

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN
LINFOCITOS T POR CÉLULAS
TUMORALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE: MAESTRA EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA
MOLECULAR. P R E S E N T A:
BIOL. LAURA PADIERNA MOTA**



**Director: Dr. Fernando Enríquez Rincón
Co-Directora: Dra. Paula Figueroa Arredondo**

México, D.F. 2006

Este trabajo fué dirigido por el Dr. Fernando Enríquez Rincón y la Dra. Paula Figueroa Arredondo, se realizó en:

Laboratorio 20 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, en el Laboratorio de Microbiología Molecular en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN y en los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S. A. de C. V.

A estas instituciones les extiendo mi agradecimiento.

Proyecto financiado por:

- CGPI20030521
- CGPI20040743
- CGPI20050884
- Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S. A. de C. V.

ÍNDICE

	Página
I. ABREVIATURAS	1
II. LISTA DE FIGURAS	2
III. LISTA DE TABLAS	2
IV. RESUMEN	3
V. ABSTRACT	4
VI. INTRODUCCIÓN	5
VI.1 Cáncer	5
VI.2 Cáncer cervical	5
VI.3 Virus del Papiloma Humano.	6
VI.4 Apoptosis	8
VI.5 Receptor CD95 (Fas)	10
VI.6 Ligando de CD95 (FasL)	11
VI.7 Vía de señalización mediada por CD95/CD95L	12
VII. ANTECEDENTES	14
VIII. JUSTIFICACIÓN	16
IX. HIPÓTESIS	16
X. OBJETIVO GENERAL	17
XI. OBJETIVOS PARTICULARES	17
XII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
XII.1 Líneas celulares	18
XII.2 Ensayos de apoptosis	18

XII.3	Tinción con anexina V-FITC/yoduro de propidio	18
XII.4	Marcaje de extremos libres del DNA	19
XII.5	Inducción de apoptosis en co-cultivos	20
XII.6	Tratamiento con inhibidor de metaloproteasa de matriz extracelular (MMPI)	21
XII.7	Tratamiento simultáneo de MMPI y el anticuerpo anti-FasL	22
XIII.	RESULTADOS	25
XIII. 1	Las líneas celulares de cáncer cervical inducen apoptosis en los linfocitos T	25
XIII. 2	El inhibidor de la metaloproteasa de matriz extracelular (MMPI) inhibe el efecto apoptótico en las células Jurkat incubadas con el sobrenadante de las líneas de cáncer cervical.	29
XIII. 3	El CD95 asociado a la membrana de las células de cáncer cervical induce apoptosis en las células Jurkat.	32
XIV.	DISCUSIÓN	35
XV.	CONCLUSIONES	40
XVI.	BIBLIOGRAFÍA	41

I. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribunucleico
CaCU	Cáncer cérvico uterino
DISC	Complejo de Señalización Inductor de Muerte
DMEM	Medio de cultivo Tagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Fas	Receptor de Fas (CD95)
FasL	Ligando de Fas (CD95L)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
HEPES	Ácido 4-(hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico)
HPV	Virus del Papiloma Humano
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
min	minuto
MMPI	Inhibidor de la Metaloproteasa de Matriz Extracelular
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SFB	Suero Fetal Bovino
rpm	revoluciones por minuto
TBS	20 mM Tris y 140 mM NaCl, pH 7.6
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TNF	Factor de necrosis tumoral, ligando de TNFR
TNFR	Receptor de Factor de necrosis tumoral

II. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.-** Genoma del Virus del Papiloma Humano tipo 16. Pag. 7.
- Figura 2.-** Cascada de señalización mediada por CD95 y su ligando. Pag. 13.
- Figura 3.-** Diseño experimental empleado para la determinación de apoptosis de células Jurkat con los diferentes tratamientos. Pag. 24.
- Figura 4.-** Apoptosis de células Jurkat co-cultivadas durante 24 h con las monocapas (M) o sobrenadantes (S) de líneas celulares de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C-33 A). Pag. 27.
- Figura 5.-** Apoptosis de células Jurkat co-cultivadas 24 h con monocapas o sobrenadantes de células SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A (Gráfica de barras). Pag. 27.
- Figura 6.-** Controles de inducción de apoptosis en células Jurkat valorados por la tinción de TUNEL. Pag. 33.
- Figura 7.-** El ligando de CD95 anclado a la membrana de las células de cáncer cervical induce apoptosis en las células Jurkat. Pag. 34.

III. LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.-** Función de las diferentes proteínas codificadas por el HPV. Pag. 7.

IV. RESUMEN

El cáncer cervical es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres mexicanas, se ha mencionado al virus del papiloma humano (HPV) como agente causal de esta enfermedad. La respuesta inmune celular del huésped en especial la actividad biológica de los linfocitos T citotóxicos es de gran importancia, tanto frente a la infección viral, como frente a las células transformadas. El linfocito T citotóxico al encontrarse con su célula blanco es capaz de inducirle apoptosis por dos vías principalmente, una es por medio de la producción de perforinas y granzimas y la otra vía es a través de la interacción con el receptor CD95 (Fas). El receptor CD95, se encuentra en la superficie de la célula blanco y su ligando es la molécula CD95L (FasL) que se encuentra en el linfocito T citotóxico. Este ligando existe en dos formas biológicamente activas, la membranal y la soluble. El receptor CD95 se encuentra de manera normal en muchos tipos celulares, además del linfocito T citotóxico que también es susceptible de apoptosis cuando sufre daño o envejecimiento. Sin embargo, las células neoplásicas tienen mecanismos que les permiten evadir la respuesta inmune del huésped, entre éstos se encuentran la producción de moléculas inmunosupresoras, así como la utilización de la vía de señalización de CD95/CD95L. La célula transformada es capaz de inducir apoptosis en el linfocito T mediante el mecanismo de CD95/CD95L, ya que en la superficie de la célula transformada se encuentra sobre-expresado FasL e interacciona con su receptor, el cual está presente en forma legítima en el linfocito T citotóxico, de esta manera evade eficientemente la respuesta del huésped y las células malignas proliferan exitosamente en el organismo.

Los objetivos de este trabajo son: 1) Determinar que las células transformadas de cáncer cérvico uterino inducen apoptosis a las células T y 2) Evaluar la participación del ligando de Fas en la evasión de la respuesta inmune celular.

En este estudio empleamos como células inductoras de apoptosis las líneas celulares: SiHa y CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18), C-33 A (HPV negativo) y como células blanco de inducción de apoptosis, la línea celular Jurkat que juega el papel de célula inmune ya que se trata de una célula que pertenece al linaje del linfocito T.

La apoptosis de células T (células Jurkat) se determinó mediante tinción con anexina V-FITC/yoduro de propidio y tinción de TUNEL, ambas cuantificadas por citometría de flujo y valorando 10,000 eventos en cada caso, después de co-cultivarlas durante 24 horas con las diferentes líneas de células tumorales o sus sobrenadantes. En todos los cultivos mixtos de células de cáncer cervical con Jurkat se observó inducción de apoptosis significativa de las cel. linfoides; así como en la incubación de las cel. T con los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Con el objetivo de evitar la liberación de la forma soluble del ligando de CD95, utilizamos el inhibidor de las metaloproteasas de matriz extracelular. En estos experimentos se observó que las monocapas de las células de cáncer cervical indujeron apoptosis incluso más intensa en las cel. Jurkat, y que no se liberó a los sobrenadantes alguna molécula capaz de ejercer un efecto apoptótico en las cel. T. Para investigar si el ligando de CD95 participa en esta inducción de apoptosis sobre las cel. linfoides, utilizamos el anticuerpo anti-FasL para bloquear la actividad biológica del ligando tanto en la forma membranal como la soluble, en este caso observamos que en los cultivos celulares, el ligando de CD95 es el responsable de la inducción de apoptosis en las cel. Jurkat. Sin embargo en los sobrenadantes participa una molécula inmunosupresora diferente al CD95L que es capaz de ejercer un efecto apoptótico en las cel. T. Por lo que es importante explorar si se puede interferir en la expresión del CD95L en la membrana de las células transformadas, para contribuir en el diseño de nuevas terapias contra el cáncer cervical.

V. ABSTRACT

Cervical cancer is the leading cause of death due to cancer in Mexican women. The human papilloma virus (HPV) has been mentioned as a causal agent for this disease. The host's cellular immune response, especially the biological activity of cytotoxic T lymphocytes, is particularly important in fending off both viral infection and transformed cells. On encountering its target cell, the cytotoxic T lymphocyte is capable of inducing apoptosis, mainly by two mechanisms: one through production of perforins and granzymes and the other through interaction with the CD95 (Fas) receptor. The CD95 receptor is located on the surface of the target cell and its ligand is the CD95L (FasL) molecule, which is found in the cytotoxic T lymphocyte. This ligand exists in two biologically active forms: the membrane associated protein and the soluble. The CD95 receptor is commonly found in many cell types, in addition to the cytotoxic T lymphocyte, which is also susceptible to apoptosis when it suffers damage or aging. However, neoplastic cells have mechanisms that allow them to evade the host's immune response, which include production of immunosuppressor molecules and use of the CD95/CD95L signaling pathway. The transformed cell is capable of inducing apoptosis in the T lymphocyte by means of the CD95/CD95L mechanism, due to the presence on the surface of the transformed cell of overexpressed FasL, which interacts with its receptor, which is present in legitimate form in the cytotoxic T lymphocyte. Thus, it efficiently evades the host's response and the malignant cells proliferate successfully in the organism.

The objectives of this paper are: 1) To determine if transformed cervical uterine cancer cells induce apoptosis in T cells, and 2) To assess the participation of the Fas ligand in evasion of the cellular immune response.

In this study we used as apoptosis inducing cells the cell lines: SiHa and CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18), C-33 A (HPV negative), and as target of apoptosis induction the Jurkat cell line, which plays the part of immune cell as it is a cell that belongs to the lineage of the T lymphocyte.

T cell (Jurkat cell) apoptosis was confirmed by means of staining with annexin V-FITC/propidium iodide and TUNEL assay, both quantified by flow cytometry and evaluating 10,000 events in each case, after co-culturing them for 24 hours with the different tumor cell lines or their supernatants. We observed significant induction of apoptosis in lymphoid cells in all the mixed cultures of cervical cancer and Jurkat cells, as well as in incubation of T cells with the supernatants from the cell cultures.

To prevent the release of the soluble form of the CD95 ligand, we used an extracellular matrix metalloprotease inhibitor. In these experiments, we observed that cervical cancer cells expressing membrane associated CD95L induced even more intense apoptosis on Jurkat cells than untreated monolayers and supernatants of cancer cells treated with MMPI produced no apoptotic effect on Jurkat cells. To investigate whether the CD95 ligand participates in this induction of apoptosis in lymphoid cells, we used the anti-FasL antibody to block the ligand's biological activity in both the membranal and soluble forms. In this case we observed that in the cell cultures the CD95 ligand is responsible for inducing apoptosis in the Jurkat cells; however, in the supernatants an immunosuppressor molecule different from CD95L participates, which is capable of producing an apoptotic effect in the T cells. For this reason, it is important to explore the possibility of interfering in CD95L expression in transformed cell membranes, to contribute to the development of new therapies for cervical cancer.

VI. INTRODUCCIÓN

VI.1 CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad genética compleja resultado de mutaciones y alteraciones en genes que codifican para elementos cruciales en los procesos de regulación y señalización celular. En la célula dañada se da una mutación inicial que provoca una proliferación monoclonal descontrolada, esta población celular acumula alteraciones en su genoma que poco a poco la conducen a una transformación celular (Alison, 2001).

En los humanos la carcinogénesis es un proceso que se desencadena en varias etapas, es decir se van acumulando alteraciones en el genoma celular, en un principio la célula transformada no obedece las señales de arresto del ciclo celular en respuesta al daño o alteración del material genético. Este tipo de célula no necesita el estímulo de factores de crecimiento para entrar en ciclo mitótico sostenido, por lo que también se dice que tiene un potencial replicativo infinito. Así mismo la célula transformada es capaz de desarrollar una angiogénesis continua para procurarse un abastecimiento de oxígeno y nutrientes constante. La célula transformada también utiliza los nuevos vasos sanguíneos para invadir otros tejidos y formar nuevas masas tumorales a distancia, lo que se conoce como metástasis. Una característica importante de las células neoplásicas es su capacidad de evadir la apoptosis cuando se enfrentan a células del sistema inmune, ya que las células tumorales son capaces de inducir apoptosis en los linfocitos T y las células NK, por lo que se piensa que se trata de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune celular (Hanahan y Weinberg, 2000).

VI.2 CÁNCER CERVICAL.

Se considera el segundo tipo de cáncer más común en el mundo, se reportan casi medio millón de nuevos casos y aproximadamente 233,400 muertes al año (Ghim y col, 2002), se ha estimado que en los países en vías de desarrollo se originan el 80% de casos de cáncer cervical en el mundo (Muñoz et al, 2003).

En nuestro país, este padecimiento es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, ya que reportes epidemiológicos han documentado que al año mueren aproximadamente 4,000 mujeres. Es muy importante el diagnóstico oportuno ya que

durante los primeros estadios esta enfermedad puede ser tratada con éxito, aunque en teoría es una enfermedad prevenible, actualmente se le considera como un problema de salud pública (Flores et al, 2003).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad se consideran relevantes el inicio temprano de la vida sexual, el número de parejas sexuales, la edad del primer parto, el estado inmunológico del paciente y de manera muy importante la infección por virus del papiloma humano (HPV) el cual se adquiere por transmisión sexual (zur Hausen, 2002).

Se ha observado que la circuncisión puede reducir el riesgo de adquirir y transmitir el HPV, en un estudio se muestra que los hombres judíos circuncidados tienen tres veces menos la posibilidad de albergar el genoma del HPV en células de su aparato reproductor y de manera importante también se reduce la probabilidad de que sus parejas femeninas desarrollen cáncer cervical (Castellsagué, 2003).

El genoma del HPV se ha detectado en el 99 % de las células de cáncer cérvico uterino (CaCU), de éstas el 30.3% corresponde al subtipo HPV-16, 8.2% al subtipo HPV-18, 4.8% al subtipo HPV-31 y 3.9% al subtipo HPV-45. (Bosch y col, 2002).

VI.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

Este virus es capaz de alterar el funcionamiento de la célula epitelial, su genoma consta de una molécula de ADN circular de doble cadena de 7904 pares de bases (en el HPV-16) protegidas por una cápside compuesta por 72 capsómeros. Es un virus que carece de envoltura, es de simetría icosaédrica y tiene un diámetro de 52 - 55 nm. Su transmisión es por contacto sexual y se ha estimado que al menos el 50% de los adultos sexualmente activos han padecido al menos una infección por algún tipo de HPV (zur Hausen, 2000). El HPV tiene un alto tropismo hacia células epiteliales y se ha propuesto que el complejo de integrinas $\alpha_6\beta_4$ sirve de receptor para este virus en la célula a infectar. La expresión del complejo de integrinas $\alpha_6\beta_4$ se da exclusivamente en células que constituyen la capa basal del epitelio estratificado escamoso y se pierde esta expresión en cuanto la célula empieza su proceso de diferenciación (Evander, 1997). Este dato

concuenda con el hecho de que la infección viral se da en las capas basales en donde los queratinocitos son capaces de proliferar.

El genoma del HPV contiene ocho marcos de lectura abiertos, las secuencias reguladoras de la replicación y la transcripción viral se concentran en una región no codificante y los productos de los genes virales se han dividido en proteínas de expresión temprana y de expresión tardía. Figura 1.

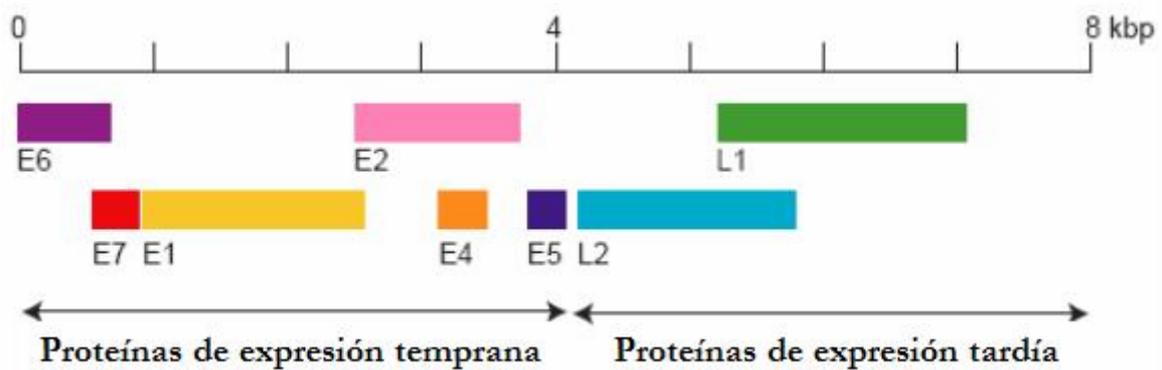


Figura 1. Se muestra el genoma en forma lineal del HPV-16 en donde están representados los genes de expresión temprana (E) y los de expresión tardía (L). Modificado de Man, 1998.

La función de las diferentes proteínas codificadas por el HPV se resume en la siguiente tabla.

Tabla 1. Función de las proteínas codificadas por el HPV.

Proteína	Función
E1	Involucrada en la iniciación de la replicación del DNA viral
E2	Regula la transcripción viral
E4	Altera el citoesqueleto de la célula huésped, rompe estructuras de citoqueratina
E5	Oncoproteína. Forma complejos con receptores de factores de crecimiento Favorece la integración del DNA viral a la célula infectada. Interfiere con el tráfico vesicular.
E6	Oncoproteína. Involucrada en la degradación de p53, activa la telomerasa de la célula infectada
E7	Oncoproteína. Inactiva a la proteína Rb
L1	Componente principal de la cápside
L2	Es específica para cada tipo de HPV y es componente de la cápside

Tomada de Fehrmann y Laimins (2003).

VI.4 APOPTOSIS.

La apoptosis es un proceso fisiológico normal controlado genéticamente que se da en todos los organismos multicelulares mediante el cual las células dañadas, infectadas o que han envejecido activan mecanismos que conducen a su propia eliminación, es por eso que a este proceso también se le llama suicidio celular o muerte celular programada. Desde el punto de vista celular y molecular la apoptosis se desarrolla en tres etapas: 1) Inducción 2) Ejecución y 3) Formación de cuerpos apoptóticos (Yang y Yu, 2003).

La inducción de apoptosis se da frente a un estímulo o señal adecuada, que puede ser extracelular (mediada por receptores) o procedente de la propia célula (pérdida del potencial de membrana de la mitocondria). Algunos estímulos positivos en la inducción de apoptosis son la supresión de factores de crecimiento, el daño al DNA que no es susceptible de repararse, la unión de ligandos como CD95L (también conocido como FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF) a sus receptores CD95 (Fas) y TNFR respectivamente. Es importante mencionar que CD95 y TNFR pertenecen a la misma familia de receptores de muerte (Ashkenazi y Dixit, 1998).

La segunda etapa de la apoptosis (ejecución) consta de diferentes alteraciones que conducen a la muerte de la célula, entre ellas podemos mencionar contracción del citoplasma, pérdida de la organización de la membrana plasmática (la fosfatidil serina se transloca al exterior de la célula), condensación de la cromatina que deriva en la fragmentación del ADN y pérdida de la adhesión celular. Estas alteraciones son el resultado de la acción de caspasas y nucleasas. Las caspasas son una familia de proteasas que tienen un residuo de cisteína en el sitio activo de la proteína, en la célula existen como zimógenos y se dividen en caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y caspasas ejecutoras (3, 6 y 7). Las primeras llevan a cabo un corte proteolítico sobre sí mismas y de ésta forma son activadas de tal manera que después pueden actuar sobre el zimógeno de las caspasas ejecutoras confiriéndoles capacidad funcional para degradar proteínas que mantienen la integridad de la célula. Las nucleasas se encargan de romper el DNA internucleosomal, lo que da lugar a fragmentos cuyo tamaño es múltiplo de 200 pares de bases, fácilmente detectables por electroforesis en gel (Fink y Cookson, 2005).

En la última fase de la apoptosis, la célula se destruye sin liberar su contenido al medio extracelular y los cuerpos apoptóticos que se forman son reconocidos y fagocitados por macrófagos o granulocitos. Al no liberar su contenido celular no hay daño a las células vecinas y no se activa una reacción inflamatoria, a diferencia de la necrosis en donde la célula libera su contenido al medio extracelular sin control alguno en respuesta a una muerte súbita producida por un daño físico (Jesenberger y Jentsch, 2002).

Para medir la apoptosis en células individuales se utilizan características que definen a la célula apoptótica: la alteración en la organización de la membrana plasmática y la fragmentación del DNA genómico. Ya que la exposición de la fosfatidil serina ocurre en etapas más tempranas durante la apoptosis, los ensayos que utilizan este parámetro son capaces de identificar un estadio más temprano en una célula en proceso de apoptosis que los ensayos basados en la fragmentación del DNA.

La apoptosis es un proceso muy importante en los organismos multicelulares ya que en un inicio participa activamente en el adecuado desarrollo embrionario y posteriormente contribuye a mantener la homeostasis en los diferentes tejidos.

VI.5 RECEPTOR CD95 (Fas)

En humanos el gen que codifica para este receptor se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 y codifica para una glicoproteína de 325 aminoácidos con un peso de 48 kD que está dividida en tres regiones: una extracelular que contiene tres dominios ricos en cisteína necesarios para la unión de su ligando en el extremo amino terminal. Se ha documentado que la pérdida de estos repetidos de cisteína impide que el ligando reconozca a su receptor, lo que deriva en que la señalización hacia el interior de la célula se interrumpa. Fas también tiene una región transmembranal y una citoplasmática en donde se localiza el llamado “dominio de muerte” que consta de 80 aminoácidos, es por medio de esta región que se transmite la señal que desencadena la apoptosis en la célula en donde se ha activado la vía de señalización mediada por este receptor y su ligando (Krammer, 2000).

Por su estructura Fas se ha clasificado en una proteína de membrana tipo I perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) en donde también se encuentran TNFR1 y 2, DR4 y 5. Esta familia de receptores está involucrada en procesos biológicos como inflamación, proliferación, actividad antiviral y sobre todo muerte celular (Sharma et al, 2000).

CD95 se encuentra expresado en una gran cantidad de tejidos de manera normal, ya que a través de la señal que transmite permite la remoción de células que han de morir vía apoptosis. Sin embargo se ha documentado la presencia de este receptor en la membrana de células provenientes de diversas masas tumorales, por ejemplo: cáncer de colon, de mama, de próstata y neuroblastoma, en estos casos el receptor fue capaz de transmitir adecuadamente la señal de apoptosis cuando se utilizaron anticuerpos con un efecto agonista al de su ligando, lo que ha llevado a pensar que esta vía de señalización podría utilizarse como blanco terapéutico en un futuro. (Timmer et al, 2002). También se sabe que en las células tumorales es frecuente encontrar mutaciones en la región transmembranal y en el llamado dominio de muerte del CD95, lo que provoca que la señal mediada por este receptor y su ligando no se transmita correctamente en la célula neoplásica, por lo que esta célula no morirá vía apoptosis aún cuando un linfocito T citotóxico la reconozca y acople su ligando CD95L al receptor CD95 de la célula tumoral (Alcami y Koszinowski, 2000).

VI.6 LIGANDO DE CD95 (FasL)

El ligando de Fas al unirse a su receptor desencadena la vía de señalización que lleva a la apoptosis, por lo tanto la expresión de este ligando se encuentra restringida a células del sistema inmune como son los linfocitos T activados, las células NK aunque también se encuentra su expresión en las células de Sertoli en la gónada masculina, en el epitelio de la córnea, la retina y en la placenta, es decir, en los sitios inmunológicamente privilegiados. Se sabe que algunas células provenientes de masas tumorales expresan de manera anormal el ligando de CD95, lo que podría ayudarlas a evadir la respuesta inmune del huésped (Seino et al, 1998), este punto se tratará con más detalle en los antecedentes de este trabajo.

El gen que codifica para este ligando se localiza en los humanos en el brazo largo del cromosoma 1, el producto de este gen es una glicoproteína compuesta por 281 aminoácidos con un peso de 40 kD. Este receptor tiene un extremo amino terminal citosólico mientras que el extremo carboxilo terminal es extracelular, por su estructura se dice que este ligando es una proteína tipo II y pertenece a la familia TNF, los miembros de esta familia pueden existir como formas solubles con actividad biológica, por ejemplo TNF α (Xiao et al, 2002).

En el caso de FasL se sabe que es liberado al medio extracelular por la acción de la metaloproteasa de matriz extracelular No. 7 llamada matrilisina. El corte de esta enzima se lleva a cabo entre los aminoácidos 129 y 130, lo que produce un polipéptido de 152 aminoácidos con un peso molecular de 26-27 kD. Por lo que el FasL puede existir en dos formas biológicamente activas, la membranal y la soluble en el medio extracelular. Esta última es funcional si se encuentra como homotrímero con un peso estimado de 81 kD (Nayagaki et al, 1995 y Stamenkovic, 2000).

VI.7 VÍA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR CD95/CD95L

La vía de señalización se inicia cuando un homotrímero del ligando de CD95 reconoce y se une a su receptor CD95 que está formando un complejo de homotrímeros pre-asociados en la membrana celular, cuando el ligando reconoce a este complejo se activa el reclutamiento de otras proteínas a la parte citosólica del receptor llamada “dominio de muerte” que en su conjunto forman el complejo de señalización inductor de

muerte (DISC por sus siglas en inglés), la formación de este complejo es dependiente de filamentos de actina (Algeciras et al, 2002).

La proteína FADD permite una comunicación entre el dominio de muerte de CD95 y la pro-caspasa 8 que existe en dos isoformas en el citoplasma celular, para que se transmita la señal necesaria para que la pro-caspasa 8 adquiera funcionalidad a través de un autoprosesamiento catalítico, es entonces que esta caspasa iniciadora actúa sobre el zimógeno de la caspasa 3 activándola para que pueda degradar diferentes sustratos que inducen los cambios morfológicos característicos de la muerte celular vía apoptosis (Peter y Krammer, 2003; O'Connell, 2001).

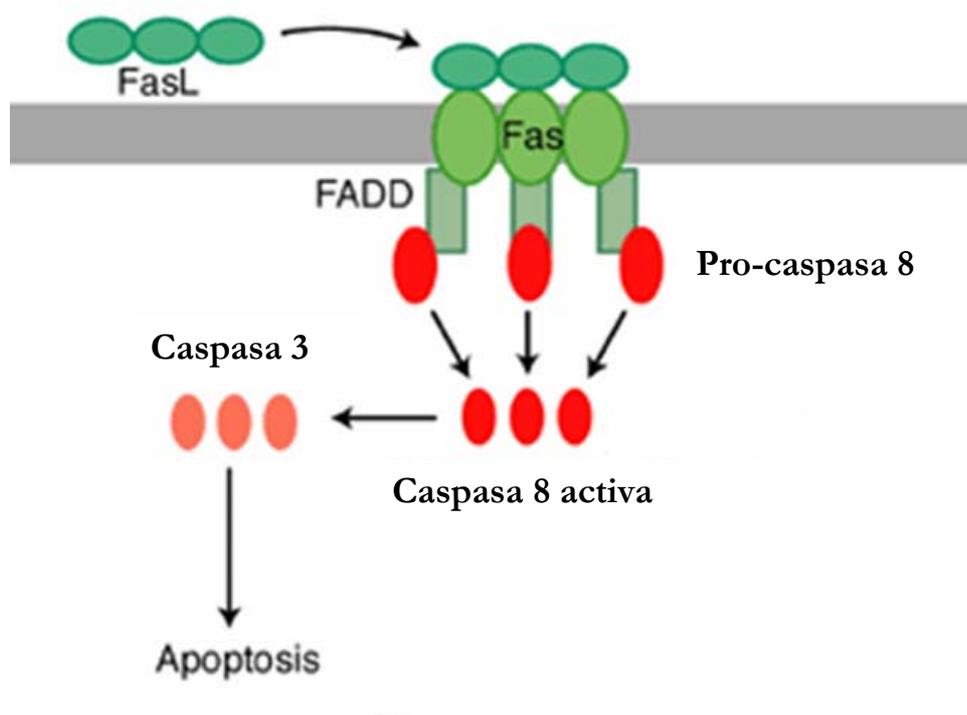


Figura 2. Cascada de señalización de mediada por CD95 y su ligando, el resultado es la muerte celular vía apoptosis. Tomado de Man (1998).

VII. ANTECEDENTES

Cuando en el organismo se presenta una infección viral, como es el caso de la infección causada por el HPV, el sistema inmune responde principalmente mediante la respuesta inmune celular que involucra a los linfocitos T citotóxicos, los macrófagos y las células NK. Estas estirpes celulares son capaces de eliminar células marcadas para desecho, ya que les inducen apoptosis por medio de la secreción de citocinas como TNF, Interferón- γ , la liberación de perforinas y granzimas o la activación de la vía de señalización mediada por CD95/CD95L. Este receptor se encuentra expresado en la superficie de la célula infectada y el ligando CD95L se encuentra en estas células especializadas del sistema inmune.

Para que los linfocitos CD8⁺ lleven a cabo su función antiviral primero tienen que reconocer a la célula infectada, esto es posible a través de los antígenos virales presentados como fragmentos peptídicos asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (Alcami y Koszinowski, 2000).

Se ha dicho que el cáncer cervical es un proceso multifactorial ya que la sola presencia del HPV no es suficiente para el desarrollo de este tipo de cáncer. En muchos casos la infección logra ser controlada por la respuesta inmune celular, pero cuando en el individuo se encuentra inmunosuprimido, es común observar el desarrollo abundante de verrugas asociadas a la infección por HPV. También se sabe que el HPV es capaz de alterar las funciones de las células que infecta, una de las más comunes es la expresión baja o nula de moléculas del MHC-I, es decir el HPV puede limitar el procesamiento y la expresión de antígenos virales para que no sean expuestos para su reconocimiento por las células del sistema inmune. Durante las primeras etapas de la infección por el HPV en las células del epitelio basal, la expresión de las proteínas virales está confinada al núcleo, además la expresión de proteínas de la cápside (L1 y L2) no ocurre hasta que la célula infectada entra en sus últimas etapas de diferenciación, con esto, las células inmunocompetentes tienen menos acceso para reconocer y eliminar a la célula infectada (Scott M et al. 2001).

Las primeras proteínas virales que se expresan durante la infección por HPV corresponden a las proteínas tempranas (E). De éstas, las que son esenciales para la

transformación maligna de la célula son las proteínas E6 y E7, por lo que muchas veces se les denomina oncoproteínas. Además de las funciones de E6 y E7 indicadas en la tabla 1 en relación a la apoptosis, éstas oncoproteínas pueden alterar la expresión génica en la célula transformada mediante la regulación de factores de transcripción que tienen que ver con el crecimiento o la muerte celular programada (Finzer et al., 2002).

Se ha reportado que las células transformadas expresan el ligando de CD95 de manera anormal, esta expresión aberrante ha demostrada en cáncer de vejiga (Hyung et al, 1999), sarcoma (Mitsiades et al, 1998), melanoma (Hahne et al, 1996), cáncer de colón (O'Connell et al, 1996), de hígado (Strand et al, 1997), de pulmón (Niehans et al, 1997), de ovario (Rabinowich et al, 1998), de tiroides (Mitsiades, 1999) y riñón (Uzzo et al, 1999).

En nuestro laboratorio hemos determinado previamente que las células de cáncer cervical como son SiHa, HeLa, CaSki y C-33 A expresan el ligando de CD95, de manera interesante todas ellas expresaron el CD95L en la misma intensidad (Reyes Ibarra, tesis de maestría 2002) lo que llevó a investigar si el ligando pudiera ser funcional y ejercer un efecto apoptótico en las células del sistema inmune. Si sucediera así, estaríamos hablando de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune celular que a la célula neoplásica le permite permanecer en el organismo por años hasta que las lesiones pre-malignas se tornan en tumores bien constituidos.

VIII. JUSTIFICACIÓN.

El agente etiológico que está involucrado en el desarrollo del cáncer de cuello uterino es el HPV, la infección por este virus es altamente contagiosa ya que el uso del preservativo ofrece una protección limitada pues es común la presencia de células infectadas por el virus fuera del área genital (zur Hausen, 2000).

Actualmente es un problema importante de salud pública, constituye el segundo tipo de cáncer más común en el mundo ya que se diagnostican alrededor de 400,00 nuevos casos al año. En América Latina constituye cerca del 30% del total de neoplasias femeninas y afecta principalmente a las mujeres en edad reproductiva y económicamente menos favorecidas (Cervantes, 2003).

Esta patología es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas, los datos epidemiológicos muestran que en nuestro país esta enfermedad es responsable de aproximadamente 4,000 muertes cada año a la edad promedio de 48 años y que el 74% de estas defunciones ocurre entre los 30 y 64 años de edad (Flores y col, 2003).

Las células transformadas desarrollan estrategias para evadir la respuesta inmune del huésped, por lo que es importante estudiar la participación del mecanismo dependiente del ligando de Fas que está presente de manera anormal en las células neoplásicas. A fin de apoyar la hipótesis de que probablemente esté involucrado en la progresión de eventos que conducen al desarrollo del cáncer cérvico uterino.

IX. HIPÓTESIS.

Si las líneas celulares derivadas de cáncer cervical son capaces de expresar CD95L, también deben ser capaces de inducir apoptosis en linfocitos T.

X. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el CD95L expresado en células derivadas de cáncer cervical induce apoptosis en linfocitos T *in vitro*, y que esto contribuye al mecanismo de escape de la respuesta inmune celular.

XI. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Demostrar *in vitro* la actividad biológica del ligando de CD95 presente en las células derivadas de cáncer cervical.
- 2.- Corroborar la participación del ligando de CD95 en la inducción de apoptosis en linfocitos T mediante su neutralización con el anticuerpo específico del CD95L.
- 3.- Demostrar que el inhibidor de metaloproteasa de matriz evita la liberación de la forma soluble del ligando de CD95.
- 4.- Determinar si la presencia de HPV tiene alguna influencia sobre la inducción de apoptosis en los linfocitos T.
- 5.- Establecer métodos para la detección de apoptosis en las células T inducida por líneas celulares de cáncer cervical.

XII. MATERIALES Y MÉTODOS.

XII.1 LÍNEAS CELULARES.

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer cérvico uterino: SiHa y CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18) y C-33 A (HPV negativo), estas monocapas se mantuvieron y propagaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 1.0 mM piruvato de sodio, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina. Las células se propagaron en una incubadora a 37° C y 5% de CO₂.

Como modelo de linfocitos T se utilizaron células Jurkat, clona E6-1 lote 3563160 de ATCC (donadas por los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V.) estas células derivan de leucemia, crecen en suspensión y se mantuvieron y propagaron en medio RPMI 1640 suplementado incubandose a 37° C y 5% de CO₂.

XII.2 ENSAYOS DE APOPTOSIS.

Para observar la apoptosis existen varias metodologías que se fundamentan principalmente en las alteraciones de la membrana plasmática y la fragmentación del DNA durante la muerte celular. Los ensayos de apoptosis que se utilizaron fueron los siguientes:

XII.3 Tinción con anexina V-FITC / yoduro de propidio.

En una célula viable la fosfatidil serina se encuentra en la parte citosólica de la membrana plasmática, después de la inducción de apoptosis se llevan a cabo alteraciones en la organización de los fosfolípidos de la membrana por lo que la fosfatidil serina ahora se encuentra expuesta en la superficie de la célula y es entonces que la anexina V acoplada a fluoresceína (FITC) se une a esta molécula expuesta. El yoduro de propidio es un colorante vital y no es captado por células viables, con esta tinción doble es posible discriminar mediante citometría de flujo entre células viables (negativas para anexina V-FITC y para yoduro de propidio), células en apoptosis temprana (positivas para anexina V-FITC y para yoduro de propidio), células en apoptosis tardía (positivas para anexina V-FITC y para yoduro de propidio) y células necróticas (positivas para yoduro de propidio).

La tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (Calbiochem, No. catálogo PF032, donado por Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V.) se realizó de la siguiente manera, las células Jurkat se lavaron tres veces con PBS 1X 4° C para eliminar el medio de cultivo (centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C), se resuspendieron en el buffer de unión para la anexina V-FITC (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4) y se agregaron 200 µg/ml de anexina V-FITC, se homogenizó y se dejó incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante diez minutos, realizando una agitación suave en los primeros 5 minutos de incubación. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron y resuspendieron nuevamente con buffer de unión, pero esta vez se agregaron 30 µg/ml de yoduro de propidio, la incubación se realizó en las mismas condiciones que para la anexina V-FITC. Posteriormente las células se lavaron y resuspendieron en buffer de unión, la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo (FACS Calibur, Becton & Dickinson), en donde se analizaron 10,000 eventos por experimento.

XII.4 Marcaje de extremos libres del DNA (tinción de TUNEL).

Cuando una célula está en apoptosis, las endonucleasas generan grupos 3'-OH libres en los extremos del DNA fragmentado, la enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) cataliza la incorporación de los desoxinucleótidos marcados con fluoresceína en los extremos de los fragmentos del DNA y por medio de la fluorescencia es posible cuantificar células en apoptosis en una población. Para el marcaje de los extremos libres de DNA se utilizó el kit Fluorescein-FragEL que se evalúa por medio de citometría de flujo (Calbiochem, No. catálogo QIA39). La tinción se realizó de la siguiente manera: las células Jurkat se lavaron centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos a 8° C para eliminar el medio de cultivo celular. El paquete celular se resuspendió en formaldehído al 4% en PBS 1X y se dejó incubar diez minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células y se resuspendieron para fijarlas en etanol al 80%, se eliminó el etanol y las células se resuspendieron en TBS 1X (20 mM Tris y 140 mM NaCl, pH 7.6) se dejaron incubar quince minutos a temperatura ambiente, posteriormente se descartó el TBS. Las células se resuspendieron en una solución de proteinasa K 1:100 en Tris 10 mM, se dejaron incubar a temperatura ambiente durante

cinco minutos. Para la reacción de marcaje, las células se lavaron y resuspendieron en el buffer de equilibrio TdT 1:5 en agua bi-distilada, se dejaron incubar durante treinta minutos, se hizo un lavado y posteriormente se preparó la reacción de marcaje que contenía la mezcla de desoxinucleótidos marcados con fluoresceína y la enzima TdT. Las células se resuspendieron usando el medio para la reacción de marcaje y se dejaron incubar durante noventa minutos a 37° C en la oscuridad, transcurrido ese tiempo se lavaron dos veces en TBS 1X y se cuantificó la fluorescencia de 10,000 eventos utilizando un citómetro de flujo (FACS Calibur, Becton & Dickinson)

XII.5 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CO-CULTIVOS.

En cajas de Petri estériles P60 se sembraron individualmente 2.5×10^5 cel/mL de las líneas celulares de cáncer cérvico uterino SiHa, Caski, HeLa y C-33 A, una vez que las monocapas alcanzaron la confluencia, se lavaron con PBS 1X estéril y se les adicionó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado; después de 24 horas se retiró el sobrenadante de estas monocapas y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, este sobrenadante se puso en contacto con 1×10^6 de células Jurkat en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado y se dejaron incubar durante 24 horas a 37° C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo las células Jurkat se recuperaron y se procedió a medir su apoptosis por dos técnicas diferentes: La tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio y el marcaje de extremos libres de ADN (TUNEL).

Luego de remover el sobrenadante de las células en monocapa de cáncer cérvico uterino se lavaron con PBS 1X estéril y se les agregó 1×10^6 de células Jurkat en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado. El co-cultivo se mantuvo durante 24 horas a 37° C y 5% de CO₂ y después de este tiempo se recuperaron las células Jurkat para medir su apoptosis utilizando las técnicas ya mencionadas. Ver figura 3.

Como control positivo de inducción de apoptosis se utilizaron células Jurkat incubadas con el anticuerpo anti-Fas 0.5 µg/mL (R&D Systems, No. catálogo MAB142, donado por los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas S.A. de C.V.) y también Actinomicina D 0.2 µg/mL (Alexis Biochemicals, No. catálogo ALX-380-009) durante

24 horas. Como control negativo de inducción de apoptosis se utilizaron células Jurkat sin tratamiento.

XII.6 TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE METALOPROTEASA DE MATRIZ EXTRACELULAR (MMPI).

El ligando de Fas existe en dos formas biológicamente activas, la membranal en donde el ligando permanece anclado a la membrana celular y la otra es como factor soluble, éste se genera por medio de un procesamiento o corte realizado por la metaloproteasa de matriz No. 7 que también se conoce como matrilisina. La acción de esta enzima puede ser bloqueada por el inhibidor de la metaloproteasa de matriz (MMPI) (Nayagaki et al, 1995 y Stamenkovic, 2000). En este trabajo se utilizó el inhibidor con la intención de evitar la liberación de la forma soluble del FasL y conservar todo el ligando de Fas anclado a la membrana de las células de cáncer cérvico uterino.

En la literatura se recomienda utilizar el MMPI a una concentración de 10 μM . La solución stock de este inhibidor se preparó utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como disolvente, por lo tanto para probar que el DMSO no fuera tóxico para las células Jurkat, a éstas se les agregó 10 μM de MMPI y se dejó incubar por 24 horas. Después de este tiempo se hizo una prueba de viabilidad valorando la exclusión del colorante vital azul tripano en estas células y se observó que el MMPI a la concentración de 10 μM no producía un efecto nocivo en las células Jurkat, ya que se obtuvo un 96% de viabilidad celular. La prueba de viabilidad se realizó según Barker (1998).

El MMPI se utilizó de la siguiente manera, se sembraron 2.5×10^5 cel/mL de las líneas de cáncer cérvico uterino, 24 horas después se lavaron con PBS 1X y se les adicionó medio RPMI 1640 suplementado y se agregó 10 μM de MMPI, las células se dejaron incubar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la inducción de apoptosis en co-cultivos y sobrenadantes de la manera que ya se describió, con la salvedad de que a los co-cultivos montados con las células de cáncer cérvico uterino se les volvió a adicionar 10 μM de MMPI ya que al retirar el sobrenadante tratado y adicionar las células Jurkat en medio de cultivo fresco, se pierde el efecto de inhibición de la matrilisina y el ligando de Fas se libera al medio extracelular.

XII.7 TRATAMIENTO SIMULTÁNEO DE MMPI Y EL ANTICUERPO

Anti-FasL.

Para determinar que la actividad apoptótica es debida al ligando de Fas presente en las células neoplásicas se realizó un ensayo en donde se neutralizó la actividad biológica del ligando de CD95, para esto se utilizó el anticuerpo anti-FasL humano recombinante (R&D Systems, No. de catálogo AF126, donado por los Laboratorios de Especialidades Inmunológicas, S.A. de C.V.) además de inhibir la liberación de la forma soluble del CD95L mediante la incubación con el MMPI.

El anticuerpo anti-FasL humano recombinante se resuspendió en PBS 1X estéril y se ajustó a una concentración de 500 ng/mL, se dejó incubar con las células Jurkat por 24 horas y se realizó la prueba de viabilidad celular según Barker (1998) por exclusión del colorante azul tripano, en donde se observó que este anticuerpo no era tóxico para las células Jurkat, ya que se obtuvo un 95% de células viables.

La prueba de inhibición de apoptosis mediante el anticuerpo anti-FasL humano recombinante se realizó de la siguiente manera, se sembraron 2.5×10^5 cel/mL de las líneas de cáncer cérvico uterino, cuando alcanzaron la confluencia, se lavaron con PBS 1X y se les adicionó 10 μ M de MMPI y 500 ng/mL de anti-FasL, las células se dejaron incubar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se montaron los co-cultivos como ya se describió, a las monocapas de cáncer cervical se les adicionó nuevamente 10 μ M de MMPI y 500 ng/mL de anti-FasL en el momento de agregar el medio RPMI 1640 suplementado, en donde se encontraban las células Jurkat. El co-cultivo se mantuvo durante 24 horas y después las células Jurkat se recuperaron para realizar el ensayo de apoptosis correspondiente. En el caso de los sobrenadantes, éstos se recuperaron y se dividieron en dos porciones, en una se utilizó el anticuerpo anti-FasL en la incubación con las células Jurkat y en la otra porción no se utilizó el anticuerpo. Ver figura 3.

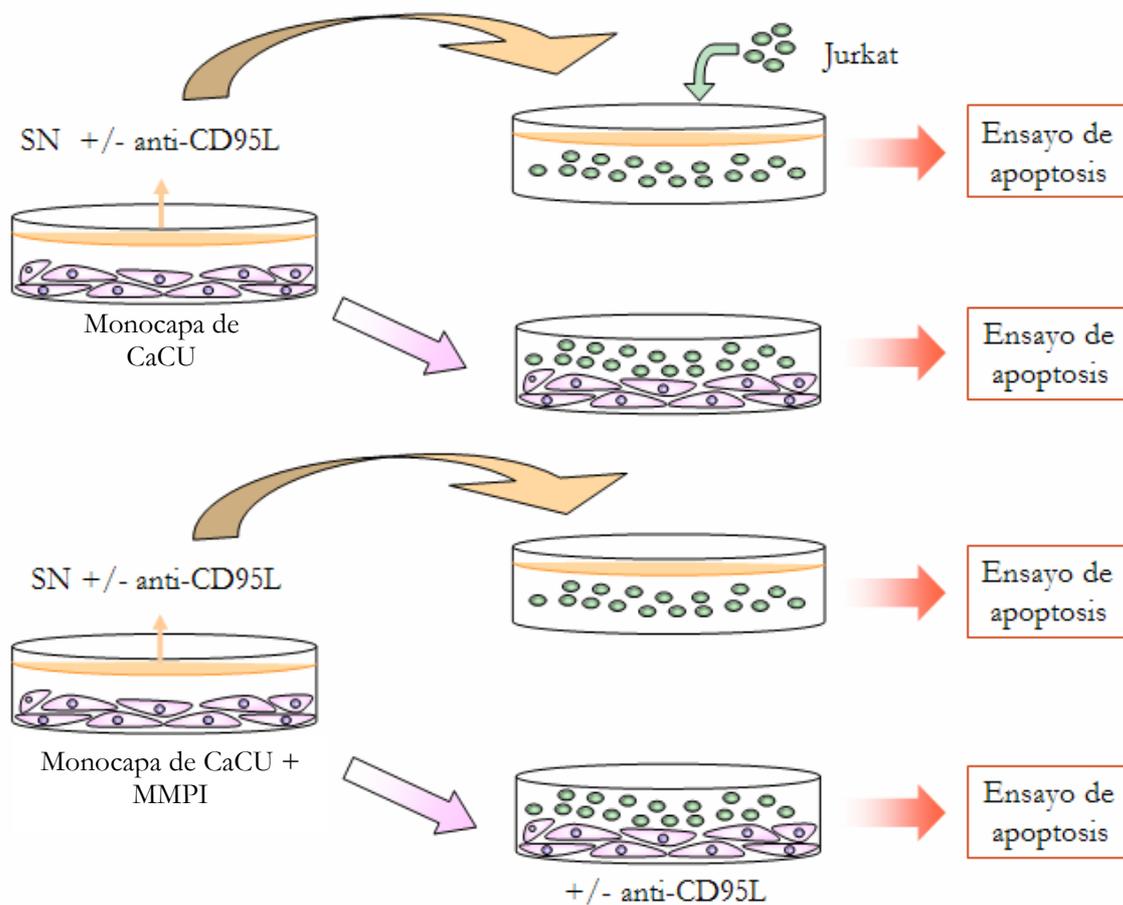


Figura 3. Diseño experimental empleado para la determinación de apoptosis de células Jurkat con los diferentes tratamientos. Se sembraron 2.5×10^5 cel/mL de las líneas de cáncer cérvico uterino (SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A), cuando las diferentes monocapas alcanzaron la confluencia se retiró el medio de cultivo de éstas y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se puso en contacto con 1×10^6 de células Jurkat en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado y se dejaron incubar durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo las células Jurkat se recuperaron y se procedió a medir su apoptosis por las metodologías de anexina V-FITC/yoduro de propidio y tinción de TUNEL. Las células en monocapa de cáncer cérvico uterino libres de sobrenadante, se lavaron con PBS 1X y se les agregó 1×10^6 de células Jurkat en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado, el co-cultivo se mantuvo durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 y después se recuperaron las células Jurkat para medir apoptosis.

En el esquema se indica cuándo se adicionó el MMPI ($10 \mu\text{M}$), así como el anticuerpo anti-FasL (500 ng/mL).

XIII. RESULTADOS

XIII.1 LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICAL INDUCEN APOPTOSIS EN LOS LINFOCITOS T.

Se sabe que las células Jurkat son susceptibles a la apoptosis por medio de la vía de señalización de CD95/CD95L (Koopman y col, 1994), por esa razón se utilizó el anticuerpo anti-human CD95 0.5 µg/mL como control positivo de inducción de apoptosis, después de 24 horas de estímulo se analizaron 10,000 eventos por citometría de flujo y se observó que el 15.6% de las células Jurkat fueron positivas a la tinción con anexina V-FITC y el 55.7% se tiñeron con anexina V-FITC e incorporaron yoduro de propidio. Se utilizó también actinomicina D 0.2 µg/mL durante 24 horas y en este caso se observó que el 37% de las células Jurkat se tiñeron con anexina V-FITC y el 47% se tiñeron con anexina V-FITC e incorporaron yoduro de propidio. Como control negativo de inducción de apoptosis se utilizaron células Jurkat sin tratamiento en donde se observó que el 96 % de células fueron negativas para la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Figura 4 panel superior.

Para determinar si las líneas celulares de cáncer cervical inducen apoptosis en los linfocitos T, se realizó un cultivo mixto de células Jurkat con líneas celulares de cáncer cervical [CaSki y SiHa (HPV-16), HeLa (HPV-18) y C-33 A (HPV negativo)], incubando durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se recuperaron las células Jurkat y se procedió a teñirlas con anexina V-FITC y yoduro de propidio. En forma paralela se realizó una incubación de células Jurkat con los sobrenadantes de estas monocapas, después de 24 horas se recuperaron los linfocitos T y entonces se realizó el ensayo de apoptosis utilizando la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Estos experimentos fueron hechos por triplicado y los resultados obtenidos se presentan en la figura 4, en donde se muestra un ensayo representativo.

En estos ensayos observamos que en todos los casos las monocapas de células tumorales de cáncer cervical como sus sobrenadantes indujeron apoptosis en las células Jurkat cuando se valoraron mediante la tinción de anexina V-FITC y yoduro de propidio.

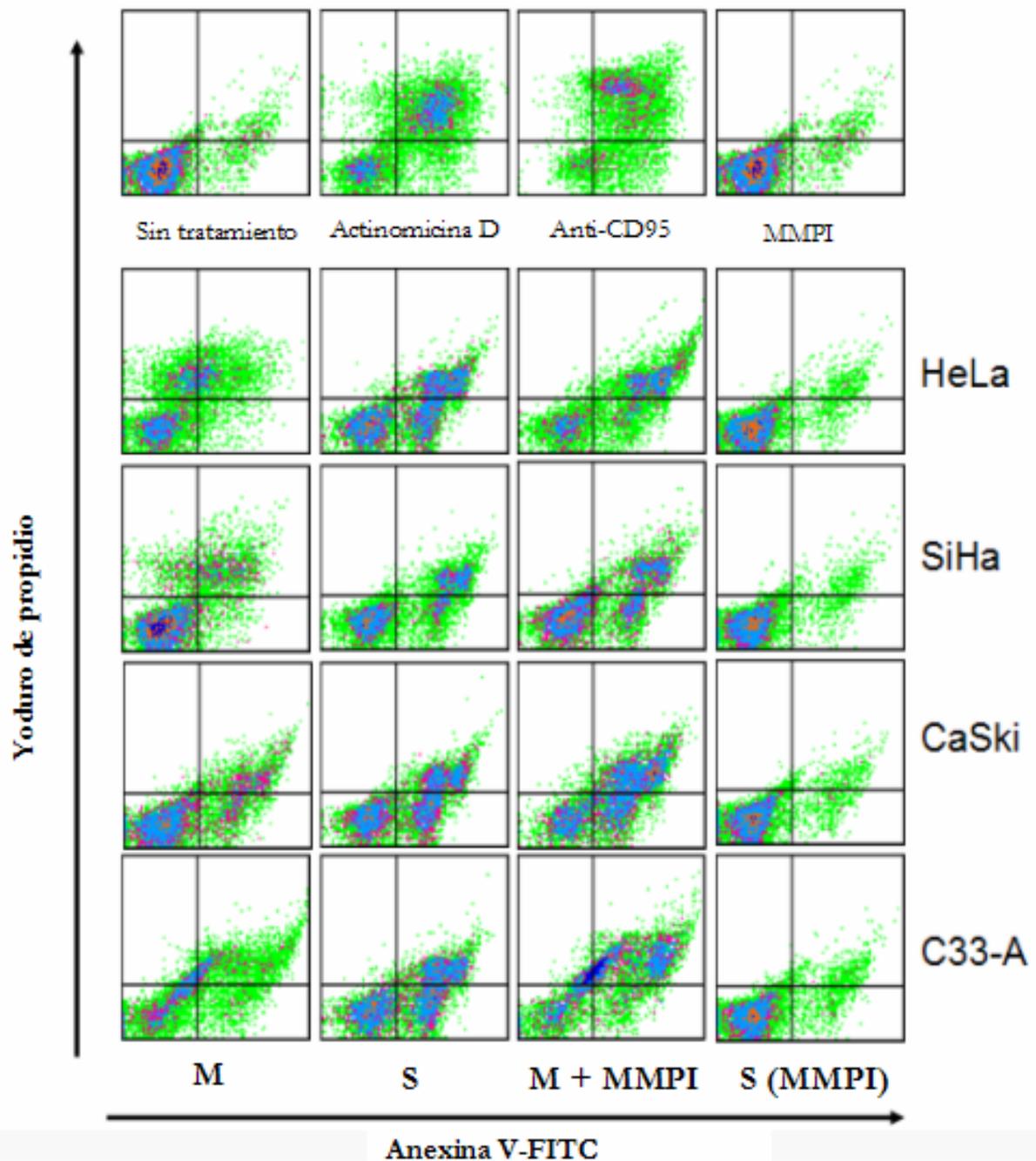


Fig. 4.- Apoptosis de células Jurkat co-cultivadas durante 24 h con las monocapas (M) o sobrenadantes (S) de líneas celulares de cáncer cérvico uterino (HeLa, SiHa, CaSki y C-33 A). Controles de inducción de apoptosis cuantificada por citometría de flujo usando la tinción de anexina V-FITC/Yoduro de propidio: células Jurkat sin tratamiento, tratadas con actinomicina D 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con anticuerpos monoclonales anti-CD95 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o incubadas con el inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular 10 μM (MMPI). Las letras se refieren a: M.- cultivo mixto de células Jurkat con la monocapa que se indica. S.- Incubación de células Jurkat con el sobrenadante de la monocapa que se indica. MMPI.- Tratamiento con MMPI a la monocapa que se indica. Se hicieron tres repeticiones de este experimento, la figura muestra un ensayo representativo.

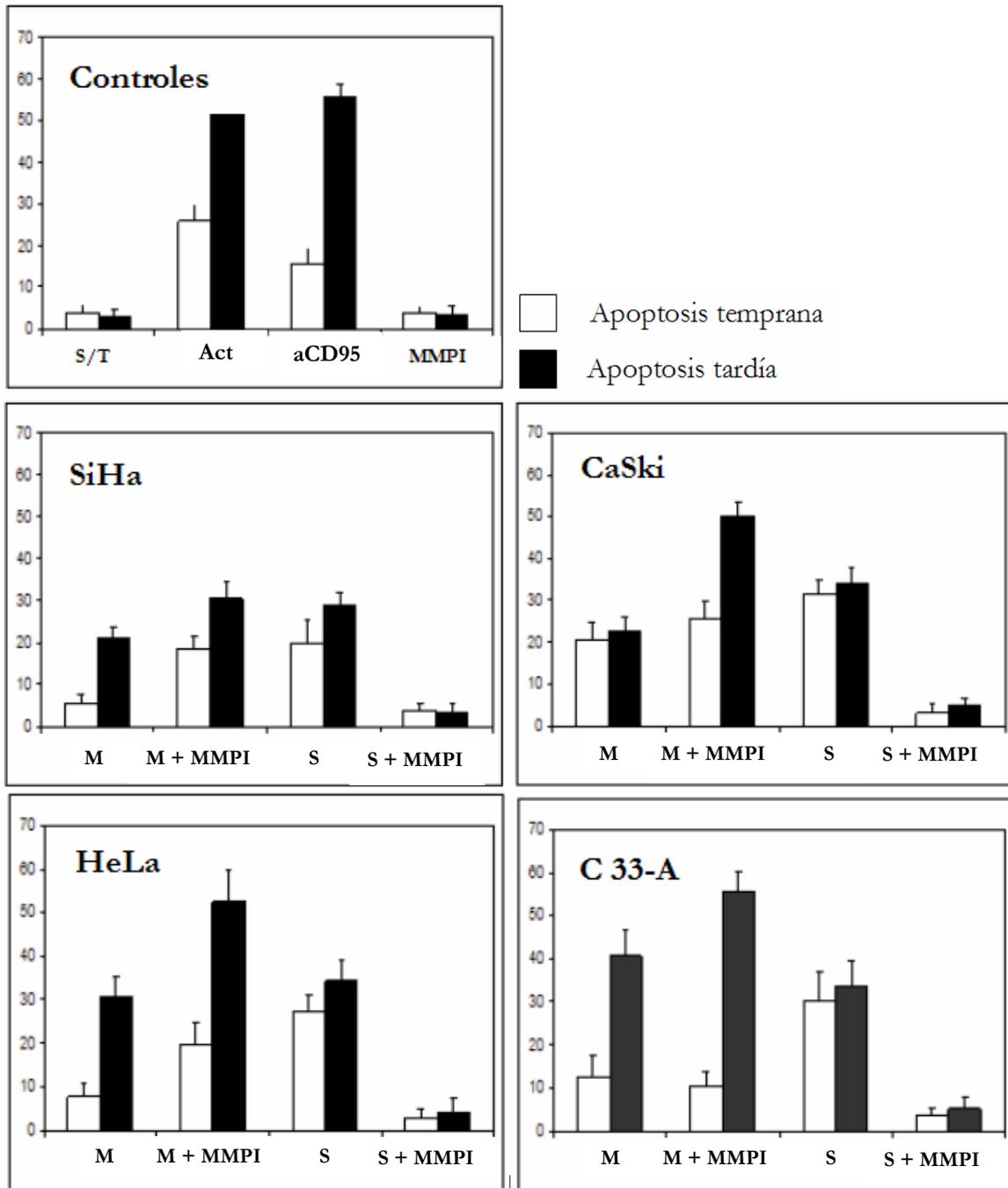


Fig. 5.- Apoptosis de células Jurkat co-cultivadas 24 h con monocapas o sobrenadantes de células SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A. En los controles se muestran células Jurkat sin tratamiento (S/T), tratadas con actinomicina D (Act), tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD95 (aCD95) o incubadas con el inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPI). Las letras se refieren a: M) monocapas de los cultivos celulares, M+MMPI) monocapas tratadas con MMPI, S) sobrenadantes de los cultivos y S+MMPI) sobrenadantes de los cultivos tratados con MMPI.

A fin de corroborar que las líneas celulares de cáncer cérvico uterino inducen apoptosis en los linfocitos T, se realizó el co-cultivo de células CaSki y C-33 A con Jurkat, así como la incubación de las mismas con los sobrenadantes de estas monocapas, pero en estos casos la apoptosis se evaluó utilizando la tinción de TUNEL, en la cual se detecta la fragmentación y degradación del ADN internucleosomal de la célula apoptótica. En este ensayo de apoptosis también se analizaron 10, 000 eventos por citometría de flujo y se utilizaron los mismos controles experimentales. En las figuras 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos.

Se realizó la incubación de células Jurkat con el anticuerpo anti-human CD95 0.5 µg/mL que tiene un efecto agonista sobre CD95L. Después de 24 horas de estímulo se observó que el 78.34 % de las células analizadas fueron positivas a la tinción de TUNEL. En el caso de la incubación de células linfoides con Actinomicina D 0.2 µg/mL después de 24 horas se observó que el 82.61% de las células linfoides fueron positivas al marcaje de la tinción de TUNEL. Las células Jurkat sin tratar mostraron un 3.09 % de células positivas a la tinción ya referida.

Cuando se realizó el cultivo mixto de células CaSki con Jurkat se observó que el 48.68% de las células fueron positivas para esta tinción. En el caso de la incubación de las células linfoides con el sobrenadante de esta monocapa se obtuvo un 59.30 % de células con marcaje positivo para la tinción de TUNEL.

En el co-cultivo de células C-33 A y Jurkat se observó que el 57.53% de las células linfoides fueron positivas para esta tinción. La incubación de las células Jurkat con el sobrenadante de esta monocapa mostró un 61.26 % de células positivas al marcaje de los extremos libres de ADN internucleosomal.

En estos experimentos también observamos que las monocapas de cáncer cérvico uterino así como sus sobrenadantes indujeron una apoptosis significativa en las células linfoides. Esta serie de ensayos nos muestra que las células transformadas conservan en su membrana y también liberan al medio alguna molécula que induce apoptosis en los linfocitos T, la literatura menciona que el ligando de CD95 existe en dos formas biológicamente activas, una forma membranal y otra soluble. La forma soluble del ligando de Fas se libera gracias a la acción de la metaloproteasa de matriz extracelular denominada matrilisina.

XIII.2 EL INHIBIDOR DE LA METALOPROTEASA DE MATRIZ EXTRACELULAR (MMPI) INHIBE EL EFECTO APOPTÓTICO EN LAS CÉLULAS JURKAT INCUBADAS CON EL SOBRENADANTE DE LAS LÍNEAS DE CÁNCER CERVICAL.

Con el objetivo de evitar la liberación de la forma soluble del CD95L, en esta serie de experimentos se utilizó el inhibidor de la metaloproteasa de matriz extracelular MMPI para así conservar todo el ligando anclado a la membrana de las células de cáncer cervical. Este inhibidor se utilizó a una concentración de 10 μ M y para verificar que el MMPI no tuviera un efecto apoptótico sobre las células Jurkat, se realizó una incubación de 24 horas con este fármaco y se obtuvo un 92.19 % de células negativas a la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio.

El MMPI se utilizó de la siguiente manera, se sembraron las líneas celulares de cáncer cervical y cuando alcanzaron la confluencia, se lavaron con PBS estéril y se les agregó medio de cultivo RPMI 1640 suplementado, así como 10 μ M de MMPI. Después de 24 horas se realizó el cultivo mixto de células Jurkat con las líneas de cáncer cervical de la manera en que ya se describió, con la salvedad de que a los co-cultivos recién montados se les volvió a agregar el MMPI a la misma concentración para evitar la liberación de la forma soluble del ligando de CD95. La incubación de las células Jurkat con los sobrenadantes de las líneas celulares de cáncer cervical se hizo de la manera ya referida. Se recuperaron las células Jurkat y se procedió a realizar la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio.

Esta serie de experimentos se realizó por triplicado, los resultados se describen a continuación. En la figura No. 4 se muestra un ensayo representativo. La figura No. 5 muestra una gráfica de barras construida a partir de los datos obtenidos de tres repeticiones experimentales.

En el caso del cultivo mixto de células SiHa tratadas con 10 μ M de MMPI y células Jurkat se obtuvo un 18.7 ± 3 % de células linfoides positivas a la tinción con anexina V-FITC, y un 30.4 ± 4 % de linfocitos T que se tiñeron con anexina V-FITC e incorporaron yoduro de propidio. Cuando se realizó la incubación de los linfocitos T en el sobrenadante de esta línea celular que fue tratada con el MMPI se observó que el 3.7 ± 2 % de las células fueron positivas al marcaje de la tinción con anexina V-FITC y que el

3.3 ± 2% de células linfoides se tiñeron con anexina V-FITC e incorporaron yoduro de propidio.

En el co-cultivo de células CaSki tratadas con 10 µM de MMPI y células Jurkat se observó un 25.7 ± 4% de células linfoides positivas a la tinción de anexina V-FITC y un 50.2 ± 3 % de linfocitos T positivos a la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Después de 24 horas de incubación de las células Jurkat con el sobrenadante de las células de cáncer cervical tratadas con el inhibidor se obtuvo un 3.1 ± 2 % de células T teñidas con anexina V-FITC y un 4.8 ± 2% de marcaje doble positivo en las células linfoides.

En el caso del cultivo mixto de células HeLa tratadas con 10 µM de MMPI y células Jurkat se observó que el 19.6 ± 5% de las células linfoides presentaron un marcaje positivo para la tinción de anexina V-FITC y el 52.4 ± 7% de células T fueron positivas a la tinción con anexina V-FITC e incorporaron yoduro. Cuando se realizó la incubación del sobrenadante de esta monocapa tratada con el inhibidor y las células Jurkat se obtuvo un 2.9 ± 2% de células linfoides positivas para la tinción con anexina V-FITC y un 4.3 ± 3 de células T doble positivas para la tinción ya referida.

El co-cultivo de células C-33 A tratadas con 10 µM de MMPI con células Jurkat dió como resultado un 10.5 ± 3% de células linfoides teñidas con anexina V-FITC y un 55.3 ± 5% de células T que se tiñeron con anexina V-FITC e incorporaron yoduro de propidio. Cuando se realizó la incubación de las células Jurkat con el sobrenadante de las células de cáncer cervical tratadas con el inhibidor se obtuvo un 3.4 ± 2% de células linfoides positivas para la tinción con anexina V-FITC y un 5.2 ± 3% de células T doble positivas para la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio.

Para corroborar el efecto observado al utilizar el MMPI se realizaron ensayos de inducción de apoptosis utilizando cultivos mixtos e incubación de los sobrenadantes de células CaSki y C-33 A con Jurkat, pero ahora utilizando la tinción de TUNEL en donde se analizaron 10,000 eventos por muestra para evaluar la apoptosis en los linfocitos T. Ver figura 7.

En el caso del cultivo mixto de células CaSki tratadas con 10 µM de MMPI y células Jurkat se obtuvo un 60.91% de células positivas al marcaje de extremos libres de ADN. Después de 24 horas de incubación de las células Jurkat con el sobrenadante de la

monocapa de tratada con el inhibidor se observó un 2.98% de células linfoides positivas a la tinción ya referida.

Cuando se realizó el co-cultivo de células C-33 A tratadas con 10 μ M de MMPI y células Jurkat se obtuvo un 74.20 % de células T positivas al marcaje de TUNEL. En el caso de la incubación de las células Jurkat con el sobrenadante la monocapa tratada con el inhibidor se observó que un 13.40% de células linfoides fueron positivas a la tinción de TUNEL.

En esta serie de experimentos queda claro que el empleo del MMPI en las células de cáncer cervical está inhibiendo la liberación de moléculas solubles que pudieran ejercer un efecto citotóxico en las células Jurkat, ya que en todos los casos cuando se realizó la incubación de las células T con los sobrenadantes provenientes de las monocapas tratadas con el MMPI se observó un abatimiento considerable en la apoptosis de las células linfoides. El tratamiento de las células de cáncer cervical con el MMPI dió como resultado un mayor número de células Jurkat positivas a la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio después de mantener el cultivo mixto durante 24 horas.

Sin embargo, con esta serie de experimentos no es posible atribuir la muerte de las células Jurkat al ligando de Fas presente en las monocapas y sobrenadantes provenientes de células de cáncer cervical, ya que el MMPI no inhibe específicamente a la metaloproteasa de matriz responsable de liberar la forma soluble del CD95L. Para confirmar la participación del CD95L utilizamos el anticuerpo antiFasL humano recombinante (R&D Systems) para bloquear la actividad biológica del ligando de Fas en su forma membranal y soluble, y así evitar la muerte celular de los linfocitos T por la vía de señalización de CD95/CD95L. La apoptosis de células Jurkat inducida por las células transformadas de cáncer cervical se valoró utilizando también el marcaje de extremos libres de ADN.

XIII.3 EL CD95L ASOCIADO A LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL INDUCE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS JURKAT.

Para aportar evidencia de que el ligando de CD95 participa en la apoptosis de las células Jurkat recuperadas tanto de los cultivos mixtos de las líneas celulares de cáncer cervical CaSki y C-33 A, como de la incubación con sus sobrenadantes, en esta serie de experimentos se utilizó el anticuerpo anti-FasL humano recombinante de humano para bloquear la actividad biológica del ligando de Fas en sus formas membranal y soluble. En esta serie de experimentos la apoptosis en las células Jurkat se evaluó únicamente por medio del marcaje de los extremos libres de ADN (TUNEL) después de analizar 10,000 eventos por citometría de flujo.

El experimento se realizó de la manera siguiente, en cajas de Petri se sembraron las líneas de cáncer cervical CaSki y C-33 A, cuando alcanzaron la confluencia se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos y se les agregó 10 μ M de MMPI y 500 ng/mL de anti-FasL, y después de 24 horas se montaron los cultivos mixtos como se describe en la figura 3. Cabe mencionar que a las monocapas se les adicionó nuevamente 10 μ M de MMPI y 500 ng/mL de anti-FasL al momento de iniciar el co-cultivo de líneas celulares de cáncer cervical con Jurkat. Por otro lado se trabajó con sobrenadantes de las monocapas de células de cáncer cervical que no recibieron ningún tratamiento y al momento de iniciar la incubación con las células Jurkat se agregó al sobrenadante el anticuerpo anti-FasL 500 ng/mL.

En el caso del cultivo mixto de células CaSki tratadas con MMPI y el anticuerpo anti-FasL con células Jurkat se observó que un 12.33 % de células linfoides fueron positivas a la tinción de TUNEL

Cuando la monocapa de células CaSki sin tratar alcanzó la confluencia necesaria, se recuperó el sobrenadante y a éste se agregó el anticuerpo anti-FasL 500 ng/mL entonces se realizó la incubación con las células Jurkat y se obtuvo un 56.16 % de células linfoides positivas al marcaje de extremos libres de ADN.

En el caso del co-cultivo de células C-33 A tratadas con el MMPI y el anticuerpo anti-CD95 con los linfocitos T se observó un 23.92 % de células Jurkat positivas a la tinción de TUNEL.

Después de que la monocapa de células C-33 A sin tratar alcanzó la confluencia, se retiró el sobrenadante y a éste se le agregaron 500 ng/mL del anticuerpo anti-CD95, se inició la incubación con las células Jurkat y después de 24 horas se obtuvo un 47.83 % de linfocitos T positivos para el marcaje de la tinción ya referida.

En esta serie de ensayos se observa que el ligando de CD95 presente en las monocapas de las células de cáncer cervical tiene una participación importante en la inducción de apoptosis en las células Jurkat, sin embargo en el caso de la línea celular C-33 A no se puede descartar la existencia de otra molécula inmunosupresora que ejerza un efecto apoptótico en los linfocitos T.

Estos ensayos mostraron que el CD95L en la forma soluble presente en el sobrenadante proveniente de las células tumorales no induce apoptosis significativa sobre las células Jurkat mediante la técnica de TUNEL.

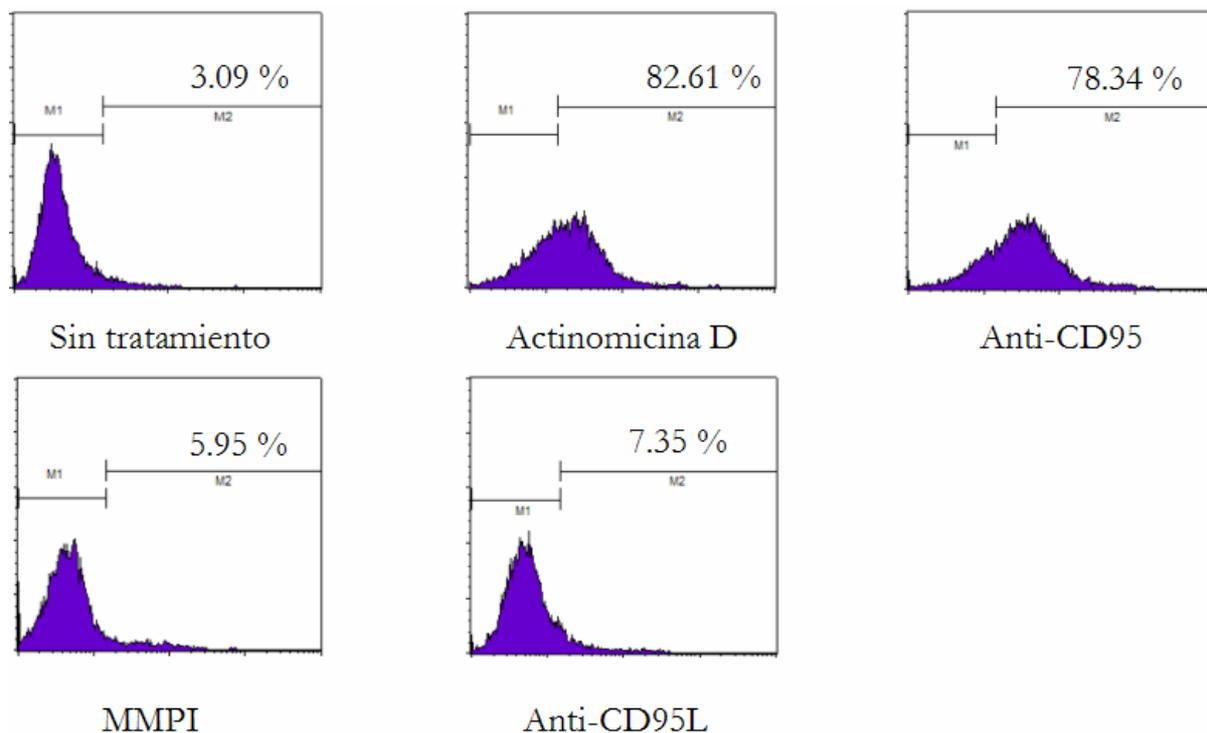
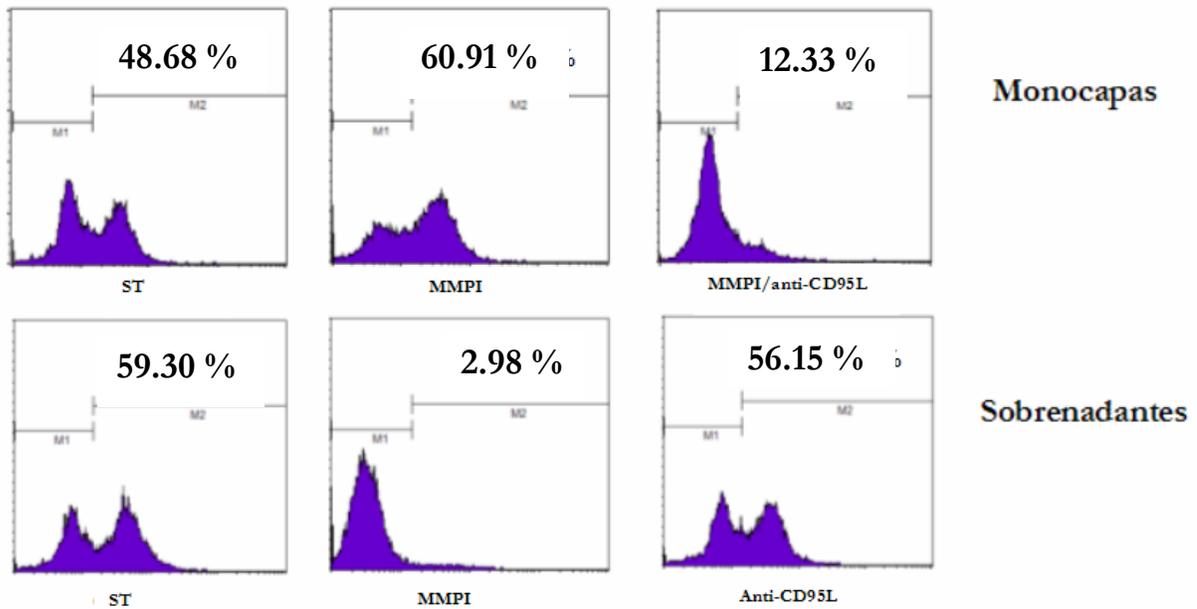


Fig. 6. Controles de inducción de apoptosis en células Jurkat valorados por la tinción de TUNEL. Células Jurkat sin tratamiento, tratadas con actinomicina D 0.2 µg/mL, con anticuerpos monoclonales anti-CD95 0.5 µg/mL, incubadas con el inhibidor de metaloproteasas de matriz extracelular 10 µM (MMPI) e incubadas con el anticuerpo anti-CD95L 500 ng/mL.

a) Co-cultivo de células CaSki con Jurkat



b) Co-cultivo de células C-33 A con Jurkat

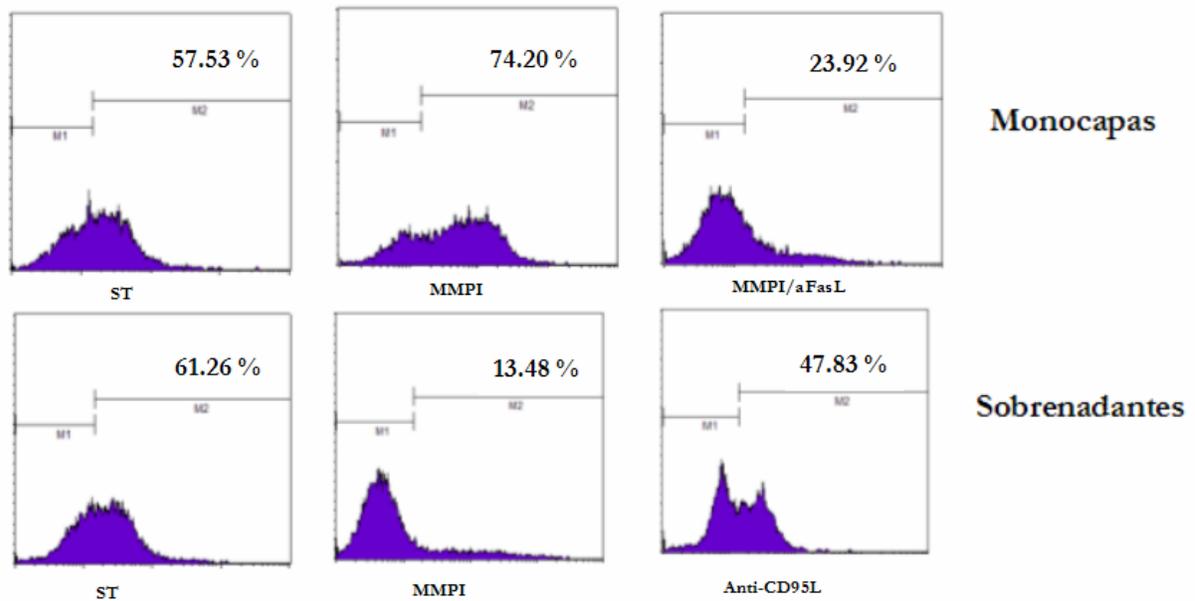


Fig. 7. El ligando de CD95 anclado a la membrana de las células de cáncer cervical induce apoptosis en las células Jurkat. Se muestran los valores obtenidos de la inducción de apoptosis en las células Jurkat valorada por la tinción de TUNEL después del cultivo mixto de las células linfoides con las monocapas o los sobrenadantes que se indican.

XVI. DISCUSIÓN

La transformación celular es un proceso que involucra la acumulación de diversas mutaciones encaminadas a la adquisición de características ventajosas que en suma le permitan a la célula neoplásica la sobrevivencia y proliferación dentro del organismo aún en condiciones adversas. Se sabe que las células neoplásicas son capaces de evadir la respuesta inmune del huésped (Hanahan y Weinberg, 2000), en el laboratorio se propuso la hipótesis de que el mecanismo podría implicar la vía de señalización de CD95/CD95L, dado que se ha demostrado la presencia del ligando de CD95 en diversas masas tumorales, por ejemplo en: sarcoma (Mitsiades et al, 1998), melanoma (Hahne et al, 1996), cáncer de colón (O'Connell et al, 1996), de hígado (Strand et al, 1997), de pulmón (Niehans et al, 1997), de ovario (Rabinowich et al, 1998), de tiroides (Mitsiades, 1999) y riñón (Uzzo et al, 1999). En estudios previos realizados por nuestro equipo de trabajo se evidenció por diferentes métodos la presencia del ligando de CD95 en las líneas celulares de cáncer cervical SiHa, CaSki, HeLa y C-33 A (Reyes Ibarra, tesis de maestría 2002).

A partir del hecho de que las líneas celulares de cáncer cervical ya mencionadas expresan el FasL (CD95L o ligando de CD95), este trabajo aborda la hipótesis de que dicho ligando es funcional y ejerce un efecto inductor de apoptosis sobre células del sistema inmune. Por lo anterior se plantearon los siguientes objetivos 1) Apoyar la hipótesis de que las células transformadas de cáncer cérvico uterino llevan a cabo la inducción de apoptosis a las células T, empleando un modelo de células Jurkat y 2) Determinar la participación del CD95L en este tipo de evasión de la respuesta inmune.

Con el fin de estudiar una probable interacción entre las células tumorales y las células T, se realizaron cultivos mixtos de líneas celulares de cáncer cervical con células Jurkat como modelo *in vitro* de linfocitos T. En todos los casos se observó que tanto las monocapas de las células de origen tumoral como sus sobrenadantes fueron capaces de inducir apoptosis en las células Jurkat a niveles diferentes pero significativos. El efecto apoptótico causado sobre las células linfoides reveló características de etapas tempranas de apoptosis (marcaje positivo con anexina V-FITC), así como también de apoptosis en

etapas tardías (incorporación de yoduro de propidio y marcaje positivo de extremos libres de DNA internucleosomal por la prueba de TUNEL).

Cabe mencionar que el efecto apoptótico causado sobre las células T fué independiente del genotipo viral (SiHa, CaSki o HeLa) y de la presencia del genoma de HPV en la célula transformada (C-33 A), lo que revela que la expresión y funcionalidad del ligando de CD95 no está restringida a la infección y posterior transformación celular causada por el HPV. Aparentemente se trataría de un evento general que ocurre y se observa en las células neoplásicas de cáncer cervical lo cual les confieren la capacidad escapar de la respuesta inmune celular del huésped.

Los resultados de este estudio concuerdan con el reporte de Chopin y col. (2003) en el que se revela la presencia y funcionalidad del ligando de CD95 en tumores de vejiga y en donde además al ligando se le relaciona con la progresión del tumor. La acción biológica del ligando de CD95 se evaluó utilizando cultivos primarios procedentes de biopsias de las masas tumorales y a partir de aquí se montaron cultivos mixtos en donde también utilizaron células Jurkat. En este artículo se sugiere que las células de cáncer de vejiga inducen apoptosis en los linfocitos T por la vía de señalización Fas/FasL. En este estudio también se revisaron biopsias de vejiga de individuos sanos y no se demostró la presencia de CD95L en ningún caso (Chopin et al, 2003).

Las metaloproteasas de matriz extracelular son una familia de proteasas dependientes de zinc que están involucradas en el desarrollo embrionario, morfogénesis, re-absorción y remodelación del tejido, en general en la degradación de la matriz extracelular en procesos biológicos normales (Nagase y Woessner, 1999), así como en procesos de crecimiento de la masa tumoral, invasión y metástasis. (Hidalgo y Eckhardt, 2001). Está documentado que el ligando de CD95 puede ser liberado al medio extracelular como una forma soluble de 26 kD con actividad biológica *in vitro*, este proceso está mediado específicamente por la acción de la metaloproteasa de matriz extracelular No. 7 llamada matrilisina (Nayagaki et al, 1995 y Mitsiades et al, 1998).

En el año de 2003 Knox y colaboradores reportaron que el empleo de inhibidores de esta proteasa induce la acumulación de la forma membranal del ligando de CD95 en la superficie de células provenientes de una masa tumoral de ovario, así como también en la membrana de células SiHa. En el reporte de Knox y col., establecieron la concentración necesaria del inhibidor de la matrilisina para evitar la liberación de la forma soluble del ligando de CD95 y se relacionó con un aumento en la inducción de apoptosis en las células de cáncer de ovario y células SiHa sobre células 293T (células de riñón de embrión humano), sin embargo en ese estudio no se revisó el efecto de los sobrenadantes de los cultivos con o sin el inhibidor de la matrilisina sobre las células 293T (Knox et al, 2003).

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente trabajo se determinó que el tratamiento de los cultivos de las células de cáncer cervical con el inhibidor de metaloproteasas de matriz (MMPI) fue capaz de aumentar significativamente la apoptosis en las células Jurkat después del cultivo mixto con todas las líneas celulares de cáncer cervical tratadas cuando evidenciado por el aumento en el número de células Jurkat positivas a la tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio, comparado con los cultivos mixtos en donde a las células de cáncer cervical no se les incubó con el MMPI. Apoyado en el experimento anterior, también se observó un aumento considerable en el marcaje de extremos libres del DNA internucleosomal en las células Jurkat después de co-cultivarlas con células CaSki y C-33 A tratadas con el MMPI. En este sentido nuestros resultados concuerdan con el estudio reportado por Knox y col., en el año 2003, porque las células de origen tumoral en contacto con las Jurkat les inducen apoptosis

En nuestros experimentos observamos que el MMPI inhibió eficientemente la liberación de moléculas inmunosupresoras, entre ellas el ligando de CD95 en forma soluble hacia el medio extracelular, ya que después del tratamiento de las células de cáncer cervical con el MMPI, el sobrenadante recuperado no tuvo efecto en la inducción de apoptosis en las células linfoides con todas las líneas celulares estudiadas, sin embargo no se descarta la participación de otros sistemas inductores de apoptosis,

como la vía de señalización en donde participa TNF- α o TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF), ya que ambas moléculas también se liberan al medio extracelular como factor soluble mediante la acción de metaloproteasas.

El tratamiento de las células tumorales con el MMPI evitó la liberación del CD95L al medio extracelular y por lo tanto no se detectó efecto apoptótico medido por el ensayo de anexina V con los sobrenadantes de las células tratadas. En concordancia con el resultado anterior, al evaluar la apoptosis utilizando la tinción de TUNEL en las células Jurkat incubadas con el sobrenadante de las células CaSki y C-33 A tratadas con el MMPI, se observó también un abatimiento considerable en la apoptosis tardía de las células linfoides.

En este trabajo se utilizó un inhibidor de metaloproteasas que no es específico para la matrilisina, es decir, que también podría estar evitando la liberación de otras moléculas hacia el medio extracelular. En este sentido la bibliografía reporta que la citosina TNF- α que es miembro de la misma familia de receptores de muerte, también es susceptible de ser liberada al medio como forma soluble conservando su actividad biológica. La liberación de la forma soluble del TNF- α se debe también a la acción de una metaloproteasa (Gearing et al, 1994).

Por lo anterior para determinar cual es la contribución del ligando de CD95 en la apoptosis inducida a las células Jurkat por acción de las células de cáncer cervical, decidimos utilizar un anticuerpo que bloqueara específicamente la actividad biológica del ligando de CD95, tanto en su forma membranal como cuando se encuentra en el medio extracelular como factor soluble. El tratamiento con el anticuerpo bloqueador anti-CD95L, arrojó resultados interesantes, ya que apoyan que dicho ligando presente en la membrana de las células CaSki y C-33 A es el responsable de la inducción de apoptosis en las células Jurkat, ya que después de mantener el ligando de CD95 unido a la membrana (inhibiendo a la metaloproteasa que lo corta) y posteriormente bloquear su actividad mediante el anticuerpo anti-CD95L, observamos que los niveles de apoptosis presentaban un abatimiento considerable en las células Jurkat recuperadas del cultivo mixto y teñidas para evidenciar el marcaje de extremos libres del DNA

internucleosomal. Nuestro resultado aunado al reporte de Chopin et al, 2003 podría ayudar a explicar por qué no se encuentran linfocitos T infiltrantes en la mayoría de las masas tumorales en donde se sabe que las células transformadas expresan el ligando de CD95.

Por otro lado al incubar las células Jurkat con los sobrenadantes tratados con el anticuerpo anti-CD95L observamos que el CD95L no es el único factor que participa en la inducción de apoptosis en éstas células linfoides, ya que no se logró obtener apoptosis en forma total en estas células. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de la metaloproteasa podría estar evitando la liberación tanto de FasL como de TNF- α o TRAIL al medio extracelular. Lo anterior sugiere que el mecanismo que involucra TNF- α tiene una participación en la inducción de apoptosis por las células de cáncer cervical, por lo que sería interesante explorar y si esta citosina ejerce un efecto apoptótico sobre las células del sistema inmune.

Este trabajo aporta evidencias de que las células de cáncer cervical inducen apoptosis en las células T utilizando el ligando de CD95 presente en su membrana plasmática como mecanismo principal de evasión de la respuesta inmune. Por lo tanto consideramos importante investigar la posibilidad de interferir con la expresión y función del ligando de CD95 en las células neoplásicas, para así contribuir en el diseño de estrategias experimentales que en un futuro puedan utilizarse en el tratamiento del cáncer cervical.

XV. CONCLUSIONES

- 1.- Las líneas celulares de cáncer cervical así como sus sobrenadantes, indujeron apoptosis en las células Jurkat aún en la línea tumoral en donde no se detecta la presencia del genoma del virus del papiloma humano.
- 2.- El tratamiento con el inhibidor de la metaloproteasa de matriz extracelular que evita la liberación de la forma soluble del ligando de CD95 aumentó el efecto apoptótico de las células de cáncer cervical sobre las células Jurkat en comparación con los cultivos de células tumorales que no fueron tratadas con dicho inhibidor.
- 3.- Así mismo, el efecto apoptótico de los sobrenadantes sobre las células Jurkat fue suprimido por el tratamiento con el inhibidor de la metaloproteasa que corta al CD95 L unido a la membrana de la célula tumoral.
- 4.- Los anticuerpos anti-CD95L bloquearon completamente el efecto apoptótico del ligando presente en la membrana de las células tumorales.
- 5.- Los anticuerpos anti-CD95L no lograron bloquear totalmente el efecto apoptótico en los sobrenadantes de línea celular C-33 A por lo que queda por demostrar la existencia de otros factores solubles que puedan inducir apoptosis y que sean liberados de la superficie de la célula tumoral por metaloproteasas de matriz extracelular. Se descartará la posibilidad de que factores como TRAIL y el TNF- α puedan estar participando.

BIBLIOGRAFÍA.

Alcami A y Koszinowski U. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunology today*. **21**: 447-455.

Algeciras A, Shen L, Barnhart B, Murmann A, Burkhardt J y Peter M. 2002. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular and Cellular Biology*. **22**: 207-220.

Alison M R. 2001. Cancer. *Encyclopedia of life sciences. Nature publishing group*. :1-8.

Ashkenazi A y Dixit V. 1998. Death Receptors: Signaling and modulation. *Science*. **281**:1305-1308.

Castellsagué X, Bosch F y Muñoz N. 2001. The male rol in cervical cancer. *Salud Pública de México*. **45**: 345-353.

Cervantes J. 2003. Infección por Papilomavirus humano y riesgo inmunológico de cáncer de cuello uterino. *Ginecología y Obstetricia. Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología*. **49**:53-58.

Chopin D, Barei-Moniri R, Maillé P, Belda M, Muscatelli-Groux B, Merendino N, Lecerf L, Stoppacciaro A y Velotti F. 2003. Human urinary bladder transitional cell carcinomas acquire the functional Fas Ligand during tumor progression. *American Journal of Pathology*. **162**:1139-1149.

Barker K. 1998. *At the bench, a laboratory navigator*. Chapter 10: Eucaryotic Cell Culture. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 205-245.

Bosch F, Lorincz A, Meijer C y Shah K. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. **55**: 244-265.

Duensing S y Münger K. 2003. Centrosomes, genomic instability and cervical carcinogenesis. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. **13**:9-23.

Evander M, Frazer I, Payne E, Mei Y, Hengst K y Mcmillan N. 1997. Identification of the α_6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*. **71**: 2449-2456.

Fehrmann F y Laimins L. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. **22**:5201-5207.

Fink S y Cookson B. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*. **73**:1907-1916.

Flores Y, Bishai D, Lazcano E, Shah K, Lorinez A, Hernández M y Salmerón J. 2003. Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV study. *Salud Pública de México*. **45**:388-398.

Ghim S, Sarathi P y Jenson A. 2002. Cervical cancer: etiology, pathogenesis, treatment, and future vaccines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **3**:207-214.

Hahne M, Rimoldi D, Shorter M. 1996. Melanoma cell expression of Fas (APO-1/CD95) ligand: implication for tumor immune escape. *Science*. **274**:1363-1366.

Hanahan D y Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**:57-70.

Hidalgo M y Eckhardt G. 2001. Development of Matriz metalloproteinases inhibitors in cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. **93**:178-193.

Hyung S, Sun M, Sang W, Young S, Myung S, Ho J, Kyung H, Sik H, June J, Soung C, Ho S, Young L y Jin N. 1999. Alterations of Fas (APO-1/CD95) gene un transitional cell carcinoma of urinary bladder. *Cancer Research*. **59**: 3068-3072.

Jesenberger V y Jentsch S. 2002. Deadly encounter: Ubiquitin meets apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **3**:112-121.

Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K y Yagita H. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *Journal of Experimental Medicine*. **182**:1777-1783.

Knox P, Milner A, Green N, Eliopoulos A y Young L. 2003. Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas Ligand. *The Journal of Immunology*. **170**:677-685.

Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, van Oers M. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. **84**:1415-1420.

Krammer P. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. **407**:789-795.

Man S. 1998. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 1-19.

Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Leone A y Tsokos M. 1998. Fas Ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *American Journal of Pathology*. **153**:1947-1956.

Mitsiades N, Poulaki V, Mastorakos G, Balafouta S, Kotoula V, Koutras D y Tsokos M. 1999. Fas Ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **84**:2924-2932.

Muñoz N, Bosch X, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P y Meijer Ch. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*. **348**: 518-527.

Nagase H y Woessner F. 1999. Matrix Metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. **274**:21491-21494.

Niehans G, Brunner T, Frizelle S, Liston J, Salerno C, Knapp D, Green D y Kratzke R. 1997. Human lung carcinomas express Fas Ligand. *Cancer Research*. **57**:1007-1012.

O'Connell J. 2001. Role of Fas-FasL in inflammatory diseases. *Expert reviews in Molecular Medicine*.1-17.

Peter M y Krammer P. 2003. The CD95 (APO-1-Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation*. **10**: 26-35.

Rabinowich H, Reichert T, Kashii Y, Gastman B, Whiteside T. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand expressing ovarian carcinoma cells: implications for altered expression of TcR in tumor-associated lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. **101**:2579-2588.

Reyes A. 2002. Efecto de la expresión de CD95 y CD95L en líneas celulares de cáncer de cervix, como posible mecanismo de contra-ataque a la respuesta inmunológica. Tesis de maestría.

Scout M, Nakagawa M y Moscicki A. 2001. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **8**: 209-220.

Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa N, Fukao K, Yagita H y Okumura K. 1998. Cutting edge: chemotactic activity of soluble Fas Ligand against phagocytes. *The Journal of Immunology*. **161**:4484-4488.

Sharma K, Wang R, Zhang L, Yin D, Luo X, Solomon J, Jiang R, Markos K, Davidson W, Scott D y Shi Y. (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology and Therapeutics*. **88**:333-347

Stamenkovic I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. **10**:415-433.

Timmer T, de Vries E y de Jong S. 2002. Fas receptor-mediated apoptosis : a clinical application ?. *Journal of Pathology*. **196**: 125-134.

Uzzo R, Rayman P, Kolenko V, Clark Pin, Bloom T, Ward M, Molto L, Tannenbaum Ch, Worford L, Bukowski R, Tubbs R, His E, Bander N, Novick A y Finke J. 1999. Mechanism of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. **5**:1219-1229.

Viard-Leveugle y col. 2003. *Journal of Biological Chemistry*. **278**:16183-16188.

Xiao S, Jodo S, Sung S, Marshak-Rothsein A y Ju S. 2002. A novel signaling mechanism for soluble CD95 ligand: synergy with anti-CD95 monoclonal antibodies for apoptosis and NF-KB nuclear translocation. *Journal of Biological Chemistry*. **276**:39938-39944.

Yang Y y Yu Xiaodan. 2003. Regulation of apoptosis: The ubiquitous way. *FASEB Journal*. **17**:790-799.

zur Hausen H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of National Cancer Institute*. **92**:690-698.

zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer:From basic studies to clinical application. *Nature*. **2**:342-350.