



**“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”**  
Multidisciplinario  
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

## **“Identificación del RIL-2 de tejidos de Cuello Uterino de mujeres con diferentes grados de lesión”**

**Autor:**

**PLESS. Jocelyn Reyna Loredo**

**Coautores:**

**Dra. Yolanda Terán Figueroa**

**Dra. Verónica Gallegos García**

**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**

**Facultad de Enfermería**

**Licenciatura en Enfermería**

**jocelyn.reyna.loredo@gmail.com**



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### “Identificación del RIL-2 de tejidos de Cuello Uterino de mujeres con diferentes grados de lesión”

#### RESUMEN

Múltiples estudios han propuesto la utilización de la interleucina 2 (IL-2) para inducir una respuesta mejorada del sistema inmune frente al cáncer cervicouterino. Sin embargo es necesario reconocer y entender el papel del sistema inmune a nivel microbiológico por lo cual en el presente trabajo se estudia la presencia del receptor de interleucina 2 (RIL-2) en tejidos de cuello uterino con distintos grados de lesiones (bajo y alto grado) para determinar la viabilidad de la inmunoterapia. Se emplearon muestras de tejido de pacientes con diferentes tipos de lesión, las cuales fueron lisadas por el método de SDS para extraer ya sea al RIL-2 completo y/o las subunidades. La identificación se hizo por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para cada subunidad y se hicieron experimentos tipo Westernblot. Los hallazgos obtenidos fueron positivos para la presencia de las 3 subunidades en los diferentes grados de lesión.

#### ABSTRACT

Multiple studies have proposed the use of interleukin 2 (IL- 2) to induce an enhanced immune response against the cervical cancer . However you need to recognize and understand the role of the immune system to microbiological level so in this study the presence of interleukin-2 receptor (RIL -2) in tissues of the cervix with varying degrees of injuries is studied (low and high grade) to determine the feasibility of immunotherapy . Tissue samples from patients were used with different types of injury , which were lysed by SDS method to extract either RIL-2 to



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

complete and / or subunits . The identification was done by immunoprecipitation using antibodies specific for each subunit type and Western blot experiments were done . The findings were positive for the presence of the 3 subunits in the different degrees of injury.

### **PALABRAS CLAVE**

Cáncer cervicouterino, Interleucina 2, RIL-2

### **INTRODUCCIÓN**

El cáncer del cuello uterino (CC) constituye una de las causas de muerte más frecuente en la población femenina de Latinoamérica, donde además las tasas de incidencia se ubican entre las más altas del mundo <sup>(1)</sup>. Según GLOBOCAN es el cuarto cáncer más común en las mujeres con un estimado de 528.000 nuevos casos en 2012 a nivel mundial <sup>(2)</sup>. Las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino se han establecido como un problema de salud pública debido a la alta prevalencia de las mismas, la elevada mortalidad femenina y la ausencia de programas eficientes.<sup>(1)</sup>

En la actualidad el tratamiento del cáncer se ha centrado en destruir las células que se dividen rápidamente, al ser ésta una característica de aquellas que son cancerosas. Desafortunadamente, algunas de las células normales también se dividen rápidamente, por lo que se producen múltiples efectos no deseados <sup>(3)</sup>.

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento empleado para estimular o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer, las infecciones u otras enfermedades. Lo anterior con base en que el sistema inmune tiene entre sus funciones la de reconocer los cambios antigénicos que se producen en las



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

células. La posibilidad de modificar esta situación, ha permitido el desarrollo de estrategias encaminadas a estimular al sistema inmune de forma inespecífica <sup>(4)</sup>. Los efectos secundarios asociados con éste tipo de terapias suelen ser el dolor, la inflamación, irritación, enrojecimiento de la piel, comezón y la erupción en el sitio de la infusión o de la inyección <sup>(5)</sup>. Lo anterior lleva a plantear la utilización de las llamadas terapias dirigidas con modificaciones pertinentes para que sean selectivas, de toxicidad mínima, costo efectivas <sup>(3)</sup> y de aplicación local.

Dado lo anterior múltiples estudios han propuesto la utilización de interleucina 2 (IL-2) para inducir una respuesta mejorada del sistema inmune frente a esta patología, como en el estudio de Rangel-Corona y col <sup>(6)</sup> en el que determinaron que es posible generar *in vitro* linfocitos T citotóxicos (LTC) de memoria contra células de CC, sin embargo *in vivo* existen otros factores que regulan negativamente la respuesta inmunológica de rechazo. Este grupo de investigación encontró además una expresión diferencial en el receptor de interleucina 2 (RIL-2) en CC. En estadios iniciales (neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) 1 y 2), sólo detectaron la cadena alfa del receptor, pero en estadios avanzados (3 y 4) detectaron las 3 subunidades que conforman al RIL-2 (alfa, beta y gamma) <sup>(7)</sup>. Estos estudios se hicieron tomando células de pacientes implantadas en ratones singénicos.

A partir de estos estudios relacionados y dado el impacto económico, social y psicológico de las terapias actualmente empleadas, surge la iniciativa en nuestro grupo de investigación de ahondar en nuevos y mejorados tratamientos como la inmunoterapia dirigida. Sin embargo es necesario reconocer y entender el papel del sistema inmune a nivel microbiológico por lo cual en el presente trabajo se



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

estudia la presencia del RIL-2 en tejidos de mujeres con distintos grados de lesiones (bajo y alto grado), esto con la finalidad de determinar la viabilidad de las propuestas de la utilización de la IL-2 como terapia dirigida de aplicación en el sitio de lesión.

### **METODOLOGÍA**

#### Extracción de proteína

Se utilizaron fragmentos de tejidos de cérvix (aproximadamente de 4mm x 5mm x2mm) de pacientes con distintos grados de lesión. El manejo de la muestra se hizo a 4°C. Cada fragmento se digirió en tubos eppendorf con 500µL de buffer de lisis (Tris-HCl 20mM pH7, NaCl 0.15M, EDTA 1mM, Tritón x-100 1%) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas ( $\beta$ -glicerolfostato 1M, PMSF 100mM, NaF 1M, NaVO<sub>4</sub> 1M, Complete 25x). El fragmento de tejido se incubó por 10 minutos, se pasó por jeringa con aguja de 22G diez veces y se centrifugó a 14,000rpm, se extrajo el sobrenadante y se pasó a otro tubo eppendorf. Para la cuantificación de proteína se utilizó el método de Bradford por ELISA y para obtener la regresión lineal se empleó el software Graphpad Prism 5.

#### Inmunoprecipitación

Una vez que se obtuvo la cantidad de proteína total se llevaron las muestras a la misma concentración (100µg/mL) y se les agregó 5µL del anticuerpo primario RIL-2 de cada una de sus subunidades ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) por separado y se incubaron toda la noche a 4°C para posteriormente añadir 20µL de proteína G-agarosa e incubar nuevamente a la misma T° por 2 horas. Se centrifugó a 5,000rpm por 10 minutos a



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

4°C para formar un pellet y se aspiró sobrenadante, se agregaron 200µL de buffer de lisis para lavar el pellet repitiendo el paso anterior. Por último se resuspendió en 40µL de buffer de carga (Laemmli 2x) y se hirvieron las muestras a 95°C por 5 minutos para correrse un gel poliacrilamida al 10%.

### Electroforesis y Transferencia

Se cargaron 20µL del producto de la inmunoprecipitación en 2 diferentes geles de poliacrilamida al 10% y se corrió electroforesis a 80 volts constante. Una vez terminada la corrida se utilizó una membrana de PVDF para fijar las proteínas mediante una transferencia la cual se corrió a 400 mA constantes por 2 horas.

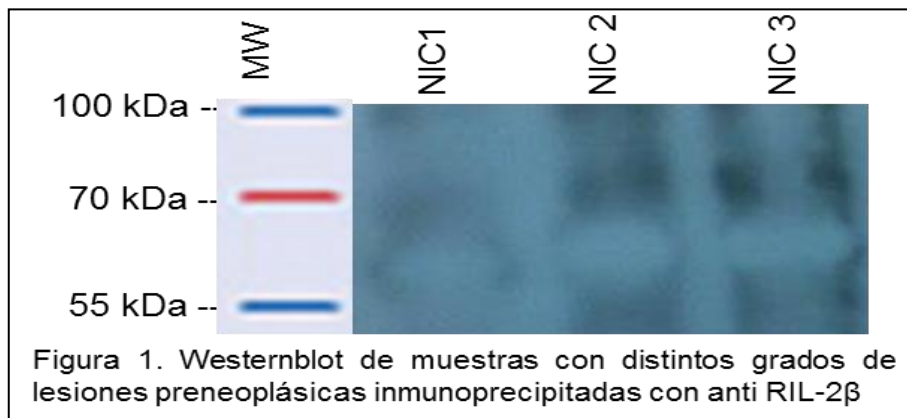
### Inmunodetección

Para identificar cada una de las subunidades se hizo un experimento tipo WesternBlot primero se bloqueó la membrana de PVDF con TBS-tween 20 al 5% de leche descremada por una hora, después se incubó la membrana con el anticuerpo primario (RIL-2α 1:100, RIL-2γ 1:300, RIL-2β 1:200 respectivamente) durante dos horas, se lavó con TBS-tween 20 tres veces por 10 minutos, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario diluido en TBS-tween 20 al 5% de leche (goat anti rabbit 1:10000 para las subunidades α y β; y goat anti mouse 1:20000 para γ) durante una hora y se lavó tres veces por 10 minutos con TBS-tween 20. Finalmente se reveló en cuarto oscuro con películas radiográficas y se empleó Western Chemiluminescent HRP Substrate Millipore para la identificación.

“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”  
Multidisciplinario  
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

## RESULTADOS

La primer inmunoprecipitación (IP) con la que se trabajó utilizando el anticuerpo anti RIL-2  $\beta$  y muestras de pacientes con NIC1, NIC2 y NIC3, pudiéndose observar una banda en el peso cercano a 70kDa, siendo éste mismo el peso de la subunidad  $\beta$  del receptor (Fig. 1). Es posible apreciar la banda en las tres muestras de tejido, no obstante la banda se percibe más tenue en la muestra de NIC1 que en las otras 2 y pareciera incrementar con el grado de lesión.

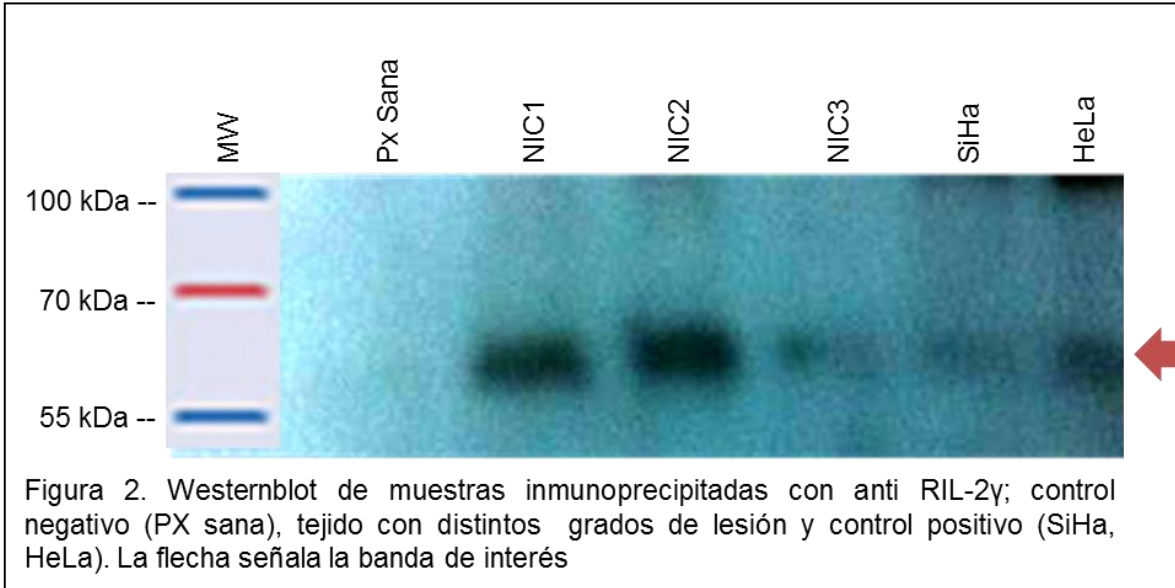


La IP con el anti RIL-2 $\gamma$  se hizo utilizando las siguientes muestras: de paciente sana (control), tejido de NIC1, 2 y 3 y dos líneas celulares (SiHa y HeLa) en las cuales se determinó mediante la inmunoprecipitación y posteriormente a través de Westernblot que existe la presencia de dicha subunidad, ya que se observó una banda en todas las muestras entre el peso de 55 y 70kDa siendo el peso de la subunidad y de 64kDa. Es clara la identificación de las bandas en las muestras con lesión sin embargo en la muestra de la persona sana es muy poco perceptible. (Fig. 2)

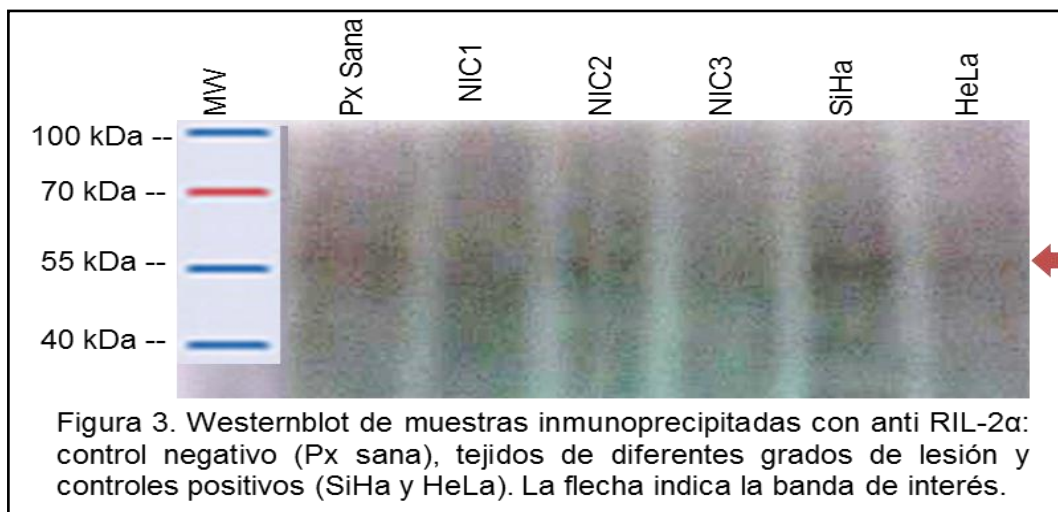
“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México



En el caso de la subunidad  $\alpha$  también fue posible observar una banda en el peso correspondiente a la misma que es de 55kDa. Para esta prueba la banda que se observó con menos claridad fue la de la muestra de NIC 3 y en la línea celular HeLa. (Fig. 3)







## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

### CONCLUSIONES

Hasta el momento se ha encontrado en todas las muestras la presencia de las tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) del RIL-2, a pesar de ello aun es indispensable conocer más acerca del mismo ya que para que lleve a cabo su efecto biológico es necesario determinar su localización, dado que si éste no se expresara en la membrana celular no podría ejecutar su acción de quimiotaxis y así mismo propiciar un error en la respuesta inmunológica frente a la infección por el VPH. Es por lo anterior que se pretende continuar esta investigación con experimentos independientes además de inmunolocalizar al RIL-2 para saber si se encuentra o no en la membrana celular de éste tipo de muestras.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Alterio G, Mendoza I, Mendoza R, Peraza E, Pérez H, Sánchez A. Hallazgos citológicos y factores de riesgo para patología preinvasora e invasora de cuello uterino. Área de influencia del ambulatorio urbano tipo II “Dr. Rafael Pereira”. Rev Salud Pública y Nutrición 2007; 8 (3): 1-29. Disponible en: [http://www.respyn.uanl.mx/viii/3/articulos/hallazgos\\_citologicos.htm](http://www.respyn.uanl.mx/viii/3/articulos/hallazgos_citologicos.htm) Consultado en diciembre 15, 2015.
2. GLOBOCAN. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp> . Consultado en diciembre 15, 2015.
3. Terán-Figueroa Y. Estudio de la utilización de IL-2 *IN VITRO* e *IN SITU*: Evaluación de una nueva propuesta de terapia dirigida contra el Cáncer Cervicouterino y sus lesiones precursoras. Protocolo de Investigación. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
4. Lara-Jiménez P, Sáez-Bravo Marta L. Principios Generales del Cáncer. Arán: España; 2012.



## “CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

5. Instituto Nacional del Cáncer. Terapias biológicas para el cáncer. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-terapias-biologicas-respuestas> Consultado en agosto, 2015.
6. Rangel-Corono R. y Corona-Ortega T. Inmunoterapia para Cáncer Cervicouterino. Disponible en: <http://www.cife.unam.mx/Programa/D15/A01Quimic-A/008.pdf> Consultado en Octubre 26, 2015.
7. Rebollo A, Silva A. Estructura y función del receptor de IL-2. Centro de Investigaciones biológicas; Madrid. 1994