



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EXPRESION DEL COMPLEJO COX 3 EN
CELULAS DE LAS LINEAS DE CANCER CERVICO
UTERINO CALO E INBL, CULTIVADAS EN
PRESENCIA DE IL-2**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

BARRIOS MAYA MIGUEL ANGEL



DIRECTOR DE TESIS: M. en C. Rosalva Rangel Corona

México D.F.

Septiembre de 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **BARRIOS MAYA MIGUEL ÁNGEL**, con número de cuenta **304043808**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **10** del mes de **septiembre** de 2013 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- | | |
|------------|---------------------------------------|
| PRESIDENTE | M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES |
| VOCAL | M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA |
| SECRETARIO | M.C. RAÚL ZAVALA CHAVERO |
| SUPLENTE | BIÓL. MA. CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ |
| SUPLENTE | BIÓL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ |

El título de la tesis que presenta es: **Expresión del complejo COX 3 en células de las líneas de cáncer cérvico uterino CALO e INBL, cultivadas en presencia de IL-2.**

Opción de titulación: tesis.

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F. a 18 de junio de 2013.

Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer Lab-4 P.B., de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental UMIEZ, de la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM. Bajo la dirección de la M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Este trabajo conto con el apoyo financiero del programa PAPIIME de la DGAPA clave del proyecto: PE213312 y mediante el programa de becas para tesis de licenciatura,

MÉXICO D.F. DEL 2013

DEDICATORIAS

A mi madre: María Guadalupe Maya

Muchas gracias mayita por toda la libertad, apoyo, confianza y amor que me has dado siempre e incondicionalmente, tú que siempre has estado junto de mí en todo momento, tanto los momentos felices, los momentos tristes y también en las épocas difíciles pero siempre juntos.

Muchas gracias porque siempre haber estado en todo momento conmigo por todas tus enseñanzas, consejos y tu eterna paciencia conmigo, por ser un excelente ejemplo en mi vida aunque muchas veces decida no seguir tú ejemplo jejejejeje pero sobre todo por siempre creer en mí y porque gracias a ti es posible que yo haya concluido mi tesis y finalmente concluya esta etapa de mi vida obteniendo mi título profesional.

Este trabajo es solo uno de los muchos frutos por venir y todo gracias a ti no hay palabras para agradecerte por todo lo que me has dado, te amo.

A mis hermanos:

Saben que son una parte muy importante en mi vida, ya que al ser el menor ustedes han sido magníficos conmigo en muchos sentidos, siempre apoyándome y estando pendiente de mí. Han estado ahí cuando más los necesito, han sido grandes maestros guiándome, dándome consejos y hasta consintiéndome jejeje muchas gracias por todas las risas, alegrías, peleas, hasta llantos pero sé que pase lo que pase siempre podre contar con ustedes los quiero Alfredo, Daniel Y Maribel.

Finalmente gracias a la máxima casa de estudios la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la excelente calidad educativa que da a todos los alumnos

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: M. en C. Rosalva Rangel Corona.

Muchas gracias por la gran disposición que tuvo en la revisión de este trabajo, la excelente guía que me brindo, por su paciencia y por compartir sus conocimientos que enriquecieron enormemente mi formación académica, por el gran apoyo y la confianza que me brindo durante mi estancia en el laboratorio. Finalmente muchas gracias por la oportunidad que me dio de formar parte de su equipo de trabajo.

A todos los miembros de mi jurado:

M. en C. Carlos Bautista Reyes

M. C. Raúl Zabala Chavero.

Biol. Reynalda Roldán Pérez

Biol. Cristina Alvarado Domínguez

Por todas las sugerencias y observaciones que hicieron en mi trabajo, las cuales contribuyeron enormemente al enriquecimiento del mismo

A mis amigos de la carrera

Juan Torres Parra, José Ricardo Bustos Rodríguez y a Rubi Raquel Massé Acevedo que mas que mis amigos son mis hermanos, ustedes que desde que los conocí me han acompañado en este viaje a lo largo de la carrera, compartiendo momentos de alegría, tristezas, enojos, fiestas, practicas de campo, trabajo, el clásico bullying entre nosotros, momentos deportistas y sobre todo gracias a ustedes las clases y en general la carrera fue de lo más agradable, ojala siempre sigamos en contacto los quiero.

A mis amigos y compañeros de laboratorio

Por todos aquellos momentos de diversión, tensión, compañerismo, desastre fiestas, seminarios con don mich entre muchas otras cosas Mariana , Miriam Noemi, Tania, Yetzi, Luz, Juan Carlos (el Profe), Yuritzzy, Daniel (flaco), Luis Omar, Alondra, Armando (inge), David (davicito darks), Janet, Rubí, Naye, etc

Pero sobre todo muchas gracias a aquellos que aparte de ser mis buenos amigos dentro de laboratorio fueron mis maestros compartiendo conmigo sus conocimientos. A los biólogos Edith Sierra, Reynalda Roldan, Leonardo Trujillo y muy especialmente Itzel Del Rio Ortiz.

Al Dr. Arturo Valle Mendiola por su gran ayuda y por compartir siempre sus conocimientos conmigo durante todo el tiempo que permanecí en la UMIEZ

A mis amigos

A todos y cada uno de mis amigos de diversas partes tanto de mi formación de educación básica pasando por todos aquellos que conocí en el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel sur así como los que he conocido por otros medios, con ustedes he compartido gran parte de mi vida y solo me queda agradecerles por todos los momentos juntos, definitivamente sin ustedes mi vida no sería lo mismo muchas gracias por todo.

Lorena Velarde, Adriana Hernández, Iván Sánchez, Alfredo Zepeda, Ivonne Castañeda, Fabián Segura, Eduardo Reynoso, Ángel Martínez, Moisés García, Adrian Pérez, Karen Parada, Verónica Bárcenas, Miroslava Jaramillo, Alicia Valdovinos, Oscar García, Mariana Quintana, Sarahi Serrato, Antonio Apango, Daniel Bautista, Jeza Loaeza, Omar Martínez, Ana Vallejo, Isabel Barragan, Iver Muñoz, Arlette Himpy y a todos los que me faltaron.

A nuestro gran técnico de laboratorio:

A José Chavarría (don Joe) por el gran apoyo técnico, manteniendo siempre todo el material de laboratorio en orden y esterilizado.

EXPRESION DEL COMPLEJO COX 3 EN CELULAS DE LAS
LINEAS DE CANCER CERVICO UTERINO CALO E INBL,
CULTIVADAS EN PRESENCIA DE IL-2

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL BARRIOS MAYA

MEXICO, DF, 2013



INDICE	PÁGINA
Lista de abreviaturas	4
Lista de figuras	6
Resumen	7
Marco teórico	9
Ciclo celular.....	10
Cáncer.....	11
Cáncer Cervicouterino.....	13
Inmunoterapia e IL- 2.....	14
Apoptosis.....	15
Vía extrínseca.....	16
Vía intrínseca.....	17
Mitocondria.....	20
Cadena de transporte de electrones mitocondrial	21
Complejo I (COX I).....	22
Complejo II (COX II).....	23
Complejo III (COX III).....	24
Complejo IV (COX IV).....	25
Complejo V (ATP sintasa).....	26
Justificación	27
Hipótesis	27
Objetivo General	28
Objetivo Particulares	28



Metodología.....	29
Cultivo de células de cáncer cervicouterino CALO e INBL.....	30
Proliferación.....	30
Extracción de ARN mensajero.....	30
Cuantificación de ARN.....	31
Retotranscripción RT.....	32
Reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	33
Electroforesis.....	35
Resultados.....	37
Discusión de Resultados.....	46
Conclusiones	53
Perspectivas.....	55
Bibliografía.....	56
Anexos.....	64



Lista de abreviaturas

- **ADN:** Acido desoxirribonucleico.
- **ADNc:** Acido desoxirribonucleico complementario
- **AIF:** Factor inductor de apoptosis.
- **APAF-1:** Factor de activación 1 de las proteasas apoptóticas.
- **Apoptosoma:** complejo oligomérico formado por Apaf 1-citocromo c y procaspasa 9
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ARNr:** Ácido ribonucleico ribosomal.
- **ATP:** Adenosin trifosfato.
- **Ca⁺²:** Calcio.
- **CaCu:** Cáncer cérvico uterino.
- **COX I:** Complejo mitocondrial 1.
- **COX II:** Complejo mitocondrial 2.
- **COX III:** Complejo mitocondrial 3.
- **COX IV:** Complejo mitocondrial 4.
- **dNTPs:** Desoxinucleótido trifosfato.
- **IL-2:** Interleucina 2
- **IL-2R:** Receptor De Interleucina-2
- **IL-2r:** Interleucina-2 recombinante
- **KD:** Kilo Daltones
- **ml:** Mililitro
- **MPT:** Permeabilización Transicional Mitocondrial
- **NK:** Células naturales asesinas
- **nm:** Nanómetros
- **P.B.:** Pares de bases
- **PBS:** Tampón fosfato
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- **PPMT:** Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.
- **ROS:** Especies reactivas del Oxígeno.
- **RT:** Retrotranscripción.



- **RX:** Reacción
- **SFB:** Suero Fetal bobino
- **SMAC:** Segundo Activador Mitocondrial De Caspasas
- **TBE:** Tris borato EDTA.
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral
- **TNFR:** Receptor para el factor de necrosis tumoral
- **UI:** Unidades Internacionales
- **VPH:** Virus de papiloma humano.
- **$\Delta\Psi_m$:** Potencial mitocondrial.
- **μg :** Microgramo
- **μl :** Microlitro



<u>Lista de figuras</u>	<u>Página</u>
Figura 1: Cambios críticos que causan cáncer en las células	13
Figura 2: Vías apoptóticas.....	19
Figura 3: Cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	22
Figura 4: Integridad del ARN en líneas celulares de CaCU.	39
Figura 5. Productos de amplificación para β -actina	41
Figura 6. Productos de amplificación para COX III en células INBL.....	42
Figura 7. Productos de amplificación para COX III en células CALO.....	43
Figura 8. Comparación de COX III en las línea CALO e INBL en ausencia de IL-2.....	44
Figura 9. Comparación de COX III en las línea CALO e INBL en presencia de IL-2.....	45



RESUMEN.



El cáncer cervicouterino (CaCU) a nivel mundial es una de las enfermedades que más afectan a las mujeres en edad productiva y reproductiva. De acuerdo con estimaciones recientes, genera una incidencia global anual de 493 243 nuevos casos, de los cuales 27 505 fallecen cada año como consecuencia de este padecimiento. Fuente Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2012

El CaCU ocupa el segundo lugar en incidencia mundial después del cáncer de mama. En México se tiene una de las tasas más elevadas de mortalidad por CaCU, el cual representa la principal causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres mayores de 25 años. Fuente INEGI 2007

Actualmente, la Inmunoterapia representa una alternativa terapéutica contra el cáncer, con algunas ventajas sobre la terapia convencional, tales como la especificidad, la activación del sistema inmune y los casi nulos efectos secundarios. En esta terapia se utilizan diversas citocinas como interleucina-2 recombinante (IL-2r) que estimula células NK, y linfocitos T para inducir una respuesta citotóxica de rechazo tumoral.

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en diversos proyectos que tienen como objetivo principal desarrollar alternativas terapéuticas para las pacientes con cáncer cérvico uterino empleando IL-2. Datos previos nos indican que IL-2 regula la proliferación de las líneas de cáncer cervicouterino CALO e INBL de manera dosis dependiente, donde 100 UI/ml inhiben su proliferación y finalmente lleva a apoptosis a las células de cáncer cervicouterino.

Al respecto, sabemos que IL-2 regula la expresión del mensajero de diversas proteínas implicadas en el proceso de apoptosis tal es caso de algunas caspasas y de miembros de la cadena respiratoria mitocondrial como son los complejos COX I, COX IV y citocromo c.

Por lo antes mencionado en este trabajo se estudió el efecto de 100UI/mL de IL-2, sobre la expresión del ARNm de COX III, en dos líneas celulares de CaCU, en donde para la línea celular CALO no se observa cambio en la expresión del mensajero para COX III, mientras que para la línea celular INBL se ve una regulación a la baja de este complejo, demostrando que IL-2 puede llevar a cabo la regulación de este complejo, en particular para citocromo c₁ del COX III, que colocan a IL-2 como un posible agente terapéutico para carcinoma de cérvix.



MARCO TEÓRICO.



El Ciclo Celular

El ciclo celular está constituido por una serie ordenada de acontecimientos macromoleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre. La regulación del ciclo celular es fundamental para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y la pérdida de control termina por conducir al cáncer, una enfermedad que mata a una de cada seis personas en el mundo que la desarrolla (Lodish et al 2005).

El ciclo celular se divide en cuatro fases. Durante dos de ellas las células ejecutan los eventos fundamentales de la división celular: la generación de una copia fiel de su material genético (la fase de síntesis o S) y la partición de todos los componentes celulares entre las dos células hijas (mitosis o fase M).

Las otras dos fases del ciclo, G1 y G2, representan períodos de espera (del inglés “gap”) durante los cuales las células se preparan para completar con éxito las fases S y M, respectivamente. Cuando las células cesan de proliferar, ya sea debido a señales antimitogénicas o por la ausencia de señales mitogénicas, entran en el estado de no división quiescente, que se conoce como G0 (Lukas and Bartek, 2004).

De modo de asegurar la progresión a través del ciclo, las células han desarrollado una serie de puntos de control que evitan el pasaje a una nueva fase del ciclo antes que la anterior haya sido completada exitosamente (Kastan and Bartek, 2004; Lukas et al., 2004; Martin, 2003).

Es probable, también, que las células quiescentes deban pasar ciertos puntos de control antes que puedan entrar al ciclo. Por ejemplo, las células deben asegurarse que hayan llegado a su tamaño homeostático y adquirido la masa proteica necesaria ya que, de lo contrario, serán cada vez más pequeñas con cada ronda del ciclo celular. (Radimerski et al., 2002; Wullschleger et al., 2006).

Las moléculas centrales en el mecanismo de control del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas constituyen un grupo de serina/treonina quinasas que forman complejos heterodiméricos activos al unirse a sus subunidades regulatorias, las ciclinas.



Varias CDKs, principalmente CDK4, CDK6, CDK2, actúan en forma cooperativa para conducir las células hacia la fase S, a través de la fase G1. Las CDK4 y CDK6 están involucradas en el pasaje durante G1 temprano, mientras que CDK2 es requerida para completar G1 e iniciar la fase S.

Las primeras (CDK4 y CDK6) forman complejos activos sólo con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) y están, desde un punto de vista estructural, estrechamente relacionados y son funcionalmente indiferenciables. Por su parte, la CDK2 es activada secuencialmente por las ciclinas de tipo E (E1 y E2), durante la transición entre las fases G1 y S, y por las ciclinas A (A1 y A2) durante la fase S (Murray, 2004; Sandal, 2002) .

Las CDK pueden ser reguladas positivamente a través de su unión con las ciclinas, pero también negativamente por medio de su interacción con los inhibidores de CDK (CKI) (Sherr and Roberts, 1999).

El análisis genético y molecular de neoplasias desarrolladas en seres humanos demuestra que, en la gran mayoría de ellos, se encuentran mutaciones o alteraciones en la expresión de genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular (Shapiro, 2006).

Cáncer

El cáncer representa un grupo de enfermedades caracterizadas por la multiplicación incontrolada y anárquica de ciertas células en el organismo evitando las reacciones que regulan la progresión del ciclo celular, pueden adquirir la propiedad de colonizar otros tejidos a través de los vasos linfáticos o sanguíneos.

Presentan anomalías de estructura y comportamiento, según el tipo de célula afectada que pueden variar con la evolución de la enfermedad: el núcleo se hipertrofia, la célula entera puede agrandarse, las divisiones celulares tiene un desarrollo anormal y generalmente más rápido (Hanahan y Weinberg 2000).

Dentro de las características fundamentales de las células cancerosas implica una capacidad de proliferación descontrolada, una capacidad de inducción y mantenimiento de las señales estimuladoras del crecimiento, evasión de señales antiproliferativas; muchos de estas dependen de la acción de los genes supresores de tumores.



Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función supresora de tumores de P53, lo que elimina este sensor de daño crítico y de inducción de apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr resultados similares por el aumento de la expresión de los reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL) o de señales de supervivencia (Igf1 / 2), por la regulación negativa de los factores pro-apoptóticos [Bax, Bim, Puma] (Hanahan y Weinberg 2011).

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como una capacidad de eliminar los desechos metabólicos y dióxido de carbono. Durante la progresión tumoral, un “interruptor angiogénico” es casi siempre activado y permanece encendido, estimulando la vascularización normalmente quiescente para crear continuamente nuevos vasos que ayudan a sostener la expansión de crecimientos neoplásicos (Hanahan y Folkman, 1996). Algunos de estos inductores e inhibidores de la angiogénesis son factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente (Baeriswyl y Christofori de 2009, Berger y Benjamin, 2003).

Además de estas características, las células cancerosas tienen un potencial de invasión a otros tejidos o metástasis, esta descripción contempla una sucesión de cambios, a partir de la invasión local, y luego invasión por las células cancerosas en las inmediaciones vasos sanguíneos y linfáticos, el tránsito de las células cancerosas a través del sistema linfático y hematógenas, seguido por el escape de las células cancerosas de los lúmenes de tales buques en el parénquima de los tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y, finalmente, el crecimiento de las lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denominan “colonización” (Talmadge y Fidler, 2010; Fidler, 2003).

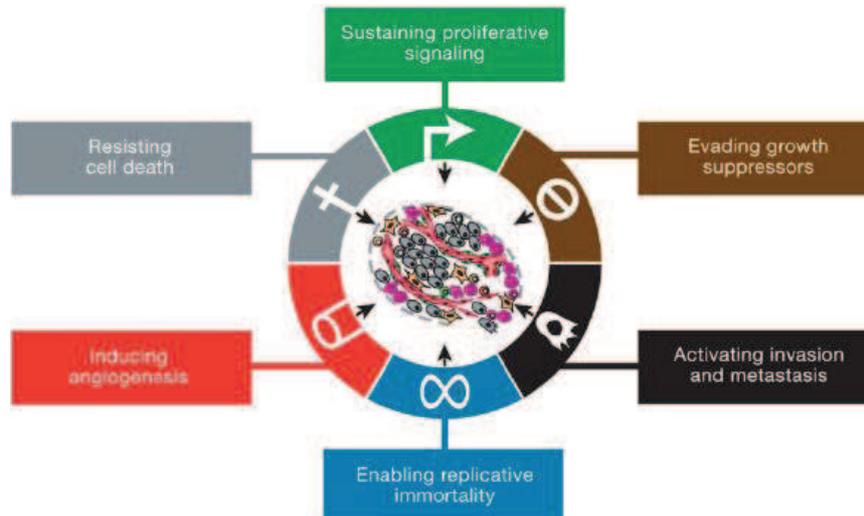


Figura 1. Resumen Generalidades de los cambios en las células que causan cáncer. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011

Cáncer Cervicouterino

El Cáncer Cervicouterino (CaCu) es una mutación celular de la unión escamo-columnar en el epitelio del cuello uterino. Se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, producidas en etapas de displasia leve, moderada y severa; evolucionan a cáncer in situ, en grado variable, cuando ésta se circunscribe a la superficie epitelial, luego a microinvasor y posteriormente a invasor cuando el compromiso traspasa la membrana basal (Ministerio de Salud, 2004).

En el CaCu se reconocen dos tipos histológicos: el cáncer epidermoide, que se presenta en el epitelio escamoso (95%) y el adenocarcinoma en el epitelio glandular (5%). En un menor porcentaje se presenta el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas (Secretaría de Salud, 2007)

Los principales factores de riesgo para desarrollar CaCu son: uso de anticonceptivos hormonales, hábito de fumar, conducta sexual, acceso limitado a los servicios de salud, infecciones virales (VIH, Herpes, VPH, infecciones genitales en general). Casi todos (99,8%) los casos de CaCu se deben a tipos específicos de virus del papiloma humano (VPH), principalmente los tipos VPH-16 y VPH-18 de los 100 tipos que se conocen, pero no todos se convierten en cáncer, ocasionando verrugas o condiloma (López -Saavedra y Lizano-Soberón 2006).



Inmunoterapia e IL-2

En los últimos años ha resurgido el interés por afrontar el tratamiento y prevención del cáncer desde el punto de vista inmunológico, es decir, el estudio de los mecanismos de defensa del organismo que participan de manera importante en el control de las neoplasias.

La inmunoterapia representa actualmente una alternativa para el tratamiento del cáncer, con algunas ventajas sobre la terapia convencional, como son la especificidad y ausencia de efectos secundarios en la mayoría de los casos.

La Interleucina-2 (IL-2) es una glucoproteína de 15.4 KD que está plegada, formando una proteína globular que consta de cuatro hélices α . Representa el prototipo de las citocinas de cuatro hélices α que interaccionan con los receptores de citocinas tipo I (Aguzzi 2005)

La IL-2 fué llamada originalmente "factor de crecimiento de células T" (TCGF), siendo la principal citocina responsable de la progresión de linfocitos T de la fase G1 a la S del ciclo celular. Es producido por células T CD4+ y en menor cantidad por células T CD8+.

La IL-2 actúa en las mismas células que la producen, por lo tanto, funciona como un factor de crecimiento autócrino. La IL-2 también actúa en linfocitos T periféricos, incluyendo a células CD4+ y CD8+, y es por lo tanto un factor de crecimiento parácrino. Durante la respuesta inmune, la IL-2 no circula en sangre, sino que actúa a distancia, por lo tanto, no puede ser considerado como un factor de crecimiento endocrino. (Gutierrez 1997, Guzmán et al, 2004).

Estimula el crecimiento y la diferenciación de las células T, las células B, células NK, células LAK, monocitos, macrófagos y oligodendrocitos (Leung 2013).

En el grupo de trabajo del laboratorio de Oncología Celular de la FES-Zaragoza, se demostró la presencia de las cadenas alfa, beta y gamma del receptor para IL-2 (IL-2R) en las líneas celulares de CaCU, CALO e INBL. Además hemos reportado que el IL-2R es activado por la IL-2 exógena. También, contamos con datos que indican que el receptor tiene expresión diferencial en tumores de CaCU de acuerdo al estadio. Al igual se ha demostrado que la aplicación de IL-2 estimula la actividad citotóxica de linfocitos T contra este tumor (Alvarado 1997 y Rangel et al, 1998).



Se ha reportado que dependiendo de la dosis de IL-2 administrada en cultivos de las líneas celulares de CaCU podemos inducir la proliferación a dosis bajas (10UI/ml) de IL-2 mientras que en presencia de altas dosis de IL-2 (100UI/ml) se induce a su inhibición. Estos datos sugieren la dependencia de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL por IL-2.

Así mismo hay evidencias en las líneas celulares de CaCU CALO e INBL en presencia de 100UI/mL de IL-2 pueden llegar a presentar muerte celular (Del Rio Ortiz 2011, Sierra Mondragón 2011, Trujillo 2012).

Apoptosis

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos.

Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte.

La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada (Lizarbe 2007).

La apoptosis es un término descriptivo que define un tipo de muerte celular con diversas características morfológicas. Apoptosis proviene del griego y significa la caída otoñal de hojas y pétalos (Homero).

La apoptosis es un proceso destinado a eliminar células senescentes o dañadas genéticamente, con efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos (Martínez 2009).



Para el estudio del proceso apoptótico existen dos vías de señalización una vía extrínseca o por receptores de muerte y una vía intrínseca o mitocondrial.

Vía extrínseca

El término “apoptosis extrínseca” se ha utilizado ampliamente para indicar los casos de muerte celular apoptótica que son inducidos por señales de estrés extracelulares que se detectan y se propaga por receptores transmembranales específicos (Mehlen et al 2011 y Galluzzi et al 2011).

La apoptosis extrínseca puede ser iniciada por la unión de ligandos letales, tales como FAS / ligando de CD95 (FASL/CD95L), la superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y TNF (ligando), miembro 10 (TNFSF10, mejor conocido como ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF, TRAIL), a varios receptores de muerte (es decir, Fas/CD95, receptores de TNF α 1 (TNFR1) y del receptor de TRAIL (TRAILR) 1-2, respectivamente).

Una vía de señalización que conduce a la apoptosis extrínseca se produce con FAS ligando. En la ausencia de FASL, las subunidades FAS espontáneamente se ensamblan en la membrana plasmática para generar trímeros, debido al llamado del dominio de montaje del pre-ligando (PLAD) (Galluzzi et al 2011).

La unión del ligando estabiliza los trímeros, mientras que la inducción de un cambio conformacional que permite el montaje de un complejo dinámico multiproteico en la cola citosólica del receptor. Esto se produce debido a una secuencia conservada de 80 residuos que es compartido por todos los receptores de muerte, el llamado “dominio de muerte” (DD) (Schulze-Osthoff et al 1998).

Las proteínas reclutados en el DD de FAS incluyen la proteína del receptor de quinasa que interacciona 1 (RIPK1, mejor conocido como RIP1); la proteína FAS asociada a un DD (FADD); múltiples isoformas de c-FLIP; inhibidor celular de las proteínas de apoptosis (cIAPs), ubiquitina ligasas E3 que también inhiben la apoptosis debido a su capacidad de interferir con la activación de caspasas; y procaspasa 8 o 10 (Galluzzi et al 2011).



El complejo supramolecular resultante, que se ha denominado “complejo de señalización de muerte” (DISC), constituye una plataforma que regula la activación de la caspasa 8 o 10. Proteínas como TNFR1 también requieren al dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD) para el reclutamiento de FADD y la caspasa 8, mientras que FAS y TRAIL R1/2 no lo hacen, esto apunta a la existencia de subgrupos de receptores de muerte con propiedades de señalización específicas Galluzzi et al 2011).

En algunos tipos de células incluyendo linfocitos (que se han denominado células de tipo I), se activan la caspasa 8 que cataliza directamente la maduración proteolítica de la caspasa 3, iniciando así la fase de ejecución de la apoptosis dependiente de caspasa en una manera independiente de mitocondria. En otras células, tales como hepatocitos y células b pancreáticas (células de tipo II), (Luo et al 1998) caspasa 8 media la escisión proteolítica de BH3 interacción agonista de dominio de muerte (BID), que conducen a la generación de un fragmento de permeabilización mitocondrial (conocido como BID truncado, tBID) (Luo et al 1998).

Por lo tanto, mientras que las “células de tipo I” se someten a la apoptosis extrínseca independientemente de toda contribución de las mitocondrias (tBID y MOMP pueden ocurrir en estas células, pero que son prescindibles para la ejecución de la apoptosis extrínseca), las células de tipo II sucumben a partir de la activación de receptores de muerte, mientras que muestra signos de permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), incluyendo la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la liberación de proteínas tóxicas que normalmente se mantiene dentro del espacio intermembranal mitocondrial (Kroemer et al 2007).

Vía intrínseca o mitocondrial

La muerte apoptótica de las células puede ser provocada por una variedad de condiciones de estrés intracelular, incluyendo daño en el ADN, el estrés oxidativo, la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, excitotoxicidad leve (relacionada con la sobre estimulación del receptor glutamato en el sistema nervioso), entre muchos otros.



A pesar de las cascadas de señalización que activan la apoptosis intrínseca son muy heterogéneas en lo que se refiere a los estímulos que inician, todos ellos están conectados a un mecanismo de control centrado en la mitocondria (Kroemer et al 2007).

Frecuentemente, junto con la propagación de la cascada de señalización pro-apoptótica, mecanismos anti-apoptóticos también están involucrados, en un intento de permitir que las células hagan frente al estrés. En este escenario, ambas señales pro y antiapoptóticas convergen en las membranas mitocondriales, que se permeabilizan cuando el primero predomina sobre la segunda (Kroemer et al 2007).

La permeabilización de la membrana mitocondrial, puede comenzar en la membrana mitocondrial externa, debido a la actividad formadora de poros de los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas BCL-2, tales como BAK y BAX o puede ser resultado de un fenómeno (llamado transición de permeabilidad mitocondrial, MPT) que se origina en la membrana mitocondrial interna debido a la apertura de un complejo multiproteico conocido como el complejo de poro de transición de permeabilidad (PTPC) (Tait 2010 y Brenner 2006).

La permeabilización irreversible de la membrana mitocondrial externa afecta a la mayoría de las mitocondrias dentro de la célula y tiene múltiples consecuencias letales: (1) la disipación del $\Delta\Psi_m$, con el cese de la síntesis de ATP mitocondrial y las actividades de transporte dependientes de $\Delta\Psi_m$; (2) la liberación de proteínas tóxicas del espacio intermembranal mitocondrial (IMS) en el citosol, ya que esto se aplica a cit c, factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G (EndoG), proteína de unión directa a IAP con bajo pI (DIABLO, también conocido como segundo activador mitocondrial de caspasas, SMAC) y alta temperatura requisito de la proteína A2 (HtrA2), y (3) la inhibición de la cadena respiratoria (favorecida por la pérdida de cit c), provoca o agrava la sobreproducción de ROS y por lo tanto la activación de un circuito de alimentación hacia adelante para la amplificación de la señal apoptótica (Kroemer et al 2007).

Por lo tanto, la apoptosis intrínseca resulta de una catástrofe bioenergética y metabólica acoplada a la activación de múltiples mecanismos ejecutores. Al permeabilizar la membrana mitocondrial externa, el citocromo c citosólico (cit c) participa con APAF1 y

dATP en la formación del apoptosoma, que desencadena la cascada proteolítica de caspasa 9 y caspasa 3 proteolítica (Li et al 1997 y Galluzzi et al 2011).

En síntesis las vías de señalización pueden involucrar interacciones mediadas por receptores transmembranales o por una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, pero ambas vías activan caspasas iniciadoras 8, 9 y 10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico con características fisiológicas y morfológicas tales como encogimiento celular, membrana celular intacta, el citoplasma es retenido en cuerpos apoptóticos, condensación de cromatina (Picnosis) Martínez 2009. Figura 2

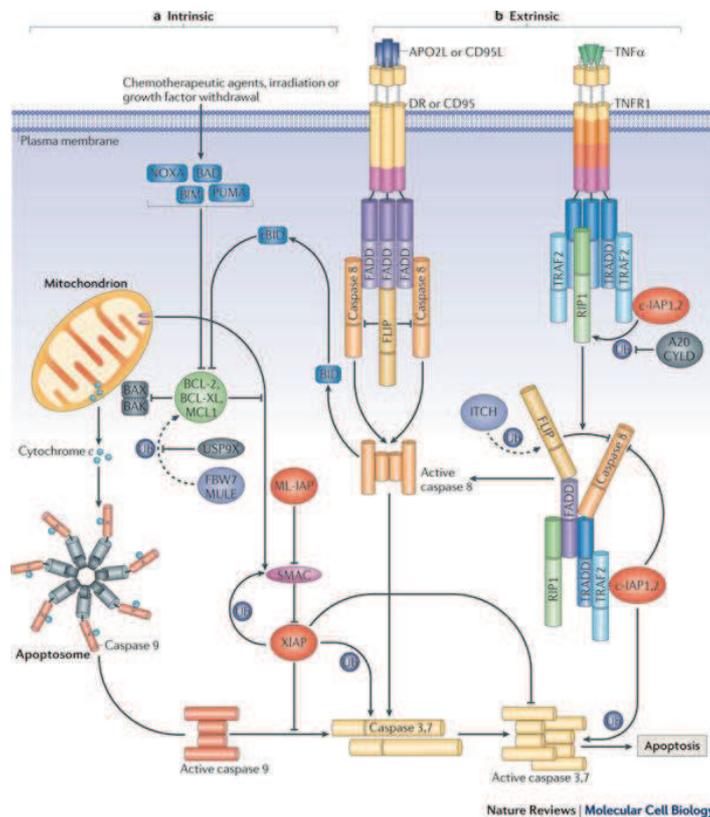


Figura 2. La apoptosis puede ser iniciado por dos vías alternativas: a través de receptores de muerte de la superficie celular (vía extrínseca) o a través de las mitocondrias (vía intrínseca). En ambas vías, la inducción de la apoptosis conduce a la activación de una caspasa iniciadora: la caspasa-8 y, posiblemente, la caspasa-10 para la vía extrínseca, y la caspasa-9, que se activa en el apoptosoma, para la vía intrínseca. Las caspasas iniciadoras activan a caspasas efectoras que desencadenan el proceso apoptótico. Nature 2011



La mitocondria

Las mitocondrias son organelos que están rodeadas por dos membranas, que difieren entre sí en muchos aspectos. La membrana externa es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, gracias a que contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas, que permiten el paso de estas moléculas a su través; realiza relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte. La membrana interna, por su parte, carece de poros, por lo que es impermeable para la mayoría de las moléculas, especialmente las que tienen carga; contiene muchos sistemas de transporte transmembrana, que están implicados en la translocación de moléculas; además, su área de superficie es mucho mayor de lo necesario para contener el material dentro de la mitocondria, pero se encuentra intrincadamente plegada (Caro 2009).

Las mitocondrias tienen diversas funciones, llevan un papel central tanto en la homeostasis celular y patologías, pueden desencadenar o amplificar las señales que conducen a la muerte celular (via intrínseca).

Sin embargo, la principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, β -oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones; el ATP producido en la mitocondria supone un porcentaje muy alto del ATP sintetizado por la célula (Assuncao 2004).

El número de mitocondrias por célula varía en función del tipo celular; los extremos son los eritrocitos, que carecen de mitocondrias, mientras que los óvulos contienen cerca de 100.000. La mayoría de las células humanas contienen entre unos pocos de cientos y unos pocos de miles de mitocondrias (Grey, 1999).

La mayoría de los componentes celulares, incluyendo las mitocondrias, requieren un reciclaje continuo y regeneración a lo largo de la vida. Las mitocondrias, que son la principal maquinaria bioenergética y fuente de estrés oxidativo en las células, son particularmente susceptibles al daño a lo largo del tiempo. El control efectivo de la biogénesis y del recambio mitocondrial es, por tanto, crítico para el mantenimiento de la producción energética, la prevención del estrés oxidativo endógeno y la promoción del envejecimiento saludable (Lopez-Lluch et al., 2008).



Al respecto, cuando la permeabilización transicional mitocondrial (MPT) se da sólo en unas pocas mitocondrias, la autofagia se activa, lo que lleva a la degradación lisosomal de los orgánulos afectados y el cese de las señales que estimulan la autofagia.

Cuando un mayor número de mitocondrias son permeabilizadas ocurre la apoptosis, probablemente debido a la mayor concentración de moléculas como el citocromo C y AIF en el citoplasma. Y finalmente, cuando casi todas las mitocondrias en las células se ven afectadas, MPT promueve la necrosis, que se atribuye a la desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la hidrólisis de ATP acelera la ATPasa mitocondrial (Assuncao 2004).

La complejidad de la regulación de la biogénesis mitocondrial no puede subestimarse; implica cambios en la expresión de más de 1000 genes, la cooperación de 2 genomas, altera el nivel de aproximadamente el 20% de las proteínas celulares (Caro 2009).

Cadena de transporte de electrones mitocondrial

El aislamiento de proteínas mitocondriales con propiedades específicas de transferencia de electrones, proporcionó el concepto de “complejos” de la cadena respiratoria (Green and Vande Zande, 1982). En los años 1950s, usando técnicas espectrofotométricas, describieron los niveles de reducción-oxidación de los componentes de la cadena respiratoria en la transición que sigue la adición de ADP, e identificaron los sitios que son termodinámica y cinéticamente compatibles con la transducción energética (Chance and Williams, 1956).

La cadena respiratoria consiste en una serie de transportadores electrónicos que funcionan como pares redox y que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Así, está formada por cuatro complejos multiproteicos (complejos I-IV). La coenzima Q y el citocromo c también participan en el transporte de electrones entre los complejos.

Bien formando parte de los complejos o bien fuera de ellos, las diferentes moléculas transportadoras de electrones son citocromos, centros hierro-sulfurados, quinonas y flavinas. La secuencia de transporte electrónico se inicia cuando los equivalentes metabólicos NADH y FADH₂, generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ceden electrones al complejo I y al complejo II, respectivamente (Figura 3).

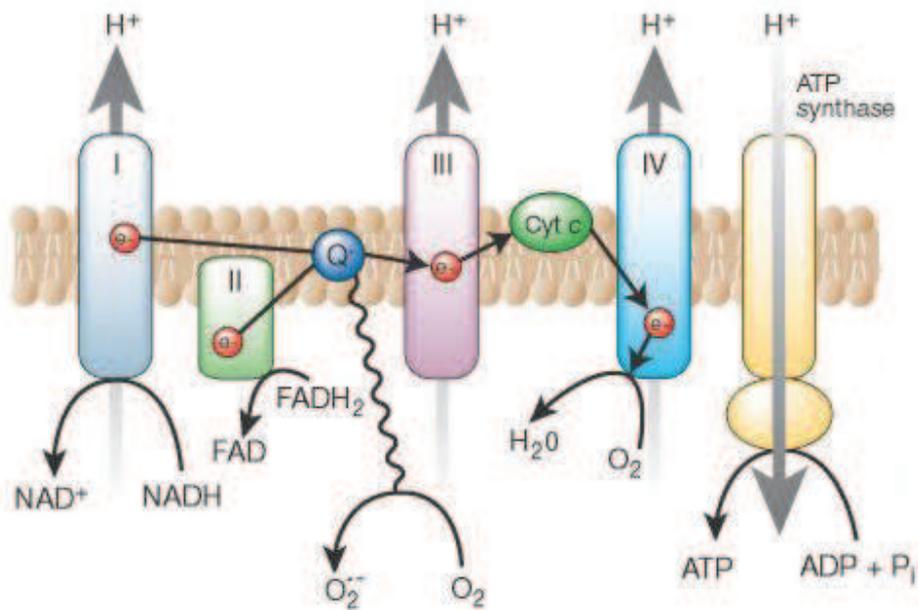


Figura 3. Descripción general de los complejos multiproteicos y portadores móviles asociados en la cadena respiratoria. Q= coenzima Q, Cyt c = citocromo C

Complejo I (COX I, NADH Deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa). De las 46 cadenas polipeptídicas que lo constituyen, 7 están codificadas por el ADN mitocondrial y el resto por el nuclear (Carroll et al., 2005). Los transportadores de electrones en este complejo son flavinas, centros hierrosulfurados y ubiquinonas. En conjunto, este complejo es el componente más grande de la cadena respiratoria, con cerca de 800-900 KDa; tiene forma de L, con el brazo largo como una proteína de membrana integral hidrofóbica, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones, y el brazo corto constituido por un dominio globular hidrofílico situado en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina y 9 centros hierro-sulfurados (Sazanov y Hinchliffe, 2006).

Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el dominio de membrana donde se encuentran las quinonas. Así, la flavina acepta dos electrones simultáneamente del NADH y los transfiere, uno a uno, a los centros hierrosulfurados.



Estos, a su vez, reducen la quinona, embebida en la membrana, a quinol, en dos pasos sucesivos de un solo electrón (Sazanov y Hinchliffe, 2006). Esta transferencia electrónica está acoplada al bombeo de cerca de cuatro protones a través de la membrana, ayudando a proporcionar la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP (Yagi y Matsuno-Yagi, 2003). Este proceso supone cerca del 40% del gradiente de protones transmembrana generado en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria mitocondrial (Hinchliffe and Sazanov, 2005). Existen varios inhibidores que pueden bloquear el flujo de electrones a través de los diferentes transportadores del complejo (Herrero and Barja, 2000); de todos ellos cabe destacar la rotenona⁸, que actúa bloqueando la transferencia de equivalentes de reducción desde los centros hierro-sulfurados hasta la ubiquinona, posiblemente actuando como análogo de la misma.

Complejo II (COX II Succinato Deshidrogenasa o Succinato-Ubiquinona Reductasa).

Es el único complejo codificado íntegramente en el ADN nuclear. Dos de las cuatro subunidades proteicas que lo componen conforman la enzima succinato deshidrogenasa, componente clave en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras que las otras dos se encargan del anclaje de dicha enzima a la membrana. En su participación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos interviene en la transferencia de electrones desde el succinato hasta el FAD, formando FADH₂, mientras que en su papel dentro de la cadena de transporte electrónico transfiere los electrones del FADH₂ a la ubiquinona (Cecchini et al., 2003).

Carece de sitio de acoplamiento energético. A diferencia del NAD⁺ que difunde libre en la matriz mitocondrial, el FAD no existe libre en disolución; por ello el complejo II contiene una molécula de FAD. La tenoiltrifluoroacetona (TTFA) bloquea la transferencia de electrones a través del complejo II posiblemente mediante interacciones débiles con el hierro del último componente del complejo, un centro hierro-sulfurado (Tyler, 1992). También a través de los equivalentes de reducción entrantes vía complejo II, se produce un flujo reverso de electrones hacia el complejo I.



Coenzima Q. Es una benzoquinona soluble en lípidos con una larga cadena lateral isoprenoide que difunde lateralmente en la membrana mitocondrial interna y que está adaptada al transporte electrónico entre las proteínas de membrana (Hinchliffe y Sazanov, 2005).

Existen tres isoformas diferentes de esta quinona: ubiquinona o coenzima Q, semiquinona o coenzima Q y ubiquinol o coenzima QH₂. La semiquinona es uno de los componentes de la cadena de transporte electrónica más propensos a ceder su electrón desapareado al oxígeno generando así radicales superóxido, y está presente de forma transitoria cuando se encuentra formando parte de los complejos I y III (Mitchell, 1975), especialmente en este último durante el ciclo Q (Brandt, 1997). En la membrana mitocondrial interna se presenta constituyendo un pool ubiquinona-ubiquinol que actúa como lanzadera de electrones desde los complejos I y II al complejo III.

Complejo III (COX III, Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa o Complejo citocromo bc₁).

Se trata de una estructura dimérica donde cada monómero está constituido por diez subunidades proteicas diferentes insertadas en, o unidas a la membrana mitocondrial interna. Tres de estas subunidades, un centro hierro-sulfurado (centro Rieske) y los citocromos c₁ y b, contienen centros redox y participan en la transferencia de electrones. Todos los elementos del complejo III están codificados por el ADN nuclear excepto el citocromo b, que lo está por el mitocondrial (Zara et al., 2009).

Además, dentro del complejo III se ha propuesto un ciclo de transporte de electrones, denominado ciclo Q, donde coexisten distintas formas de la ubiquinona. Los detalles del proceso de transporte electrónico son complejos: el ubiquinol cede dos electrones, uno al centro Rieske que lo cede a su vez a un citocromo c para actuar como transportador hacia el complejo IV, mientras que el otro es reciclado a través del ciclo Q vía citocromos b₅₆₆ y b₅₆₀ y de semiquinonas (Trumpower, 1990). Este ciclo permite el bombeo de protones al citosol. El flujo de electrones en el complejo III puede ser bloqueado, entre otros, por los inhibidores antimicina A, ilicicolina H y funiculosina, que actúan en el sitio de reducción de la quinona (Rotsaert et al., 2008).



En la cadena respiratoria, los diferentes tipos de deshidrogenasas reducen una fracción del pool de ubiquinona a ubiquinol mitocondrial, lo que, a su vez, se oxida por el complejo III en el sitio Qo (o Qp) (fig. 1A). Entonces, el complejo III oxida al ubiquinol en la fase de membrana y reduce el citocromo c en la superficie externa de la membrana interna, produciendo una semi-quinona, que se oxida adicionalmente por especies de citocromo b, un proceso conocido como el ciclo de Q (Crofts 2004).

Complejo III utiliza la energía liberada por translocación vectorial de dos protones (H^+ / QH_2) de la matriz al espacio intermembrana, donde libera dos protones adicionales (Zhang et al 1998). Como se mencionó anteriormente, las formas semi-reducida de ubiquinona participan en la transferencia de electrones / protones catalizada por el complejo III. Estas semi-quinonas son particularmente propensas a la auto-oxidación, que produce superóxido (como no reduce citocromo b) (Ernster et al 1995 y Forquer et al 2006). En consecuencia, se reduce el complejo III que es uno de los principales sitios de producción de superóxido en la cadena respiratoria (Mullert et al 2004).

Complejo IV (COX IV o Citocromo c oxidasa). En este complejo, último en la cadena de transporte electrónico, se produce la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua. Al igual que ocurre en los complejos I y III, la citocromo c oxidasa genera un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana asociado al transporte electrónico.

Esta enzima, la citocromo c oxidasa, está ampliamente distribuida en la naturaleza; se cree que es la responsable del consumo de más del 90% del oxígeno en los animales aerobios. Presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que se piensa que está adaptada a condiciones de escasez del mismo. Las unidades catalíticas del complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear (Tyler, 1992).

Los transportadores electrónicos y los complejos están organizados en “ensamblajes” con interacciones específicas proteína-proteína, que son efectivas para la transferencia rápida de electrones gracias a la limitación de las distancias intermoleculares entre ellas (Chance y Williams, 1956).



Complejo V (COX V, ATP sintasa o F₁-F₀-ATPasa)

La ATP sintasa es el quinto complejo de la fosforilación oxidativa. Cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, utilizando el gradiente de protones generado a través de la membrana mitocondrial interna, por la cadena de transporte electrónico. El complejo está formado por dos dominios funcionales, F₁ y F₀, los cuales están conectados entre sí por otra subunidad. La estructura de la subunidad hidrofílica F₁ fue resuelta en el año 1994 y está formada por cinco subunidades (a, b, d, g, e) (Abrahams JP, 1994). En la subunidad que conecta los dos dominios funcionales y en F₀, se encuentran las dos únicas subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (ATPasa 6 y ATPasa 8).

La subunidad F₀ está inmersa en la membrana mitocondrial interna y funciona como un poro de protones, transfiriendo la energía liberada por el flujo de protones hacia la subunidad catalítica F₁, donde se forma el ATP. Se acepta un mecanismo del tipo motor rotatorio como forma a través de la cual la energía es transferida desde la bomba de protones (subunidad F₀) a la subunidad catalítica (subunidad F₁) (Stock D, 1999).



Justificación

En México el Cáncer Cérvico Uterino (CaCu), ocupa el segundo lugar de incidencia entre los tumores malignos en la población femenina, razón por lo cual, se buscan alternativas terapéuticas para combatirlo. Nuestro grupo de investigación, en el Laboratorio de Oncología Celular, se ha dado a la tarea de estudiar el papel que ejerce la IL-2 sobre la regulación de genes proapoptóticos de células de CaCu, CALO e INBL. Se ha confirmado que 100 UI/ml de esta citocina tiene un efecto inhibitor sobre la proliferación e induce a muerte celular vía apoptótica mediante la regulación de diversos genes mitocondriales como es el caso de los componentes de la cadena respiratoria. Sin embargo, se sabe poco de los procesos moleculares que están siendo regulados por IL-2. Por esta razón, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si la expresión del gen para COX III, (componente de la cadena respiratoria mitocondrial) está regulada por IL-2.

Hipótesis

Se ha confirmado que 100UI/ml de IL-2 inhibe la proliferación de células de las líneas de Cáncer Cérvico Uterino CALO e INBL y las induce a muerte celular vía apoptótica, mediante la liberación del Citocromo C y la regulación de algunos complejos de la cadena respiratoria. Por lo cual si tratamos a las células con esta citocina podremos observar la regulación de la expresión del complejo COX III en estas células.



Objetivo General

- Determinar la expresión del complejo mitocondrial COX III en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2.

Objetivo Particulares

Obtener cultivos de líneas celulares derivada de CaCu (CALO e INBL). En presencia y ausencia de IL-2.

Extraer y purificar ARNm de las líneas celulares CALO e INBL

Realizar la técnica de RT-PCR

Realizar Electroforesis de las muestras amplificadas



METODOLOGÍA.



- **Cultivo Celular**

El Material biológico consistió en las líneas celulares de CaCu CALO e INBL (Tabla 1) que fueron obtenidas del banco de criopreservación de la UMIE-Z en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Línea Celular	Estadio	HPV Previo
CALO	II B	18
INBL	IV B	18

Características de las líneas celulares de CaCU (CALO e INBL).

- **Proliferación**

Las líneas celulares CALO e INBL se cultivaron en cajas de cultivo de 25cm³ con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (MICROLAB) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) en una incubadora (SANYO) a una atmosfera de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. Se cultivaron hasta que la caja de cultivo estuviera a una capacidad del 75% para posteriormente resemebrarlas en nuevas cajas de cultivo para nuestros experimentos.

- **Extracción de ARN**

Se cultivo 1 millón de células de la línea celular CALO e INBL en cajas de cultivo de 25 cm² para los tiempos cortos y de 75 cm² para los tiempos largos, en medio de cultivo RPMI 1640 (MICROLAB) en ausencia de suero fetal bovino durante 24 horas para sincronizar a las células. Transcurrido el tiempo se les cambio el medio por medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y 100 UI de IL-2. Como control de los experimentos se utilizaron cultivos en ausencia de IL-2 de las mismas líneas.

Los cultivos se mantuvieron en la incubadora (SANYO) a una atmosfera de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C durante el tiempo correspondiente (2, 48 y 72 horas). Al pasar el tiempo de estimulo se recupero el medio y se despegaron las células con verseno. Se pasaron a un solo tubo y se centrifugaron, se decanta el medio y el verseno.

Se hizo un lavado con PBS y se resuspendieron nuevamente las células y se centrifugaron. Después se decanto el PBS asegurándose que el botón quedara lo más seco posible, posteriormente se le agrego 1ml de trizol (INVITROGEN) se resuspendio homogéneamente el botón. Se dejo reposar durante 15 minutos para que actuara el



trizol^(INVITROGEN). Se paso a un tubo eppendorf y se agrego 200 µl de cloroformo^(SIGMA). Vortexear de 3 a 5 minutos. Se reposo la muestra en hielo durante 3 minutos.

Se centrifugo a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C. La fase acuosa se recupero (zona superior transparente) y se coloco en un tubo nuevo donde se le agrego 500 µl de isopropanol^(SIGMA) se resuspendio y se dejo reposar 10 minutos en hielo posteriormente se centrifugo a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C.

Se mantuvo por 24 horas a -70°C en un ultra refrigerador^(REVCO). Pasado este tiempo, la muestra se descongelo y centrifugo a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. Se extrajo el isopropanol con pipeta y se le agrego 1 ml de etanol^(J.T BAKER) al 75% y se centrifugo a 7500 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. Posteriormente se decanto y se deja evaporar el etanol a temperatura ambiente.

Evaporado el etanol se rehidrato la muestra con 20 µl de agua libre de nucleasas^(FERMENTAS) resuspendiendo perfectamente para obtener un stock de cada tiempo determinado al igual que los controles y así obtuvimos nuestro stock y se guardo a -70°C en un ultra refrigerador^(REVCO).

- Cuantificación de ARN

Se preparo una dilución de cada una las muestras obtenidas de la extracción (4 µl de muestra + 196 µl de agua inyectable^(PISA)). Se cuantifico por biofotómetro^(EPPENDORF) colocando primero la muestra blanco y posteriormente las problema. Se realizo un cuadro colocando el espectro, relación 260/ 280, 260 (Absorbancia ideal para medir el ARN) y 280 respectivamente de cada muestra. Posteriormente se procedio al uso de una fórmula para obtener µg /ml:

$$\mu\text{g /ml} \frac{(abs\ 260)(volumen\ total)(densidad\ \acute{o}ptica)}{1000}$$

Donde: $V\ total = 200\mu\text{l}$ Densidad óptica = 40 µg /ml

Para llevar a cabo la retro-transcripción es necesario tener la concentración de 2µg/µl para cada muestra de ARNm. Teniendo los cálculos para todas las muestras, se prosiguió a realizar la RT.



- RT (Retrotranscriptasa Reversa)

Es un método que utiliza una enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena pero utilizando como molde ARN mono catenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa para obtener un ADN complementario (ADNc).

Cada muestra se preparó en tubos eppendorf, se procedió a preparar un mix en el cual se coloca el amortiguador 5x, DNTPs 10µM y oligo dt, posteriormente se resuspende y se divide a otros tubos dependiendo el número de muestras. Por último se agrega la muestra a cada tubo, el agua libre de nucleasas y la enzima, se resuspende ligeramente.

Las reacciones se colocaron en un termociclador ^(EPPENDORF MASTERCYCLER) que se programó para que se mantuviera a 42° C durante 1 hora. Pasado el tiempo las muestras pueden ser guardadas a -70°C en un ultra refrigerador ^(REVCO).

Se utilizan las siguientes cantidades de reactivos para cada muestra para la obtención del ADNc, en el caso de la muestra y el agua se calcula de acuerdo a la absorbancia obtenida en la cuantificación los cuales deben dar un total de 14.7 µl

Reactivo	1 Rx
Buffer 5 X ^(PROMEGA)	5 µl
dNTP's 10mM ^(INVITROGEN)	1.5 µl
Enzima MML-V (RT) ^(PROMEGA)	1 µl
Oligo dT ^(PROMEGA)	1.8 µl
Agua libre de nucleasas ^(FERMENTAS)	X µl
Muestra	X µl
Volumen Total	24 µl



- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Es una reacción con la cual es posible amplificar una secuencia pequeña y específica y se compone de tres fases:

Desnaturalización: Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo, temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C.

Alineamiento: La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados.

Extensión: La tercera reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 Kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima.

Concentración de Magnesio: La Taq polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre el total de la concentración de dNTP.

Con los ADN complementarios obtenidos de la RT se realizó la PCR utilizando las condiciones establecidas para 1 Rx, las cuales se multiplicaron por el número de reacciones que se requieren.



Reactivos	1 Rx
Buffer green 5 x (PROMEGA)	6 µl
dNTP's 10 mM (INVITROGEN)	0.8 µl
Enzima <i>GoTaq polimerasa</i> (PROMEGA)	0.15 µl
Primer Sentido 17.14 nM (IDT)	1 µl
Primer Anti sentido 17.14 nM (IDT)	1 µl
Agua libre de nucleasas (FERMENTAS)	7.05 µl
Muestra	4 µl
Volumen Tota	20 µl

Primers Utilizados:

Primer	Secuencia		Pares de Bases
β - actina	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	Sentido	243
β - actina	GGT CTCAAACATGATCTGGG	Anti-Sentido	243
COX III	CCAGCTACCATGTCCCAGAT	Sentido	185
COX III	TATGCCAGCTTCCGACTCTT	Anti-Sentido	185

Secuencias de los primers: Se muestran las pares de bases de cada uno de los primers utilizados para la detección del COX III así como β-Actina como un control interno de la técnica. Los primers fueron diseñados con ayuda del programa computacional Primer 3: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/> y en ePRC: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>

Cada muestra se preparo en tubos eppendorf. Se procedió a preparar un mix en el cual se agrego; Buffer Green, DNTP's, Sentido, antisentio y por último el agua. Se procedio a homogeneizar y se divide a tubos dependiendo el número de muestras sumadas.



Posteriormente se agrego la muestra y la enzima (Go Taq Polimerasa), se realizo un homogenizado.

Estas reacciones se colocaron en un termociclador (EPPENDORF MASTERCYCLER) y se programo para efectuar los siguientes ciclos de amplificación:

PASO	TEMPERATURA	ETAPA	TIEMPO
1	94°C	Desnaturalización	6 minutos
2	56°C	Hibridación	2 minutos
3	72°C	Extensión	2 minutos
4	94°C	Desnaturalización	45 segundos
5	Se repiten 30 veces del paso 2 al 4		
6	56°C	Hibridación	2 minutos
7	72°C	Elongación	7 minutos
8	20°C	Estabilización.	30 minutos

Finalmente al concluir el tiempo de amplificación las muestras fueron guardadas a -70°C en un ultra refrigerador (REVCO).

- Electroforesis en Agarosa

Es una técnica que permite separar moléculas basándose en propiedades como el tamaño, la forma o el punto isoeléctrico, en el caso de gel de agarosa es adecuada para muestras grandes de ADN y ARN.

En la electroforesis hay un movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, los ácidos nucleídos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato, por lo tanto migraron hacia el polo positivo, es decir el ánodo. De tal manera las moléculas ionizadas y con carga neta son posicionadas en un campo eléctrico y estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta.



Para preparar el gel de agarosa se pesaron 1.5 g de agarosa y se diluyeron en 100 ml de TBEX 1X en un matraz de 250 ml. Se calentó hasta que la agarosa este homogeneizada. Se monto la cámara de electroforesis y se vertió la dilución de agarosa previamente preparada, se le agregaron 15 μ l de bromuro de etidio ^(MERCURY) (este nos da color a la muestra ya que se intercala en las bases nitrogenadas).

Agregado el bromuro de etidio ^(MERCURY) se verifico que no se formen burbujas en la cámara de electroforesis para no impedir el corrimiento adecuado de las muestras, verificado esto se colocaron los peines y se dejo solidificar durante aproximadamente 30 minutos.

Al solidificarse la agarosa se retiran los peines y se monta la cámara, se le coloco aproximadamente 1L de buffer de corrida TBEX 0.5X. Se colocaron en los pozos 4 μ l de muestra y en uno de ellos 4 μ l de escalera o marcador de pesos moleculares GeneRuler Low Range ^(FERMENTAS), que es una solución de fragmentos de ADN de tamaño conocido para hacer una comparación con nuestros amplificados. Posteriormente se colocaron los electrodos y se dejo correr durante aproximadamente 1 hora en 90-100 volts.

Es importante, aclarar que para este trabajo se hizo cada ensayo por triplicado y se definieron tiempos de cultivo de 2, 48 y 72 horas, para las células de las Líneas CALO e INBL ya que, trabajos previos han demostrado que en estas líneas celulares, al ser estimuladas con IL-2 exógena, expresan el receptor para IL-2 el cual es funcional, y que a partir de estos tiempos son capaces de desencadenar vías de señalización intracelular, tales como las vías implicadas en la muerte celular (Mondragon,2011; Trujillo, 2012; Del Rio).



RESULTADOS.



Es conocido que las células normales en cualquier tejido necesitan de estímulos mitogénicos para pasar de un estado quiescente al estado de proliferación activo. Por el contrario, las células tumorales presentan menor dependencia de estímulos externos y se comportan como si se encontrasen continuamente sujetas a un mecanismo de estimulación autocrino. Esta independencia respecto de estimulación externa claramente rompe con las señales que normalmente operan para mantener la homeostasis tisular.

Las estrategias moleculares que permiten a las células tumorales adquirir la autonomía necesaria para su proliferación en ausencia de estimulación externa provienen de un mal funcionamiento en los puntos de control del ciclo celular, sobre expresión de protooncogenes o de la inhibición de los genes supresores de tumores, además la apoptosis se encuentra suprimida especialmente los mecanismos relacionados con la activación de las caspasas por esta razón es necesario estudiar agentes terapéuticos que activen este mecanismo de muerte en células tumorales.

Al respecto, sabemos que las células de cáncer cérvico uterino mueren cuando son cultivadas en presencia de 100UI/ml de IL-2 inhibiendo su proliferación y mostrando morfología similar a la de células apoptóticas, también hemos identificado las tres cadenas del receptor para esta citocina, tanto en líneas celulares como en cortes histológicos en diferentes estadios de este tipo de cancer (Rangel, 1998). Asimismo, se ha comprobado que el uso de 100 UI/ml de IL-2 puede inhibir la proliferación de estas células, mostrando cierta similitud morfológica de células apoptóticas. También, se ha reportado que IL-2 regula diferentes genes implicados en el proceso apoptótico (Mondragon,2011; Trujillo, 2012; Barragan, 2012; Del Rio).

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo dilucidar el papel de IL-2 sobre la regulación del mensajero para proteínas de la cadena respiratorio como COX III. Por la técnica de RT-PCR.

Inicialmente se determinó la integridad del ARN total obtenido de las líneas celulares de CaCu CALO e INBL; para ello las líneas celulares CALO e INBL fueron cultivadas a diferentes tiempos: 2, 48 y 72 horas en ausencia y presencia de 100UI/ml de IL-2. Una vez extraído el ARN fue teñido con bromuro de etidio y las muestras se corrieron en el gel de Agarosa.

Al excitar el gel con luz UV observamos nítidamente las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr), en de todas las muestras, lo que confirma su integridad. No se observa cambio en los productos de amplificación para las muestras de ARN extraído de células cultivadas en presencia de IL-2 en comparación de los obtenidos de células cultivadas en ausencia de la citocina. (Figura 4).

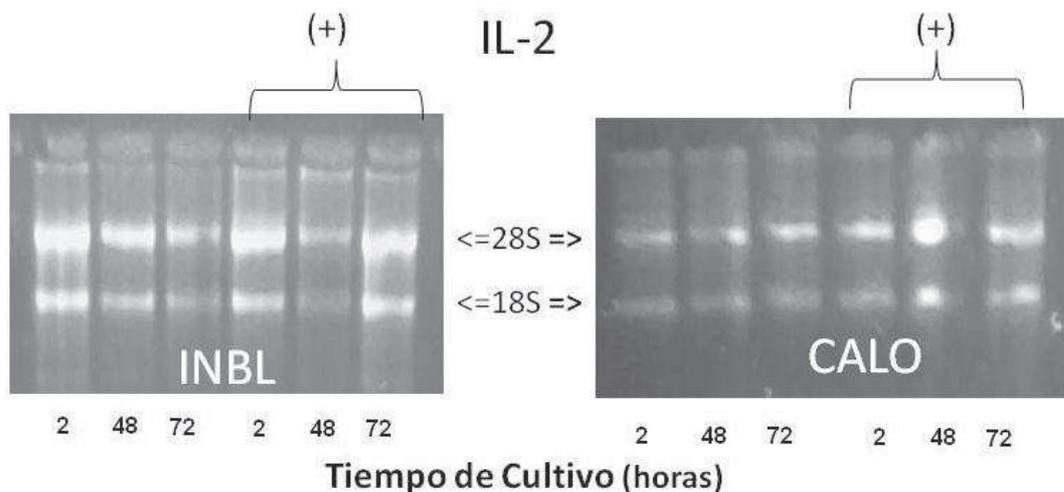


Figura 4. Integridad del ARN total en líneas celulares de CaCU CALO e INBL. Se realizó la Extracción del ARN por la técnica de TRIzolTM. **a)** = ARNm línea celular INBL. **b)** = ARNm línea celular CALO. **(+)** = Células cultivadas en presencia de IL-2 100UI/ml. Tiempo de cultivo 2, 48 y 72 horas. Las bandas muestran la integridad de las subunidades 28S y 18S del ARNr.

Una vez confirmada la integridad del ARNm se procedió a llevar a cabo la retrotranscripción para obtener el ADN complementario (ADNc) de las muestras cultivadas a 2, 48 y 72 horas en presencia y ausencia de 100UI/ml de IL-2.



Se sabe que la β -actina es una proteína constitutiva de la célula, por lo que su transcripción es permanente, ya que ésta, desempeña una variedad de funciones biológicas en los componentes que la integran, tal es el caso del citoesqueleto, el cual es una red dinámica de actina. Sus principales funciones biológicas están relacionadas con la movilidad celular y los cambios en la forma de la célula durante el ciclo celular. Dada su gran importancia en el metabolismo y su continua síntesis esta proteína se usa como un indicador de síntesis. Por esta razón, la presencia de β -actina es utilizada como un control interno de la técnica RT-PCR y su ausencia se interpreta como un error de la técnica. Para confirmar las condiciones de corrida de la PCR se utilizó el ADN complementario (ADNc), el cual se obtuvo por retrotranscripción del mensajero total obtenido de ambas líneas celulares cultivadas en presencia y ausencia de 100 UI/ml de IL-2.

Para ello se llevo a cabo una cuantificación del ARNm, se hicieron los cálculos para la retrotranscripción, obteniendo el ADNc para cada una de una de las muestras. Posteriormente se procedió a realizar la PCR para β -actina

Los resultados muestran un producto de amplificación de 234 pb en ambas líneas celulares cultivadas en ausencia y presencia de IL-2, sin modificación en la expresión por el tiempo de cultivo (Figura 5).

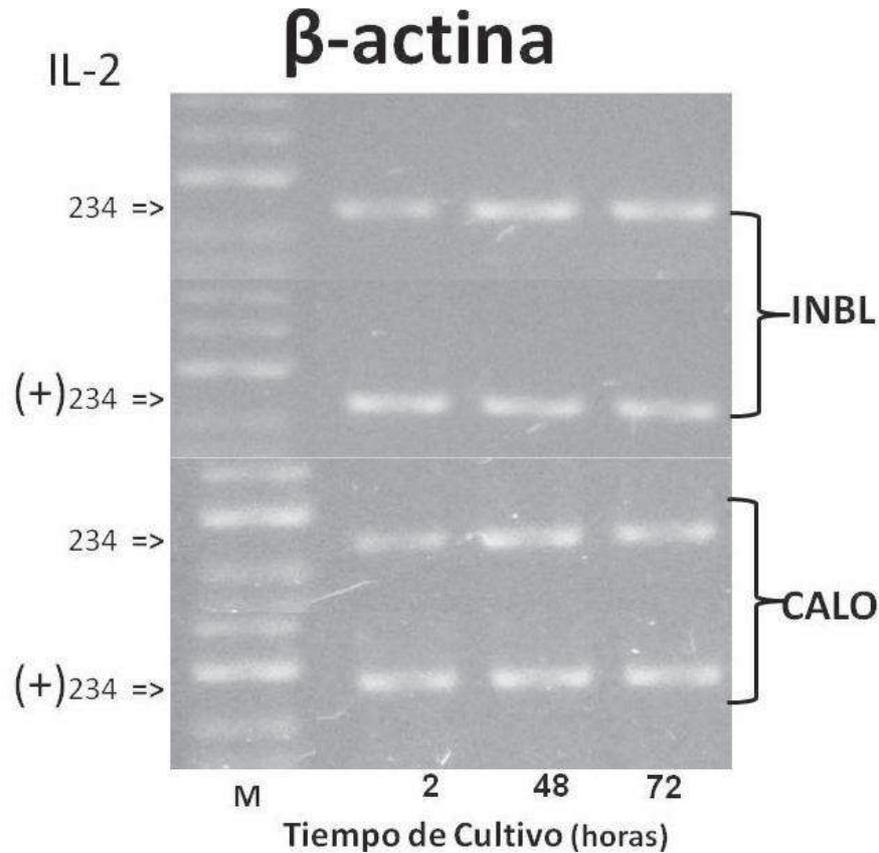


Figura 5. Productos de amplificación para β -actina en las líneas células CALO e INBL. Se observa un producto de amplificación de 234 pares de bases (pb) que corresponde a β -actina. M marcador de peso molecular.

Una vez confirmado que las condiciones del protocolo diseñado para la amplificación para PCR, garantiza la amplificación de cualquier tipo de primer. Se procedió a realizar la amplificación para COX III



EXPRESIÓN DE COX III

Se sabe que COX III es un transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria, implicado en el transporte de electrones para la producción de ATP.

Con la finalidad de evaluar el efecto de IL-2 sobre la regulación de la transcripción de este gen, se realizaron cultivos de las líneas celulares CALO e INBL a 2, 48 y 72 horas en ausencia y presencia de 100 UI/ml de IL-2.

Los resultados obtenidos, para la línea INBL, utilizando los primers específicos para COX III, muestran un producto de amplificación de 185 pb, tamaño esperado para este gen. Sin embargo, se observa una disminución en el producto de amplificación para las células cultivadas en presencia de IL-2. Cabe mencionar que los productos de amplificación obtenidos para las células cultivadas en ausencia o presencia de IL-2 no modifican la expresión del mensajero con respecto al tiempo en cada uno de los casos (Figura 6).

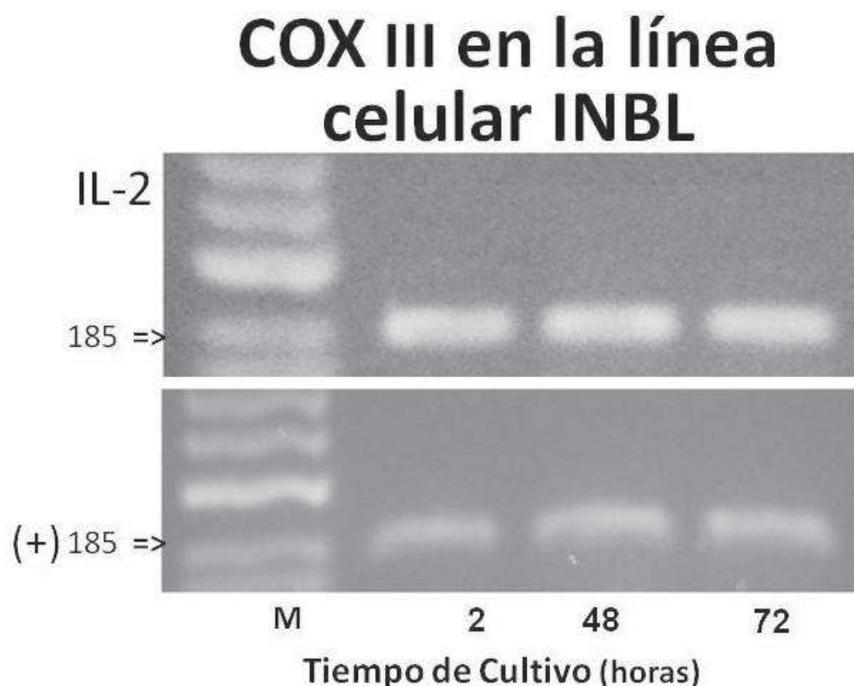


Figura 6. Producto de amplificación para COX III en la línea celular INBL cultivada en ausencia y presencia de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 185 pares de bases (pb) que corresponde a COX III. M marcador de peso molecular.



Para la línea CALO los resultados obtenidos muestran un amplificado para COX III de 185 pb en células cultivadas en ausencia y presencia de 100 UI/ml de IL-2, a 2, 48 y 72 horas. Los datos muestran un producto de amplificación sin variaciones atribuibles a la presencia de IL-2 ó al tiempo de cultivo (Figura 7).

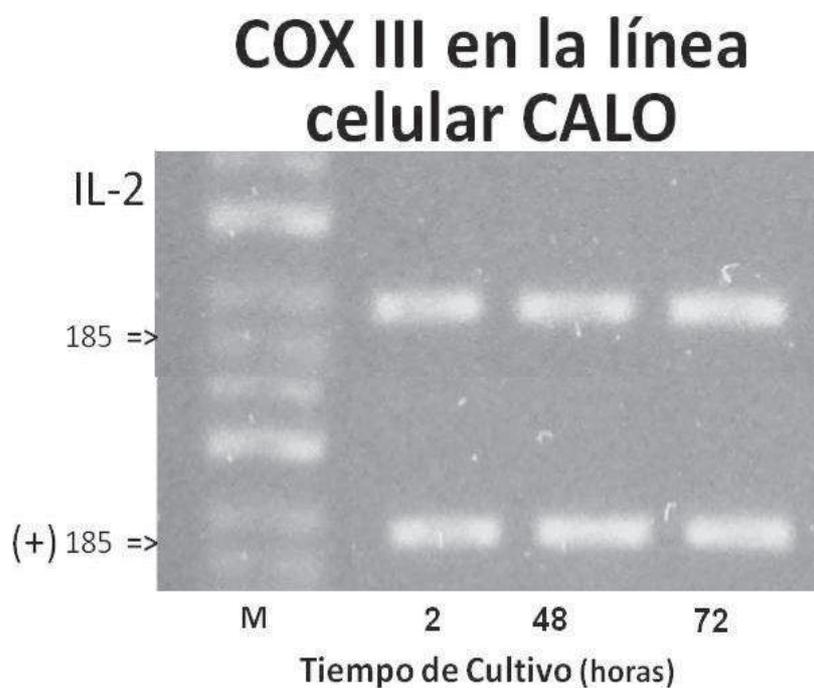


Figura 7. Producto de amplificación para COX III en la línea celular CALO cultivada en ausencia y presencia de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 185 pares de bases (pb) que corresponde a COX III. M marcador de peso molecular.



COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX III EN LAS LÍNEAS CELULARES CALO E INBL.

Para determinar si el estadio del tumor de las líneas celulares de CaCU CALO e INBL influyen en la regulación de la expresión del mensajero para COX III; se realizó una comparación de los productos de amplificación para este gen, entre la línea celular CALO, derivada de un carcinoma estadio IIB, e INBL derivada de un carcinoma IVB.

Para esta comparación se consideraron los datos obtenidos de las muestras de cultivos en ausencia y presencia de 100 UI/ml de IL-2. Se debe mencionar que ambas líneas celulares de CaCU tienen como característica principal ser positivas al genoma del VPH 18, que es considerado el principal factor etiológico de esta neoplasia.

Para el caso de células cultivadas en ausencia de IL-2 los datos muestran una mayor expresión de COX III en todos los tiempos de cultivo para la línea celular INBL en comparación con los productos obtenidos para la línea celular CALO (Figura 8).



Figura 8. Comparación de los productos de amplificación para COX III en las líneas CALO e INBL cultivadas en ausencia de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 185 pares de bases (pb) que corresponde a COX III que es mayor en la línea INBL. M marcador de peso molecular.



En el caso de células cultivadas en presencia de IL-2 se observa que la expresión de COX III es mayor en la línea celular CALO con respecto a INBL. Fenómeno que se observa para todos los tiempos de cultivo (Figura 9).

EXPRESIÓN DE COX III

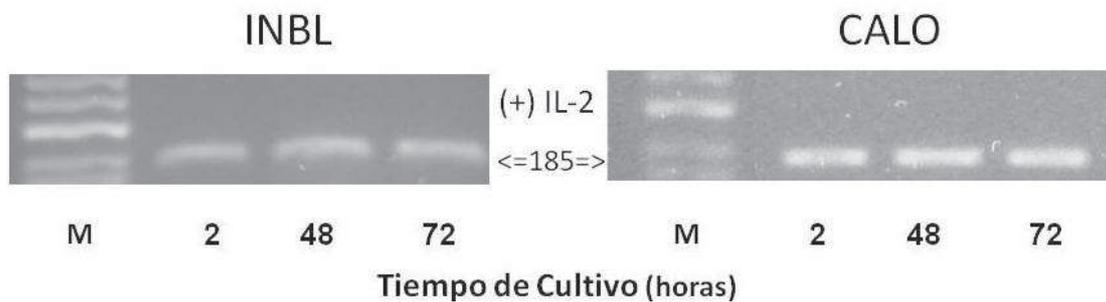


Figura 9. Comparación de los productos de amplificación para COX III en las líneas CALO e INBL cultivadas en presencia de IL-2. Se observa un producto de amplificación de 185 pares de bases (pb) que corresponde a COX III que es mayor en la línea CALO. M marcador de peso molecular.



DISCUSIÓN.



La apoptosis es un mecanismo regulador esencial que interviene en la homeostasis tisular y en el desarrollo normal, eliminando las células innecesarias. El papel de la mitocondria en la apoptosis es la liberación de citocromo c que es uno de los factores críticos de la activación de la caspasa 3. El citocromo c es liberado de la membrana interna de la mitocondria hasta el citosol, donde se une a una proteína llamada Apaf-1 la cual se activa y se asocia con la pro-caspasa 9. Este evento dispara la activación de caspasa 9 y forma el llamado apoptosoma, entonces se inicia la cascada apoptótica con el procesamiento de caspasa 3.

La liberación de activadores de caspasas así como, otras señales convergen en la mitocondria para inhibir o disparar el proceso de muerte celular programada. Estos cambios afectan el transporte de electrones, pérdida de potenciales transmembranal mitocondria, alteraciones en actividades de óxido reducción y la activación de genes proapoptóticos.

En dichos cambios participan los complejos enzimáticos denominados COX I, II, III y IV; ubicados en la membrana interna de la mitocondria, cuya función principal es el transporte de electrones. Cada complejo acepta o dona electrones a moléculas acarreadoras relativamente movibles, como la coenzima Q y el citocromo c.

Por su parte los llamados complejos enzimáticos de la cadena respiratoria, excepto el conocido como COX II, se conforman por proteínas codificadas tanto por ADN nuclear como mitocondrial. El número de los componentes mitocondriales y nucleares por cada genoma varía dependiendo del complejo de que se trate (Lapuente Brun 2012). En el caso del complejo COX III el genoma mitocondrial sintetiza citocromo b, mientras que el nuclear codifica a la proteína citocromo c1, además contiene el centro hierro-azufre, llama proteína de Rieske, el mecanismo de acción del complejo III se conoce con el nombre de "ciclo Q".

Existen dos centros distintos de reacción de ubiquinonas en el complejo III, uno en el exterior (Qext) y otro en el interior (Qint). En un primer paso en el centro Qext el primer electrón es transferido desde el ubiquinol (QH₂) al centro hierro-azufre de COX III para formar una ubisemiquinona inestable. El electrón es más adelante transferido desde el citocromo c1 al citocromo c. Después, otro electrón es transferido desde el grupo hemo



b566 al grupo hemo b562 y de aquí a la ubiquinona en el centro Q_{int}, para formar una ubisemiquinona estable, la cual permanece unida en Q_{int}.

En un segundo ciclo, donde la QH₂ está unida en Q_{ext}, la ubisemiquinona es reducida a QH₂ por un segundo electrón y por la asociación de dos protones provenientes de la matriz mitocondrial. El resultado neto es que un ubiquinol (QH₂) es oxidado a ubiquinona (Q), dos moléculas de citocromo c son reducidas que al pasar al complejo IV es oxidado nuevamente liberando protones que activan la síntesis del ATP por el complejo V.

El estado reducido u oxidado de citocromo c, no sólo tiene implicaciones en la regulación de la cadena respiratoria, recientemente se ha reportado que la forma oxidada de citocromo c, activa la apoptosis (Brown y Vilmante 2008).

Con el propósito de dilucidar el mecanismo molecular que inducen apoptosis en células tumorales y esclarecer la participación de la cadena respiratoria en este proceso de muerte. Actualmente se utilizan diferentes agentes antitumorales, como las citocinas para promover la eliminación de las células neoplásicas, así como la activación del sistema inmunológico.

Existen reportes en cáncer murino donde se menciona que la terapia de altas dosis de IL-2 con cloroquina reduce significativamente la síntesis de ATP, requerida en la división celular (Liang et al 2012). Lo que sugiere, una regulación de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria por IL-2. Sin embargo, no se cuenta con reportes que indiquen que Interleucinas, como la 2, regulen la expresión de estos complejos en células tumorales humanas.

Por otro lado, se sabe que IL-2 juega un papel importante en la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T, en particular los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), los cuales participan en la respuesta antitumoral, por lo cual esta citocina ha cobrado gran interés como alternativa terapéutica para combatir distintos tipos de cáncer.

En proyectos previos, el Laboratorio de Oncología Celular, evaluó el papel de IL-2 sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaCU) CALO e INBL, demostrando que estas células responden de manera diferencial a distintas



concentraciones de IL-2 exógena, donde 100 UI/ml inhiben su proliferación. Estos datos indican que el efecto de esta citocina, sobre la proliferación de las células de CaCU está en función de su concentración y del tiempo que esta permanece en cultivo.

Cabe mencionar, que las líneas celulares CALO e INBL son derivadas de células del carcinoma de cérvix, estadio II B y IV B respectivamente, la primera de ellas considerada un estadio temprano del desarrollo neoplásico mientras que la segunda corresponde a un estadio avanzado metastásico, lo cual podría influir en la respuesta de estas células a la presencia de IL-2.

Nuestro equipo de investigación ha trabajado en los últimos años para dilucidar el papel de IL-2 en la regulación de la expresión de diversos genes que codifican para la transcripción de proteínas que participan en el proceso de apoptosis en células de CaCU. Tal es el caso de la cadena de transporte de electrones, en donde participan los complejos enzimáticos COX I, COX II, COX III, COX IV así como citocromo c.

Al respecto Amaro, 2011 reporta que la expresión de COX I no se ve afectada por la presencia de IL-2 en la línea de CaCU INBL. Del Rio Ortiz 2013, menciona que la expresión de citocromo c, es regulada por la presencia de 100 UI/ml de IL-2, mientras que el complejo IV (subunidad 1) es inhibido cuando las células de las líneas CALO e INBL son cultivadas en presencia de esta citocina.

Sin embargo, se desconoce si la liberación de citocromo c de la mitocondria evita la síntesis del mensajero de COX III. Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo dilucidar el papel de IL-2 en la regulación de este complejo en células de carcinoma de cérvix de las líneas CALO e INBL.

El hecho de haber observado una disminución de la expresión del mensajero para uno de los componentes de COX III, en células cultivadas en presencia de IL-2. Indica que IL-2 regula negativamente la transcripción nuclear en particular de los componentes de este complejo enzimático.

Para apoyar nuestra hipótesis de bloqueo de la síntesis de COX III por inducción de apoptosis por IL-2, debemos recordar que la biogénesis de la mitocondria requiere la expresión de aproximadamente 1000 genes que están codificados en el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. La gran mayoría de estos genes están codificados en el genoma



nuclear y la regulación de su expresión parece estar controlada mayoritariamente por mecanismos transcripcionales. El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular de doble banda y codifica para 13 subunidades de la cadena respiratoria, 2 ARNr (12S y 16S) y 22 ARNt que son esenciales para la síntesis de proteínas en la mitocondria.

Dada la complejidad de los programas celulares que controlan la biogénesis y funcionalidad de la mitocondria, y la localización dual de sus constituyentes en dos genomas diferentes, no es de extrañar que existan un gran número de enfermedades humanas que están asociadas con defectos en las funciones bioenergética y/o apoptótica de la mitocondria.

La patología mitocondrial es muy extensa y engloba enfermedades con fenotipo muy diverso, como pueden ser, enfermedades neurodegenerativas enfermedades metabólicas como la diabetes o síndrome metabólico, el envejecimiento y el cáncer.

Para aclarar la participación de los componentes nucleares de COX III en la muerte de células de las líneas de carcinoma de cérvix CALO e INBL, en el presente trabajo utilizamos los primers para citocromo c_1 del ADN nuclear. La disminución de la expresión del mensajero para COX III, a través de citocromo c_1 , en células INBL cultivadas en presencia de IL-2, nos indica que esta citocina actúa directamente sobre el ADN nuclear, y es capaz de regular la expresión de diversos genes implicados tanto en la cadena de transporte de electrones como en el proceso de muerte por apoptosis.

Como se ha mencionado, la función principal de citocromo c_1 es la transferencia de electrones desde citocromo b hasta el citocromo c. (se reduce). Al respecto, Suto et al. 2005 encontraron que la adición de citocromo c oxidado a un extracto citosólico da como resultado el procesamiento y la activación tanto de caspasa 9 como de caspasa 3, mientras que la adición de citocromo c reducido no tuvo efecto sobre la activación de caspasas.

Por lo que la reducción en la síntesis de citocromo c_1 del COX III, en células INBL, cultivadas en presencia de IL-2, implica una menor cantidad de citocromo c reducido, sin embargo, se sabe que este citocromo c reducido en el citosol tiene una menor afinidad por el factor activador de la apoptosis (APAF 1). Por lo antes mencionado creemos que en nuestro modelo de células de CaCU en presencia de IL-2 se tiene una menor activación



de caspasa 9 y caspasa 3 que se sabe son importantes para desencadenar la cascada de eventos morfológicos y bioquímicos de la muerte por apoptosis. Por lo que proponemos que la disminución en la síntesis de citocromo c_1 , no altera el transporte de electrones hacia citocromo c , solo disminuye su forma reducida en el citosol esta hipótesis se apoya en los experimento de Suto et al., 2005 y Pan et al., 1999 quienes demuestran que el citocromo c oxidado induce la activación de caspasas en citosol, mientras que citocromo c reducido tiene poca capacidad para activar a las caspasas. Por otro lado, Zhu et al. 2012, demostraron que en el proceso de apoptosis, al ocurrir la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, caspasa 3 activa es capaz de penetrar al espacio intermembrana de la mitocondria y cortar a citocromo c_1 dando como consecuencia la interrupción de la interacción del complejo COX III con COX IV. Provocando una amplificación adicional de la liberación citocromo c oxidado, contribuyendo al proceso apoptótico.

Por tanto, los datos proporcionados en este trabajo sobre la disminución de la expresión del mensajero para COX III en la línea INBL, apoya la hipótesis de, Del Rio Ortiz, quien propone que IL-2 induce la muerte por apoptosis en esta línea celular. Dicha disminución de la expresión de COX III también, se puede interpretar como un ahorro energético de las células tumorales que se encuentran en vía apoptótica inducida por IL-2. Es decir que una célula en apoptosis deja de sintetizar transportadores de electrones como el COX III, como se demuestra en este trabajo.

La disminución de la expresión del mensajero para COX III por IL-2 en células de CaCU se puede atribuir al estadio del tumor del cual provienen las células utilizadas. Ya que observamos un mayor efecto en la disminución de la expresión de COX III en las células de la línea celular INBL, estadio IV, a diferencia de las células de la línea CALO, estadio IIB, por lo que proponemos que hay una mayor susceptibilidad a morir por apoptosis inducida por IL-2 en células en estadio avanzado.

Además, las células de la línea celular CALO derivada de un carcinoma estadio IIB, es un cáncer que se diseminó más allá del cuello uterino hasta los tejidos que rodean el útero pero aun así no han ocurrido tantas mutaciones que la hagan más susceptible a la disminución de la expresión de COX III, no obstante, las células de esta línea también mueren por apoptosis, sólo que requieren más tiempo.



Finalmente, mencionaremos que una menor actividad en la cadena de transporte de electrones y la disminución de velocidad de síntesis de ATP parece estar relacionada con el control del cáncer. La afirmación anterior se realiza tomando en cuenta los resultados de este trabajo que relaciona la menor actividad del mensajero para COX III, con la muerte de células tumorales.

Los datos presentados en este estudio son de gran importancia ya que nos permiten dilucidar la vía de inducción de apoptosis por IL-2 en células de carcinoma de cérvix. Demostrando que IL-2 puede llevar a cabo la regulación de diversos genes de la cadena mitocondrial en particular para citocromo c_1 del COX III, que colocan a IL-2 como un posible agente terapéutico para carcinoma de cérvix.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES:

- IL-2 no modificó la expresión del ARNm de COX III en la línea celular CALO de cáncer cérvicouterino
- IL-2 modificó la expresión del ARNm de COX III en la línea celular INBL de cáncer cérvicouterino mostrando una baja en la expresión
- La transcripción de ARNm para COX III en células de cáncer cervicouterino CALO e INBL están siendo codificadas constantemente.
- IL-2 es un posible agente terapéutico para carcinoma de cérvix.



PERSPECTIVAS:

Para complementar los resultados obtenidos en este trabajo, sería conveniente realizar los siguientes experimentos:

- Determinar si IL-2 regula la expresión de otras subunidades del complejo COX III en las líneas celulares de cáncer cérvicouterino CALO e INBL
- Confirmar si IL-2 está induciendo la traducción proteica de citocromo c₁ del complejo COX III en la línea celular INBL.
- Determinar el estado de oxido reducción de citocromo c



BIBLIOGRAFÍA.



- Acin-Perez R., Bayona-Bafaluy M.P., Fernandez-Silva P., Moreno-Loshuertos R., Perez-Martos A., Bruno C., Moraes C.T., Enriquez J.A., Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria, *Mol. Cell* 13, 805–815. 2004.
- Aguzzi A, Heikenwalder M. Prions., Cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity*. 2005.
- Alvarado, M.J.A Presencia de la cadena α y β del receptor para interleucina 2 (RIL-2) en células tumorales de carcinoma cérvico uterino (CaCu) y el efecto proliferador inducido por la interleucina 2 (IL-2) en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F. 1997.
- Assuncao Guimaraes, Cinthya y Linden Rafael. Programmed cell death Apoptosis and alternative deathstyles. Instituto de Biofísica da UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650 (2004) FEBS. 2004.
- Baeriswyl, V., and Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19, 329–337. 2009.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410. 2003.
- Boletín informativo editado por el Instituto Nacional de Salud Pública y la Secretaría de Salud. NLS.SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO. junio-2007.
- Brandt, U. Proton-translocation by membrane-bound NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta* 1318, 79-91. 1997.
- Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*; 25: 4744–4756. 2006.
- Brown Guy C., Borutaite Vilmante. Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c *Biochimica et Biophysica Acta* 1777 877–881. 2008.
- Budde S.M., van den Heuvel L.P., Janssen A.J., Smeets R.J., Buskens C.A., L.DeMeirleir, Van Coster R., Baethmann M., Voit T., Trijbels J.M., Smeitink J.A., Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the



- nuclear encoded NDUFS4 gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 63–68. 2000.
- Caro Martín Pilar. Restricción de metionina y de dieta en relación con el estrés oxidativo en mamíferos de laboratorio. Tesis Doctoral. Universidad Complutense De Madrid. 2009.
 - Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Runswick, M.J., Shannon, R.J., Hirst, J. and Walker, J.E. The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 4, 693-699. 2005.
 - Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T.M. and Iwata, S. Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett* 545, 31- 38. 2003.
 - Chance, B. and Williams, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65-134. 1956
 - Crofts A.R. , The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure, *Annu Rev Physiol* 66, 689–733. 2004.
 - D.E. Bénit P, Lebon S, Giurgea I, Rustin P. in (Siso, M.I.G., ed.) Complex I and alternative dehydrogenases, Transworld Research Network, Research Signpost, Kerala, India, pp. 157–178. 2007.
 - De Grey, A.D. The mitochondrial free radical theory of aging. Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company. Austin, Texas USA. 1999.
 - Del Rio Ortiz Itzel. IL-2 regula la expresión del RNAm de los complejos de la cadena respiratoria, promoviendo la apoptosis en las líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F. 2013.
 - Ernster L., Dallner G., Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function, *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 195–204.1995.
 - Fidler, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458. 2003.
 - Fisher N., Meunier B., Effects of mutations in mitochondrial cytochrome b in yeast and man. Deficiency, compensation and disease, *Eur. J. Biochem.* 268, 1155–1162. 2001.



- Forquer I. , Covian R. , Bowman M.K. , Trumpower B.L. , Kramer D.M. , Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome bc1 complex, *J. Biol. Chem.* 281, 38459–38465. 2006.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* Jan;19(1):107-20. doi: 10.1038/cdd.2011.96. Epub Jul 15 2011.
- Green, D.E. and Vande Zande, H. On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 1064-1068. 1982.
- Gutierrez Puente Yolanda. Actividad antitumoral de la Interleucina 2 recombinante libre y atrapada en liposomas en un modelo de linfoma subcutáneo murino. Universidad Autonoma de Nuevo León. Tesis de Maestria 1997.
- Guzmán, C., et.al. Citocinas y otras moléculas involucradas en sepsis y en pacientes con sepsis y en pacientes con neutropenia. *Alergia, Asma e inmunológica pediátricas*; 13(1):15-23. 2004.
- Hanahan D y Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011.
- Hanahan D y Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1);57-70. 2000.
- Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364. 1996.
- Hinchliffe, P. and Sazanov, L.A. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* 309, 771-774. 2005.
- Kastan, M. B., and Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323. 2004.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99–163. 2007.
- Lapuente Brun Esther. Organización modular de la cadena respiratoria de mamíferos y optogenética mitocondrial. Universidad De Zaragoza. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Tesis doctoral. 2012.



- Leung K. Interleukin-2. Molecular Imaging and Contrast Agent Database. National Center for Biotechnology Information. 2004-2013.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479–489. 1997.
- Liang Xiaoyan, De Vera Michael E., Buchser William J., de Vivar Chavez Antonio Romo, Loughran Patricia, Beer Stolz Donna, Basse Per, Wang Tao, Van Houten Bennett, Zeh III Herbert J., and Lotze Michael T. Inhibiting Systemic Autophagy during Interleukin 2 Immunotherapy Promotes Long-term Tumor Regression. *Cancer Res* 2012;72:2791-2801. Published Online First April 3, 2012.
- Liu V.W., Shi H.H., Cheung A.N., Chiu P.M., Leung T.W., Nagley P., Wong L.C., Ngan H.Y., High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas, *Cancer Res.* 61 5998–6001. 2001.
- Lizarbe Iracheta, M^a Antonia. El Suicidio Y La Muerte Celular. *Rev. R.Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* Vol. 101, N^o. 2, pp , 2007.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser k., Krieger M., Scott M., Zipursky L., y Darnell J. *Biología celular y molecular. Médica Panamericana*, 5th edition. 2005.
- López -Saavedra y Lizano-Soberón., *Cáncer Cervino Uterino Y El Virus del Papiloma Humano: La Historia que no Termina. México. Cancerología.* 1: 31-55. 2006.
- Lukas, J., and Bartek, J. Cell division: the heart of the cycle. *Nature* 432, 564-7. 2004.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3, 997-1007. 2004.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481–490. 1998.
- Martin, G. S. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell* 4, 167-74. 2003.
- Martínez Salazar Mauricio. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. XI, Núm. 2, diciembre, pp. 152-166. 2009.
- Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal*; 4: mr2. 2011.



- Ministerio de Salud., Comisión Nacional de Cáncer Cervicouterino. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer Cérvico Uterino, Chile. 2004.
- Mitchell, P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56, 1-6. 1975.
- Muller F.L. , Liu Y. , Van Remmen H. , Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.* 279 49064–49073. 2004.
- Murray, A. W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-34. 2004.
- Pan Z., Voehringer D.W., Meyn R.E. Analysis of redox regulation of cytochrome c-induced apoptosis in a cell-free system, *Cell Death Differ.* 6 683–688. 1999.
- Parfait B., Rustin P., Munnich A., Rotig A., Co-amplification of nuclear pseudogenes and assessment of heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 57–59. 1998.
- Polyak K., Li Y., Zhu H., Lengauer C., Willson J.K., Markowitz S.D., Trush M.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours, *Nat. Genet.* 20 291–293. 1998.
- Radimerski, T., Montagne, J., Rintelen, F., Stocker, H., van der Kaay, J., Downes, C. P., Hafen, E., and Thomas, G. dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nat Cell Biol* 4, 251-5. 2002.
- Rangel Rosalva, Rocha Leticia Ramírez, José Luis, Ibarar Ma. J., Solorza Gilberto, Monroy Alberto, Ramírez Miguel A, Herrera Angel, and Weiss-Steider Benny. Generation of memory CD4+, CD8+, CD45Ro+ and CD16+ lymphocytes activated with IL-2 IFNg and TNFa with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cell in mixed lymphocytes tuour culture. *Eur. Cytokine Netw*; 6:195-202. 1995.
- Rangel-Corona, M.A. Hernández-Jiménez, T Corona-Ortega, M.A. Ibáñez-Hernández, I. Baeza-Rodríguez and B. Weiss-Steider. Interleukin-2 interaction with liposomes of different formulations (Neutral and Cationics) *Immunology*; 309-312. 2004.
- Rotsaert, F.A., Ding, M.G. and Trumpower, B.L. Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome bc1 complexes by center N inhibitors antimycin, ilicicolin H and funiculosin. *Biochim Biophys Acta* 1777, 211-219. 2008.



- Salas A., Yao Y.G., Macaulay V., Vega A., Carracedo A., Bandelt H.J., A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis, PLoS Med. 2 e296. 2005.
- Sánchez-Román F., Carlos-Rivera F, Guzmán-Caniupan J., Escudero-de los Ríos P., Juárez-Pérez C., Aguilar-Madrid G. Costos de atención médica por cáncer cervicouterino. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social; 50 (1): 99-106. 2012.
- Sandal, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. Oncologist 7, 73-81. 2002.
- Sazanov, L.A. and Hinchliffe, P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. Science 311, 1430-1436. 2006.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. Eur J Biochem 254: 439–459. 1998.
- Shapiro, G. I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. J Clin Oncol 24, 1770-83. 2006.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 13, 1501-12. 1999.
- Sierra Mondragón Edith. Participación de caspasa 8 y 12 en la regulación de apoptosis en líneas celulares de cáncer cérvico uterino, Cultivadas en presencia de IL-2. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F. 2011.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397: 441–446. 1999.
- Suto D., Sato K., Ohba Y., Yoshimura T., Fuji J., Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism, Biochem. J. 392. 399–406. 2005.
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 621–632. 2010.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. Cancer Res. 70, 5649–5669. 2010.
- Trujillo Cirilo Leonardo. Expresión de caspasas 3 y 9 por RT-PCR en las líneas celulares de cáncer cervicouterino VIBO y C33 en presencia de IL-2. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México, D.F. 2012.



- Trumpower, B.L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 265, 11409- 11412. 1990.
- Tseng L.M., Yin P.H., Chi C.W., Hsu C.Y., Wu C.W., Lee L.M., Wei Y.H., Lee H.C., Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer, *Genes Chromosomes Cancer* 45, 629–638. 2006.
- Tyler, D. The mitochondrion in health and disease. VHC Publishers, INC 1992.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-84. 2006.
- Yagi, T. and Matsuno-Yagi, A. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry* 42, 2266-2274. 2003.
- Zhang Z. , Huang L., Shulmeister V.M. , Chi Y.I. , Kim K.K., Hung, A.R. Crofts L.W., Berry E.A., Kim S.H. , Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁, *Nature* 392, 677–684. 1998.
- Zhu Yushan , Li Min, Wang Xiaohui, Jin Haijing, Liu Shusen, Xu Jianxin, Chen Quan. Caspase cleavage of cytochrome c1 disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release. *Cell Research* 22:127-141. 2012.



ANEXOS.



ANEXO I

MEDIO Y SOLUCIONES DE CULTIVO

Medio de Cultivo

RPMI-1640/10% SFB

Solución fisiológica de verseno

Solución de Fosfatos (PBS)

Reactivos para (PCR)

Amortiguador 5X Green GoTaq (Promega)

dNTP'S 10 mM (Invitrogen)

Enzima GoTaq DNA Polimerasa 5u/ L (Promega)

Primers: β -actina (1:10), COX III (1:5) (iDT)

H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

ANEXO II

REACTIVOS PARA RT/PCR

Reactivos para Extracción ARN Total

Trizol (Invitrogen)

Cloroformo

Isopropanol

Etanol 70%

H₂O inyectable

H₂O libre de RNAsas

Reactivos y soluciones para electroforesis

Agarosa (Invitrogen)

TBE 10X, 1X, 0.5 X

Gel de agarosa al 1.5%

Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range

Buffer de carga Blue/Orange 6X (promega)

Bromuro de etidio (MERCURY)

ANEXO III

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Reactivos para Retrotranscripción (RT)

Amortiguador 5X (Promega)

Enzima MMLV-RT (Promega)

dNTP'S 10mM (Invitrogen)

Oligo dT (Promega)

H₂O libre de RNAsas (Fermentas)

Desactivación del Suero Fetal Bovino (SFB)

El suero fetal bovino (Gibco) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado, se pasa a un baño de agua a 57°C durante 30 minutos. Esto se hace para inactivar proteínas de bajo peso molecular que pueden interferir con el crecimiento celular.



Solución fisiológica de Verseno

Esta solución se emplea para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares.

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias.

- Tris base 3.04 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de sodio 800 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.40 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)
- Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.20 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)

Nota: El pH se ajusta a 7.7 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato.

En 800 mL de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

- Cloruro de sodio 8.0 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)

- Fosfato de sodio monobásico 2.88 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)
- Fosfato de potasio 0.4 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)
- Cloruro de potasio 0.20 gramos (sigma chemical Co.U.S.A)

El pH se ajusta a 7.2 con ácido clorhídrico 10 Normal, se lleva el volumen a 1 L y en seguida se esteriliza en autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos.

DNTPS 10 mM (MIX)

Todos los nucleótidos se encuentran a una concentración de 100 mM, de los cuales se toman las siguientes cantidades:

- 100µl de A
- 100 µl de G
- 100 µl de T
- 100 µl de C

Estos se diluyen en 600 µl de agua libre de RNasas para obtener 1 mL a una concentración de 10 mM.

TBE 10X

- 108 gramos de Tris base (sigma chemical Co.U.S.A)
- 55 gramos de Ácido bórico (sigma chemical Co.U.S.A)
- 40 mL de EDTA 0.5 M (sigma chemical Co.U.S.A)



Nota: lleve a 1000 mL con agua destilada, si hay precipitaciones debe descartarlas. Guardar a temperatura ambiente.

TBE 1X

Tomar 50 mL de TBE 10X y diluirlo en 450 mL de agua destilada.

TBE 0.5X

Tomar 250 mL de TBE 1X y diluirlo en 250 mL de agua destilada.

EDTA 0.5 M

-186.1 gramos de EDTA

-1000 mL de agua destilada

Nota: disolver el EDTA en los 1000mL de agua destilada y llevar a PH 8.

Gel de agarosa 1.5%

-1.5 gramos de agarosa en 100 mL de TBE 1X

Marcador de Peso Molecular

El marcadores de pesos moleculares ó escalera utilizado en la electroforesis fue de 25 a 700 pb (Fermentas).

