. Real Académica de Numero de la Real Academia de Farmacia. 69 (1): 37-64.
- Chauvier D., Renolleau S., Holifanjaniana S., Ankri S., Beazault M. 2011. Targeting neonatal ischemic brain injury with a pentapeptide-basade irreversible caspase inhibitor. Cell Death and Disease. Neuroscience. (9): 3-11.
- Combata A, Touze A, Coursaget P, Bravo M. 2003. Respuesta serológica hacia las capsides de los papilomavirus oncogénicos tipos 16, 18, 31, 33, 39, 58 y 59 en mujeres colombianas con cáncer de cérvix invasivo Rev. Col Cancerología. (7): 26-34.
- Comella J., Llecha N., Yuste J., Boix J. 1999. Bases moleculares de la apoptosis celular y su relación con la patología renal. Nefrología. Vol. XIX. Suplemento (1): 21-28.
- Consesos Statemeat. 1997. National Institutes de Health Consensus Development Conference Statement on Cervical cáncer Gyn Onco; (66): 351-361.
- Cuello M., Kato S., Sadarangani K., Sáez S., Gejman E., Owen G., Lipkowitz. 2006. Muerte celular mediada por receptores: Rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducida por el ligando TRAIL en canceres ginecológicos. Boletín de Medicina U. C. Pontificia Universidad de Chile. (31): 5-15.
- Czerski L. Nuñez G. 2004. Apoptosome Formation and caspase activation is it different in the heart. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. (37): 643-652.
- Dash P. 2000. Apoptosis Basic Medical Sciences, St George's University of London. (1): 1-6.
- De Toro G. 2006. Muerte celular pro gramada. Revisión del paradigma Apoptosis-Necrosis y formas alternativas de muerte celular. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Chile. (4): 1-6.

-
- 📄 Del Rio. 2011. Determinación de apoptosis y citocromo c, en las leneas celulares CALO e INBAL cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Maestría. FES Zaragoza. México. D.F.
 - 📄 Deshmukh P., Glick R., 2001. Immunogene Therapy with Interleukin-2-secreting fibroblasts for Intracerebrally Metastasizing Breast Cancer in Mice. *J. Neurosurg.* (2): 287-292.
 - 📄 Díaz P., Herrera P., Miguel G., Ruiz N., Gallego S., López G., García G. 2008. Bcl2 mitigates ca entry and mitochondrial Ca overload through downregulation of L-type Ca channels in PC 12 cells. *Cell Calcium.* (44): 339-352.
 - 📄 Dzul R., Puerto S., Gonzáles L. 2004. Cáncer cervicouterino: métodos actuales para su detección. *Rev. Biomed.* (15): 233-241.
 - 📄 García N. 2008. El tratamiento actual del cáncer cervico uterino. *Ginecol Obstet Méx.* (2): 131-139.
 - 📄 Ghibelli L., Diederich M. 2010. Multistep and Multitask Bax activation. *Mitochondrion* (10): 604-613.
 - 📄 Gutiérrez D., Baez M., Gonzáles P., Prieto R., Witlen R. 2008. Relación costo efectividad de las intervenciones preventivas contra el cáncer cervical en mujeres mexicanas. *Salud Pública de México.* (2): 107-118.
 - 📄 Hellman S. 1996 Advancing courrent treatments for cancer. *Scientifi American.* número (3): 118-123.
 - 📄 Hernán C. 2003. Papilomavirus y cáncer de cérvix. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* (2): 108-112.
 - 📄 Hernández M., M. y Ríos H. 2009. Rol biológico del selenio en el humano; *Revista viva, Buenos Aires Argentina;* (8), 64-79.
 - 📄 Herrera M. 2012. Determinación del receptor para IL-2, así como el efecto de IL-2 sobre la proliferación y regulación de genes mitocondriales (citocromo c) en la línea celular de cáncer cérvico uterino C33. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Zaragoza UNAM, México.
 - 📄 Hidalgo M. 2006. El cáncer cervico uterino, su participación en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed.* (17): 81-84.

- ☞ Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) 2009. Secretaria de Salud. Base de datos de defunciones. México, DF.
- ☞ Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *Ámbito Farmacéutico. Bioquímica.* (22)100-106.
- ☞ Karp G. 1996, *Biología celular y molecular McGraw-Hill Interamericana*,(1) pág. 12
- ☞ Kawaguchi P. 2000 *Epidemiología del cáncer .Dpto. de Medicina Interna - Facultad de Medicina. Biorrayanes.*
- ☞ Kruidering M. and Evan GI. 2000. Caspase-8 in apoptosis: The Beginning of The End *IUBMNB. Life;* (50): 85-90
- ☞ Lavelly R. 1995. *Principios en oncología radiante. En oncología practica, Editorial médica panamericana, Argentina.*
- ☞ Lazcano P. and Betania L. 2009. Innovation in Cervical Cancer Prevention and Control in Mexico a Center for Population Health Research, National Institute of Public Health, Mexico, D.F., Mexico b Reproductive Health Division.(ARCMED-D-09-00314).
- ☞ Lazcano P., Rojas M., López A., López C., Hernández A. 1993. Factores de riesgo reproductivo y cáncer cervico uterino en la Ciudad de México. *Salud Pública de México.* 65-73 pp.
- ☞ León C. Faxas M., 2004. Cáncer de cuello uterino: aspectos inmunológicos y genéticos de mayor relevancia. *Rev. Cubana Med.* (43) 1-8.
- ☞ Leyton L. and Quest F. 2004. Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on recurrent theme in cell life and death. *Biol. Res.* (1): 29-43.
- ☞ Lindholm K. 2002. IL-2 receptor signaling through the Shb adapterprotein in T an NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (296): 929-936.
- ☞ Liu X., Naekyung K., Yang J., Jemmerson., Wang X. 1996. Induction of Apoptotic Program in Cell- Free Extracts: Requirement for ATP and Cytochrome c. *Cell Vol.* 86 147-157.
- ☞ Lizarbe I. 2007. El suicidio y la muerte celular. *Rev. R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.* (101): 1-33.
- ☞ López S., Lizano S. 2006. Cáncer cervico uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología.* (1): 31-55.

- Lui K., Gaffen S. 2004. Overview of Interleukin-2 Function and Clinical applications. *Cytokine*. (3): 109-123.
- Marce T. 2004. Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides. Facultad de Medicina Universidad de Barcelona. Pág. 1-59.
- Meléndez Z., Ceballos C. 2008. Sobreviviendo a Diablo: Lecciones de la supervivencia en la apoptosis. *Mensaje Bioquímico*. (32): 175-183.
- Merino P., Noriega B. 2005. *Fisiología General; crecimiento y diferenciación celular*. Universidad de Cantabria. (1): 1-5
- Mora M. y Crespín M. 1992 Conización del cuello uterino en patología cervical. *Revista Médica Hondureña Volumen*. (60): 163-166.
- Munro A. 2006. Día Mundial Contra el Cáncer: acción mundial para evitar 8 millones de muertes por cáncer de aquí a 2015. Departamento de Enfermedades Crónicas y Promoción de la Salud. (6): 1-6.
- Nazzari N, Suárez P, Larraguibel P, Rojas F y Bronda M. 2006. Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual. *Chil Obstet Ginecol*, (5): 341-348.
- Neumann I., Kapper R., Schweinitz D., Michael K. 2011. Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL induce apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. *Clinical Cancer Research in Pediatrics*. (10): 3204-3218.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2008. Datos de base de defunciones.
- Palacio B. 2004. El Cáncer Aspectos básicos sobre su Biología, clínica, prevención, diagnóstico y prevención. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. (1): 8-56.
- Pourkarimi E., Greiss S., Gartner A. 2011. Evidence that CED-9/Bcl2 and CED-4/Apaf-1 Localization is not consistent with the current model for *C. elegans* apoptosis induction. *Cell Death and Disease* (19): 406-415.
- Ramirez C., Carracedo A., Moreno A., Guerra P., 1999. Apoptosis y Enfermedad. *Alergol Inmunol Clin*. (14): 367-374.
- Rangel C, Rodríguez C. Flores C. Gómez I. Soto F. Mendoza R AND B Weiss S. 1998. Differential expression of the two components of the Interleukin2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors*. (3): 1239-1243.

- Rangel C., Corona T, Soto C. López L. Pablo A. Torres G. Weiss S. 2010. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*. (3): 273-7.
- Rea B., Villet S., Greenland T., Mehle P., Chebloune Y., Verdier G., Lachuer L. 2008. Small ruminant lentivirus Tat protein induces apoptosis in caprine cells in vitro by the intrinsic pathway. *Virology*. (383): 93-102.
- Rebecca C. Taylor, Sean P. Cullen and Seamus J. Martin. , 2009. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Current Reviews. Mol. Cell. Bio.* (9): 231-241.
- Robles C., With F., Peruga P., 1996. Tendencias por la mortalidad por cáncer de cuello de útero en las Americas. Vol. *Oficina Sanit Panam.* (6): 478-490.
- Roitt I., Brostoff J., Male D., 2000. *Inmunología*. 5ª Ed. Editorial Harcourt. Madrid, España. Pág. 19-20, 78-79.
- Rojas M., Salmen S., Berrueta L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. (4): 92-106.
- Sánchez-Torres L. y Diosdado F. 2003. Apoptosis el fenómeno y su determinación. *Tec Pecu Mex.* (1): 49-62.
- Sandoval B. y Santillán T. 2005. Criocirugía en el tratamiento de lesiones cosméticas de la piel. *Folia Dermatol Perú*. (16): 38-41.
- Teijido O., Dejean L. 2010. Upregulation of Bcl-2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondrial. *FEBS Letters*. (584): 3305-3310
- Ting J., Han L., Cong R., Liang J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. (11): 719-727.
- Tirado G, Mohar B, López C, García C, Franco M y Borges P. 2005. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasores en mujeres mexicanas. *Salud pública de México*. (5): 342-350.
- Valle A. 2001. Estudio de las proteínas activadas por la unión de IL-2 a su receptor en las líneas de Carcinoma de Cervix CALO e INBL en comparación con los linfocitos normales. Tesis de Licenciatura Biología. FES Zaragoza. México. D.F.
- Vander Heiden, M. G. and C. B. Thompson 1999. "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis" *Nat Cell Biol.* (8): 209-216.

-
- 📄 Yang J., Richard M., Sherry S., Stember S. 2003. Randomized Study of High-Dose and Low-Dose Interleukin-2 In Patients with metastatic. Renal Cancer. American Society of clinical oncology (21): 3217-3132.
 - 📄 Ying J., Yang W., Ying C., Pan X. 2011. Induction de Caspase 3 Dependent Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells by δ -Element. The Pharmaceutical Society of Japan: 1383-1394.

APÉNDICE

- DESACTIVACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO

Se deja un el suero fetal bovino en un baño maría de 57° C. Esto hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.

- PBS (SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS).

Para aforar a un litro con agua destilada (dH₂O) pesar los siguientes reactivos:

8 gramos de cloruro de sodio (NaCl)

0.20 gramos de cloruro de potasio (KCl)

1.16 gramos de fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄)

0.20 gramos de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)

Disolver perfectamente y establecer a un PH de 7.2

- VERSENO (SOLUCIÓN SALINA DE VERSENO).

Para aforar a un litro con agua destilada (dH₂O) pesar los siguientes reactivos:

3.04 gramos de tris, hidroximetil aminometano ((HOCH₂)₃CNH₂)

8 gramos de cloruro de sodio (NaCl)

0.40 gramos de cloruro de potasio (KCl)

0.2 gramos de EDTA, Dihidrato del Ácido Etilendiamino Tetraacético Disódico (Na₂EDTA·2H₂O)

Disolver perfectamente y establecer a un PH de 7.7

- TBE (TRIS-ÁCIDO BÓRICO-EDTA).

Para aforar a un litro (TBE 10X) con agua destilada (dH_2O) pesar los siguientes reactivos:

108 gramos de tris, hidroximetil aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)

55 gramos de ácido bórico (H_3BO_3)

40 mililitros de EDTA 0.5 M a PH 8

Disolver perfectamente y establecer a un PH de 8

Santa cruz biotechnology