



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO ASOCIADO AL RECEPTOR 1 DEL
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL EN DOS LÍNEAS CELULARES HPV-
16+ CON RESISTENCIA DIFERENCIAL A LA APOPTOSIS**

T E S I S

Que presenta

M. en C. JESÚS ISRAEL GARCÍA AGUIAR

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

Ciudad de México

Febrero 2018

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio No. 1 del departamento de biomedicina molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, y con el apoyo económico del CINVESTAV y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) (Número de beca: 262945).

*A la persona con quien día a día, juntos y de la mano: caminamos por el
mágico sendero de la vida y la ciencia*

... con todo mi amor a esa gran mujer.

Nereida Montes

*Para mi familia a la cual amo; quienes permanentemente me apoyaron con
espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y
objetivos propuestos*

*... con innumerable cariño; sus virtudes y su
gran corazón me llevan a admirarles cada
día más.*

*Anita
Georgina
Israel*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado en su laboratorio. Por su dirección, paciencia, entrega y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de esta tesis. Ha sabido ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por guiarme por el camino correcto, por sus enseñanzas y consejos, siempre los voy a tener presentes.

A la Dra. Elena Aréchaga Ocampo, la Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano y a la Dra. Leticia Cedillo Barrón muchas gracias por el tiempo empleado para la asesoría, revisión, y valiosos comentarios aportados para la realización de esta tesis.

Al Biólogo Raúl Bonilla por su dedicación, por sus esfuerzos, por su paciencia y compromiso durante la fase experimental de este trabajo

Al Dr. Macario Martínez, por su entrañable amistad y cooperación; fue base fundamental en el desarrollo experimental. A Víctor Ortiz por su excelente apoyo técnico.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Iván, Remberto y Carolina, quienes me compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, y a todas aquellas personas que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome y ayudaron a que se realizara este logro.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	i
Lista de Abreviaturas	ii
Resumen	iv
Abstract	v
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer.....	1
1.2. Cáncer de cuello uterino y el Virus del Papiloma Humano	2
1.3. Ciclo viral de los papilomavirus.....	3
1.4. Papel de las oncoproteínas E6 y E7 en la carcinogénesis cervical	4
2. Apoptosis.....	6
2.1. Regulación proteosomal de proteínas apoptóticas.....	11
2.2. Mecanismos de resistencia a la apoptosis.....	13
3. Familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis.....	14
II. ANTECEDENTES DIRECTOS	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	21
5.1. General	21
5.2. Particulares	21
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1. Cultivo celular	23
7.2. Ensayos de <i>western blot</i> e inmunoprecipitación	23
7.3. Anticuerpos	25
7.4. Ensayos de viabilidad celular	25
VIII. RESULTADOS	26
8.1. Los niveles citoplasmáticos de los componentes reclutados al complejo TNFR1 son diferentes en CaSki y en SiHa, principalmente en los niveles de las proteínas IAP y DUB.....	26

8.2. Se reclutan exclusivamente componentes anti-apoptóticos al complejo asociado al TNFR1 estimulado con TNF α	29
8.3. La inhibición del proteosoma por MG132 impacta los niveles de expresión de las proteínas que pueden formar parte del complejo asociado al TNFR1.	31
8.4. El Birinapant impacta fuertemente en el nivel de cIAP1 y provoca muerte celular en CaSki.	35
8.4.1. El birinapant induce muerte celular en CaSki.....	37
8.4.2. La caspasa-8 se procesa y activa completamente en CaSki después del tratamiento con birinapant.....	39
IX. DISCUSIÓN.....	40
X. CONCLUSIONES.....	49
XI. PERSPECTIVAS.....	49
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	50

Índice de Figuras

FIGURA 1. Mecanismos del Cáncer	2
FIGURA 2. Ciclo de vida productivo del HPV y desarrollo del cáncer	4
FIGURA 3. Carcinogénesis asociada al HPV	5
FIGURA 4. Vías de muerte celular; intrínseca y extrínseca	7
FIGURA 5. Sistema ubiquitin-proteosoma	12
FIGURA 6. Familia de las IAPs	16
FIGURA 7. Mecanismo de acción del Birinapant	18
FIGURA 8. Diagrama simplificado de la estrategia experimental	22
FIGURA 9. Niveles de expresión de los receptores de muerte	27
FIGURA 10. Niveles de expresión basal de algunos componentes que pudieran ser reclutados al complejo asociado al TNFR1	28
FIGURA 11. Las DUB se encuentran más expresadas en SiHa con respecto a CaSki	28
FIGURA 12. Reclutamiento exclusivo de proteínas anti-apoptóticas al TNFR1 estimulado con TNF α	30
FIGURA 13. Reclutamiento del complejo cIAP/TRAF al TNFR1 estimulado con TNF α	31
FIGURA 14. Efecto de la inhibición del proteosoma sobre los niveles de expresión de las proteínas que pudieran formar parte del complejo TNFR1	32
FIGURA 15. NIK se encuentra ubiquitilado en K48	33
FIGURA 16. Inmunoprecipitación de RIP en CaSki y SiHa estimuladas con TNF α	34
FIGURA 17. RIP es ubiquitilado después del estímulo con TNF α	35
FIGURA 18. Efecto del Birinapant sobre los niveles de la familia IAP	36
FIGURA 20. El birinapant induce muerte celular en CaSki	38
FIGURA 21. Activación de Caspasa-8 inducida por birinapant en células CaSki	39
FIGURA 22. Formación de una plataforma de activación de Caspasa-8	40

Lista de Abreviaturas

μg	Microgramos
μM	Micromolar
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
ATP	Adenosin Trifosfato
BIR	Baculovirus IAP repeat
CARD	Dominios de reclutamiento de caspasas
ciAP1	Proteína celular inhibidora de la apoptosis 1
ciAP2	Proteína celular inhibidora de la apoptosis 2
CO₂	Dióxido de carbono
DED	Dominio Efecto de Muerto
DISC	Complejo Inductor de la señalización de muerte
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAsa	Endonucleasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FAS	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FASL	Ligando de Fas
h	Horas
HPV	Virus del papiloma humano
IKK	Kinasa de IκB
IκB	Inhibidor NF-κB
kDa	Kilo-Dalton
LCR	Región Larga de Control
MEM	Medio esencial mínimo
mM	Milimolar

mRNA	RNA mensajero
NF-κB	Factor nuclear κB
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIK	Kinasa de NF-κB
nt	Nucleótido
ORF	Marco de Lectura Abierto
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RING	Dedo de Zinc (<i>Really Interesting New Gene</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
TAE	Tris. Ácido acético, EDTA.
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF2	Proteína 2 asociada al receptor de TNF
TRAF3	Proteína 3 asociada al receptor de TNF
UV	Luz ultravioleta
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X

Resumen

La adquisición de resistencia a la apoptosis es un evento fundamental en el desarrollo del cáncer. Entre los mecanismos utilizados por las células cancerosas para evadir la apoptosis se encuentran el impedimento en la activación de las caspasas y la sobreexpresión de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP). Además, las líneas celulares de carcinoma cervical presentan una respuesta diferencial a diversos inductores de apoptosis, incluyendo FASL y TNF α . La estimulación con TNF α conduce las células a la formación de dos complejos de señalización: un complejo temprano en la membrana que participa en la activación de NF- κ B que señala para supervivencia celular y un complejo en el citoplasma implicado en la inducción de apoptosis. Las proteínas IAP celulares, cIAP1 y cIAP2, desempeñan un papel clave en la promoción de la señalización de supervivencia inducida por los receptores de muerte. Por lo tanto, decidimos investigar varios de los componentes que se reclutan para formar el complejo de señalización de TNFR1, usando dos líneas celulares de carcinoma cervical HPV-16+ y mediante el uso de citometría de flujo, *western blot* y ensayos de inmunoprecipitación. Los resultados muestran diferencias en las IAPs y los componentes que forman parte de las ubiquitin ligasas que conforman. Las líneas celulares CaSki y SiHa, se trataron con birinapant como agente único o en combinación con cisplatino y/o TNF α , su función conocida es promover degradación de las IAPs. Interesantemente, al disminuir los niveles de cIAP1, observamos efectos sobre la viabilidad celular solo en las células CaSki, a nivel de la apoptosis, pero no observamos diferencias significativas en las proteínas analizadas y que son reclutadas al complejo TNFR1, Estos resultados apoyan la combinación terapéutica de birinapant con otros agentes como el cisplatino, como una estrategia para el tratamiento de algunos tumores de cáncer cervical.

Abstract

The acquisition of apoptosis resistance is a fundamental event in cancer development. Among the mechanisms used by cancer cells to evade apoptosis are impairment of the activity of the caspases and dysregulation of the inhibitor of apoptosis (IAP) proteins. In addition, cervical carcinoma cells present a differential response to different apoptosis inducers including FASL and TNF α . TNF α stimulation of cells leads to formation of two signaling complexes: an early complex in the membrane functioning in NF- κ B activation and a later complex in the cytoplasm involved in apoptosis. The cellular proteins of family of apoptosis inhibitors (IAPs), cIAP1, and cIAP2 play key roles in the switch involved in promotion of survival signaling or apoptosis signals induced by members of the TNF superfamily of cell surface receptors. Thus we decide investigate these IAPs and several proteins which are recruited to the TNFR1 signalosome, by using flowcytometry, western blot and immunoprecipitation assays in the two HPV-16+ cervical carcinoma cell lines, CaSki y SiHa. After comparing CaSki and SiHa cells, the results revealed difference in the protein level of ubiquitin ligase components of the TNFR1 signalosome, including cIAP1 and cIAP2. Therefore, the two cell lines were treated with birinapant which promotes degradation of these IAPs. Interestingly birinapant used as a single agent promoted apoptosis only in CaSki cells and used in combination with cisplatin or/and TNF α , also showed synergistic effect on apoptosis in CaSki cells, but no in the SiHa cells. We did not observe significant differences in the elements recruited to the TNFR1 complex when compared SiHa and CaSki cells. However, these results support the therapeutic combination of birinapant with multiple chemotherapies, in particular, those therapies that can induce TNF secretion for some of the cervical carcinoma cells.

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

Según la ficha técnica de GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr/>), en el año 2012 en todo el mundo hubo aproximadamente 14.1 millones de nuevos casos de cáncer, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32.6 millones de personas que viven con cáncer (dentro de los 5 años del diagnóstico). Entre estos, el 57% (8 millones) de nuevos casos de cáncer, el 65% (5,3 millones) de las muertes por cáncer y el 48% (15,6 millones) de los casos prevalentes de cáncer de 5 años ocurrieron en las regiones menos desarrolladas del mundo. El tratamiento del cáncer requiere una selección cuidadosa de una o más intervenciones, como cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, a pesar de los grandes avances en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos y diseño de ensayos clínicos adaptados, comúnmente se observa resistencia a la terapia, en la mayoría de los casos de cáncer (Mohammad, 2015).

El cáncer surge cuando el complejo balance entre proliferación y muerte celular que mantiene la renovación tisular es afectado. Una célula normal inicia un proceso de oncogénesis a través de la acumulación de una serie de mutaciones genéticas y cambios epigenéticos que resultan en la alteración de vías de regulación críticas, lo que da lugar a la tumorigénesis (Hanahan, 2000). Como consecuencia de estas anomalías, se desarrolla una célula transformada que adquiere nuevas características (Figura 1): la capacidad de proliferar, de invadir, de reclutar su propio sistema vascular (angiogénesis), de producir metástasis y de suprimir su proceso apoptótico (Vermeulen, 2011).

La mayoría de los cánceres albergan una heterogeneidad genética significativa, lo que favorece los patrones de recaída después de muchas terapias, y se deben a que estas células malignas desarrollan resistencia al

tratamiento. Si bien, se han realizado esfuerzos para combinar terapias dirigidas, la falta de éxito, el aumento de los costos de los medicamentos y los niveles significativos de toxicidad, han obstaculizado los esfuerzos para tratar eficazmente el cáncer con combinaciones de múltiples fármacos y utilizando terapias actualmente aprobadas. Por lo tanto, la superación de los mecanismos de resistencia de la terapia es uno de los objetivos más buscados en la investigación del cáncer (Mohammad, 2015).

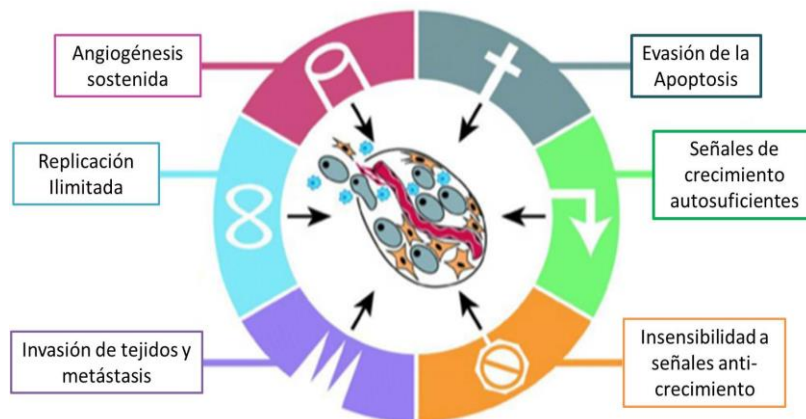


FIGURA 1. Mecanismos del Cáncer. Cuando una célula normal comienza un proceso de tumorigénesis se inhiben mecanismos reguladores críticos, como consecuencia, la proliferación celular se desregula. El aumento de la proliferación puede resultar en la acumulación de mutaciones que causan inestabilidad genómica. Las mutaciones en el genoma conducen a la adquisición de nuevas características, tales como la invasión de tejidos/órganos y la angiogénesis, además las vías apoptóticas se encuentran desreguladas. Modificada de Hanahan y Weinberg, 2000.

1.2. Cáncer de cuello uterino y el Virus del Papiloma Humano

La infección persistente con los virus del papiloma humano (por sus siglas en inglés, HPV) es el principal factor de riesgo en el desarrollo de numerosas neoplasias malignas humanas en diversos sitios anatómicos (Ganti, 2015) (Zur Hausen, 2002). De estos, el cáncer de cuello uterino es el más importante, afecta predominantemente a mujeres en los países en vías de desarrollo y causa más de 600,000 nuevos casos anualmente (Zur Hausen, 2002) (Parkin & Bray, 2006). Aunque se sabe que alrededor de 200 tipos de HPV infectan a los humanos, solo una pequeña proporción de estos se han asociado con el desarrollo de cáncer (Bouvard, 2009) ((IARC), International Agency for

Research on Cancer, 2007). Los HPV se clasifican en cinco géneros: alfa (α), beta (β), gamma (γ), mu (μ) y nu (ν). Los géneros α y β han sido investigados más intensamente (Bernard, 2010). El grupo α -papillomavirus contiene miembros que infectan la mucosa epitelial y se dividen en tipos de bajo riesgo (por sus siglas en inglés, LR) y de alto riesgo (por sus siglas en inglés, HR), según su capacidad para causar cáncer. Las infecciones virales producidas por los tipos LR resultan en lesiones benignas, comúnmente causadas por HPV-6 y HPV-11, mientras que las infecciones virales con los tipos HR se han asociado con tumores malignos en regiones anogenital y de cabeza y cuello; de éstos, HPV-16 y HPV-18 causan aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de cuello uterino, mientras que el 20% restante se asocian predominantemente con otros HPV (HPV-31, HPV-33, HPV-45 y HPV-58) (De Villiers, 2004) (Thomas, 2008). Curiosamente, en los cánceres de cabeza y cuello HPV-positivos, que afectan principalmente la orofaringe, las amígdalas y la base de la lengua, el HPV-16 es el más frecuente, mientras que los otros tipos de HR se detectan muy rara vez (Chaturvedi, 2013).

1.3. Ciclo viral de los papilomavirus

Los tipos α -HPV infectan la mucosa epitelial y se cree que ingresan a través de microlesiones e infecta las células basales del epitelio (Figura 2). El ciclo viral depende estrictamente de la diferenciación celular de los queratinocitos, que son la principal célula diana. El virus no tiene maquinaria replicativa propia, por lo tanto, depende de la división celular y la estratificación del epitelio, que se produce desde las capas basales hacia las capas suprabasales, explotando este proceso para replicarse y producir nuevos virus. En este proceso, las oncoproteínas, E6 y E7, desempeñan un papel crucial. Su acción conjunta dirigida a diversas vías de señalización celulares implicadas en la regulación del control del ciclo celular y la apoptosis

permite que el virus mantenga la proliferación celular en regiones suprabasales altamente diferenciadas, permitiendo que se produzca la amplificación del genoma viral (Ganti, 2015) (Doorbar, 2012).

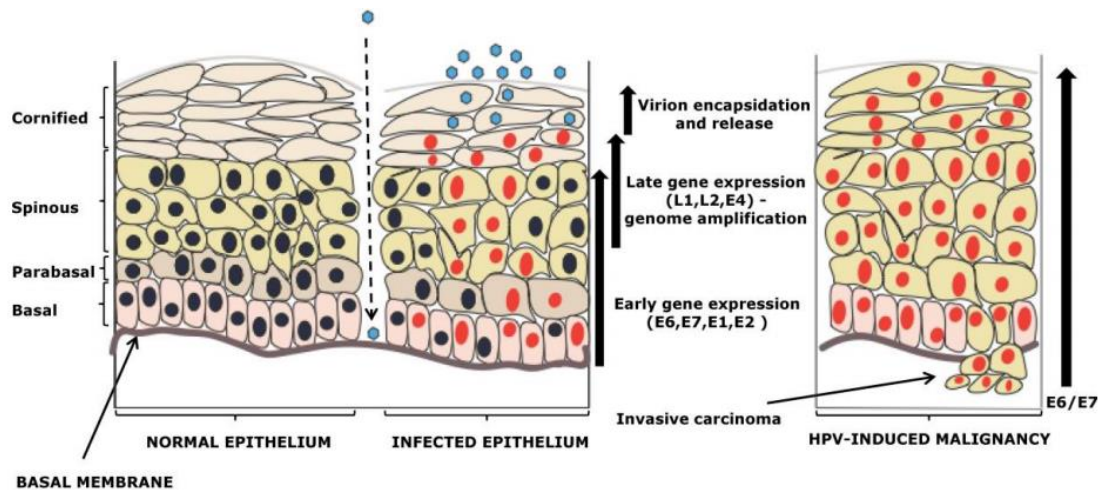


FIGURA 2. Ciclo de vida productivo del HPV y desarrollo del cáncer. El panel izquierdo muestra la propuesta de ruta propuesta para la infección por HPV a través de microlesiones en la mucosa epitelial. La expresión controlada de las proteínas virales, específicamente, los oncogenes E6 / E7, actúan sobre sus sustratos p53 / pRb, promoviendo la proliferación celular continua. Esto permite que el virus amplifique su genoma, complete su ciclo de vida productivo y finalmente produzca nuevos viriones. Si el sistema inmune del huésped no resuelve la infección viral y persiste por un largo período de tiempo, puede resultar en una malignidad inducida por el HPV, en la cual el virus no completa su ciclo de vida, y las oncoproteínas E6 y E7 son altamente sobreexpresadas. Tomada de (Thomas, 2008).

1.4. Papel de las oncoproteínas E6 y E7 en la carcinogénesis cervical

El ciclo viral normal de los tipos HR de papilomavirus es un proceso altamente regulado y coordinado. Sin embargo, en algunos casos, principalmente durante la infección persistente, el DNA viral se integra al azar en el genoma de la célula huésped, lo que lleva a la inmortalización celular y, en última instancia, a la progresión maligna. El resultado de este proceso es el colapso de la capacidad de replicación viral: la mayoría de los genes virales se pierden mientras los dos principales oncogenes virales, E6 y E7, permanecen expresándose incontrolablemente, lo que impulsa la inmortalización celular y lleva a la transformación celular, que finalmente puede producir el desarrollo

del cáncer (Figura 3) (Androphy, 1987) (Smotkin & Wettstein, 1986). Además, se ha demostrado que las actividades complementarias de E6 y E7 son necesarias para inmortalizar los queratinocitos humanos primarios; E6 promueve la degradación proteasomal de p53, por lo que interfiere con las vías de supervivencia celular y E7 promueve la proliferación celular mediante la liberación y activación de pRb (Barbosa & Schlegel, 1989) (Mantovani & Banks, 2001). Aunque, se ha observado que E7 es la principal oncoproteína transformante, mientras que E6 parece ser más probable que desempeñe un papel secundario en la contribución a las etapas posteriores de la malignidad. Sin embargo, cuando se expresan por separado, ni E6, ni E7, tienen un impacto significativo sobre la inmortalización celular (Strati & Lambert, 2007).

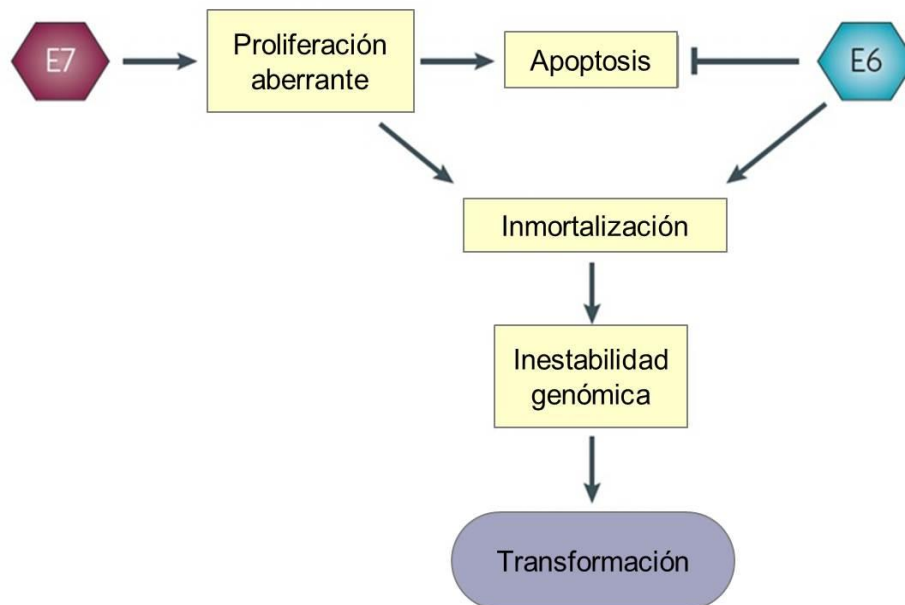


FIGURA 3. Carcinogénesis asociada al HPV. Las oncoproteínas E6 y E7 actúan en conjunto para inducir inmortalización y transformación celular. E6 bloquea la apoptosis degradando p53, por su parte E7 promueve la proliferación degradando pRb. Modificado de (Laimins, 2010).

2. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, está altamente conservada entre todos los animales. Este proceso juega un rol crítico durante la embriogénesis, homeostasis y remodelación de los tejidos, y sirve para remover células no deseadas tales como células tumorales, células con daño irreparable de DNA o aquellas infectadas con virus. Una deficiencia en la apoptosis contribuye a la patogénesis del cáncer, desordenes autoinmunes e infecciones virales sostenidas, mientras que una apoptosis excesiva resulta en muerte celular inapropiada y consecuentemente en otros desordenes degenerativos (Deveraux, 1998). Los cambios morfológicos observados durante la apoptosis incluyen daño mitocondrial, ruptura de la membrana nuclear, fragmentación del DNA, condensación de la cromatina, y la formación de cuerpos apoptóticos (Himeji, 2002).

Existen dos vías clásicas de apoptosis, la vía intrínseca y la extrínseca (Figura 4). La vía intrínseca se encuentra bajo una robusta regulación por varios tipos diferentes de moléculas que pueden ser separadas en dos clases principales: las proteínas anti-apoptóticas tales como XIAP (inhibidores de la apoptosis) o proteínas de la familia BCL como Bcl₂, Bcl_{xl} o las proteínas pro-apoptóticas que incluyen, a los miembros de la familia BCL: BAX, BAD, BID, y SMAC/DIABLO, que son activados a través de eventos de señalización que conducen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, por sus siglas en inglés). El citocromo C es liberado, y se une con Apaf-1 y la caspasa-9 para formar el apoptosoma (Siu, 2008). Tras la formación del apoptosoma, caspasa-9 se vuelve catalíticamente activa y actúa sobre blancos río abajo como las caspasas efectoras 3 y 7 (Ohtsuka, 2003).

Las células tumorales pueden bloquear la señalización de la vía intrínseca de apoptosis mediante la participación de mecanismos antiapoptóticos como la

sobreexpresión de supresores de apoptosis (Bcl₂, Bcl_{xl}) y/o a través de reducir la expresión de inductores de apoptosis tales como la familia de las caspasas (2, 4, 6, 8, 9, 10, 12) (Elmore, 2007). Los mecanismos que inhiben la vía intrínseca de la apoptosis están interconectados con la actividad de las vías de AKT y de NF-κB. Por lo tanto, si la vía AKT esta sobreactivada, conduciría a una inhibición de la vía intrínseca de apoptosis, ya que la señalización de AKT promueve la actividad de Bcl₂ y Bcl_{xl}, al mismo tiempo que inhibe BAX y BAD, los cuales participan en la inducción de la apoptosis (Tait, 2010). El bloqueo de la actividad de BAX y BAD puede prevenir la apertura de la MOMP, evitando de este modo la liberación del citocromo C, y en consecuencia la inhibición de la formación del apoptosoma.

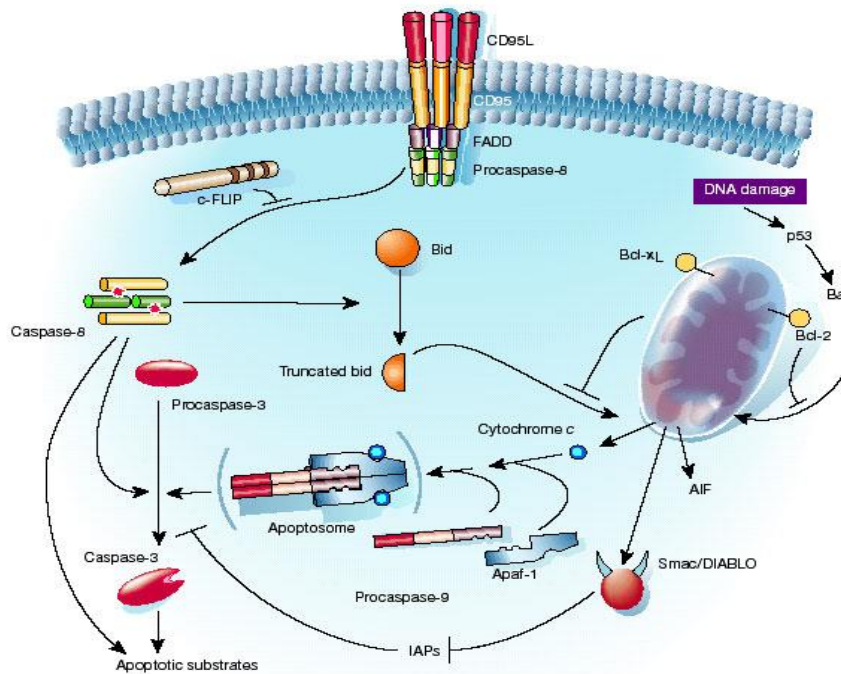


FIGURA 4. Vías de muerte celular; intrínseca y extrínseca. La apoptosis mediada por receptor se inicia con el reclutamiento y la activación de la caspasa-8, la cual, a su vez, puede activar a la caspasa-3. La vía intrínseca involucra la translocación de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, a la membrana mitocondrial, lo que resulta en la liberación de factores proapoptóticos al citosol. En el citoplasma, heptámeros de citocromo c, Apaf-1 y la procaspasa-9, forman el apoptosoma, activándose la caspasa-9, que a su vez activa a la caspasa-3. Además, las señales iniciadas por el receptor pueden ser transducidas a la vía mitocondrial, por el corte y activación de Bid. Tomada de (Hengartner, 2000).

Otra familia de proteínas anti-apoptóticas que puede inhibir tanto la vía intrínseca como la extrínseca, son las proteínas inhibidoras de la apoptosis (por sus siglas en inglés, IAP). La familia de las IAPs puede bloquear la formación del apoptosoma a través de la unión directamente a Apaf-1 o caspasa-9 (XIAP), por lo tanto, la inhibición de la activación de caspasa-9, o impedir la formación del complejo asociado a los receptores de muerte (cIAP1 y cIAP2), e impedir la activación de caspasa-8 (Deveraux, 1998). XIAP también puede unirse directamente a la caspasa-3 impidiendo su activación, y junto con la actividad de bloqueo, facilita la transferencia de ubiquitina, para el etiquetado de las caspasas y de este modo la degradación por el proteosoma 26S (Schile, 2008).

La vía extrínseca (también conocida como la vía de los receptores de muerte) implica la inducción de la apoptosis a través de la activación de receptores de muerte por medio de la unión de sus ligandos, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), FAS, y el ligando inductor de muerte relacionado con TNF (TRAIL) (Wallach, 2008). Mientras FAS y TRAIL activan estrictamente la vía extrínseca de apoptosis, TNF α puede desempeñar dos papeles diferentes, aunque esta molécula es capaz de inducir apoptosis, también es capaz de activar vías pro-supervivencia. La activación por TNF impacta en varias vías celulares críticas, algunas de las cuales incluyen proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Naude, 2011). Más específicamente, la unión de TNF α a su receptor afín puede conducir a la formación de dos complejos diferentes: el Complejo 1 que puede conducir a la inducción de NF- κ B (vía pro-supervivencia) (Wajant, 2011); o el Complejo 2 que activa la vía apoptótica mediada principalmente a través de FADD (proteína con dominio de muerte asociado a FAS) y la activación de caspasa-8 (Tran, 2009) (Wang, 2008).

El Complejo 1 media la inducción de NF- κ B, que se inicia a través de la unión de TNF α al TNFR que luego lleva al reclutamiento de dos proteínas

adaptadoras: la proteína asociada al receptor de TNF con un dominio de muerte (TRADD) y la proteína que interactúa con el receptor 1 (RIP1) (Chen, 2005). Tras la unión de TRADD, otra molécula adaptadora, el factor 2 asociado a TNF (TRAF2) es reclutada, seguida de cIAP1 (Proteína celular inhibidora de la apoptosis), así como de UBC6 y UBC13 (enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina) (Fukushima, 2007) (WU, 2005) para formar el complejo 1. Una vez que el Complejo 1 se forma, se activan eventos de señalización claves, RIP1 puede ser poliubiquitilado ya sea en la Lisina63 (K63) o Lisina48 (K48), una vez poliubiquitilado, puede mediar la activación de NF- κ B a través de cascadas de señalización vinculadas al complejo IKK (Shi, 2003). TRAF2, cIAP, y UBC13 funcionan en conjunto para facilitar la poliubiquitilación de RIP1 en K63 (Wicovsky, 2009). La poliubiquitilación en K63 de RIP1 conduce a la activación del complejo TAK1/TAB que a su vez activa el complejo IKK (Habelhah, 2004). El complejo IKK consta de varios componentes, IKK α , IKK β , e IKK γ , este complejo fosforila a la molécula inhibidora de Kappa-B (I κ B α) (Ea, 2006). I κ B α , es un inhibidor que está unido a NF- κ B y que previene su importación nuclear. Sin embargo, una vez que I κ B α es fosforilada, es susceptible a poliubiquitilación en K48 y ser degradada por el proteosoma, por lo tanto, ocurre la liberación de la inhibición de NF- κ B. Una vez liberado, NF- κ B puede translocarse al núcleo y unirse a sus sitios de unión al DNA para la activación de genes (Mathes, 2008). NF- κ B regula varios tipos diferentes de genes: como de respuesta inflamatoria, de pro-supervivencia, como la familia BCL, cFLIP, cIAP1 y genes que participan en angiogénesis y proliferación, como Ciclina D1 y MYC (Papa, 2006). Curiosamente, la inhibición del proteosoma puede impedir la vía de NF- κ B porque se evita la degradación de I κ B α , conduciendo a una disminución en la activación de NF- κ B (Li, 2001).

La inducción de la apoptosis por la vía de TNF α a través del Complejo 2 se inicia a través de diferentes eventos; sin embargo, los eventos críticos implican el agotamiento de los niveles de expresión de cFLIP y/o de cIAP1, así como la

fosforilación de RIP1 (Biton, 2011) (Rangamani, 2007). Una vez fosforilado RIP1, FADD y la caspasa-8 son reclutados para el montaje del complejo 2. Este complejo se forma cuando los niveles de las cIAPs decaen, ya sea a través de la regulación por SMAC, u otros agentes quimioterapéuticos, tales como etopósido. Una vez formado el complejo 2, se procesa la caspasa-8 y enseguida puede cortar sus blancos río abajo, como son las caspasas efectoras 3 y 7, que llevan a apoptosis (Bertrand & Vandenabeele, 2011).

La apoptosis mediada por las vías de FAS y TRAIL son muy similares entre sí, sus ligandos se unen a sus receptores triméricos específicos para inducir apoptosis. TRAIL se une a los receptores DR4/DR5 lo cual conduce a la oligomerización de los receptores en la membrana plasmática (Mollinedo, 2006). Una vez que los receptores oligomerizan se recluta la proteína adaptadora FADD; esta se une al receptor de TRAIL y conduce al reclutamiento de la caspasa-8 para formar el complejo inductor de la señalización de muerte (DISC). La formación del DISC hace que la procaspasa-8 se active autocatalíticamente, una vez activa se procesa la caspasa-8 en fragmentos, llamados las subunidades activas p18 y p10, mediante por lo menos de dos eventos de corte. Una vez procesados los dímeros p18 y p10 pueden oligomerizar con otros dímeros p18/p10 para formar heterotetrámeros activos, que cortan sustratos río abajo tales como HDAC7 (Scott, 2008), y las caspasas efectoras (3 y 7) que inducen completamente la respuesta apoptótica (Diessenbacher, 2008).

Durante la oncogénesis, las células tumorales utilizan una variedad de mecanismos para inactivar la vía extrínseca de apoptosis; un mecanismo en particular implica la disminución de la expresión del receptor de muerte o la sobreexpresión de los receptores "Decoy" (Matsuda, 2005). Se podría argumentar que la pérdida de la expresión del receptor tendría un efecto más profundo en FAS y TRAIL en comparación con TNFR1. Una célula

tumorigenica prefiere la expresión de TNFR, porque esto permite la activación de NF- κ B y otras vías de supervivencia y proliferación. Las células tumorales desregulan los receptores de FAS y TRAIL para inhibir la activación de la vía extrínseca. Además de los niveles de expresión del receptor o la inhibición mediada por receptores “decoy”, la vía extrínseca también puede ser inhibida por mecanismos similares a los que inhiben la vía intrínseca, como la sobreexpresión de las proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl₂, Bcl_{xl}, cIAP1 y XIAP (Fulda, 2002) (Hinz, 2000).

2.1. Regulación proteosomal de proteínas apoptóticas

El sistema ubiquitin-proteosoma tiene un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas y en el mantenimiento de su integridad. La ubiquitilación de proteínas puede conducir a diferentes resultados fisiológicos, dependiendo de si una ubiquitina (monoubiquitilación) o múltiples cadenas de ubiquitina están vinculadas al sustrato. En principio, se pueden generar ocho diferentes polímeros de ubiquitina. Cada enlace de ubiquitina conduce a diferentes estructuras tridimensionales y cumple diferentes funciones, ya que son reconocidas diferencialmente por los dominios asociados a la ubiquitina (UBA, por sus siglas en inglés). Las cadenas de ubiquitina ramificadas en la Lisina-48 (K48) etiquetan proteínas para la degradación proteosomal, mientras que los enlaces lineales en la Lisina-63 (K63) y en la Lisina-11 (K11) sirven como sitios de andamiaje para la transducción de señales (Dikic, 2009).

La ubiquitina está generalmente unida a un residuo de lisina y glicina en el C-terminal a través de enlaces isopeptídicos. La transferencia de ubiquitina o una cadena de ubiquitina a un sustrato está mediada por la acción secuencial de tres enzimas: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y una ligasa de ubiquitina (E3) (Figura 5) (Haas, 2009).

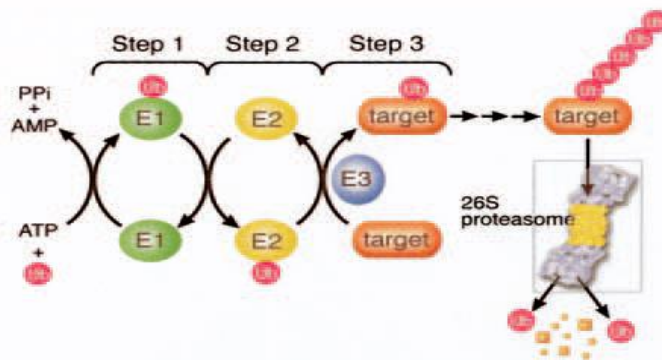


FIGURA 5. Sistema ubiquitin-proteosoma. Las proteínas poliubiquitiladas en K48 son objeto de degradación por el proteasoma. Una enzima activadora de ubiquitina (E1) se une a la ubiquitina de una manera dependiente de ATP. La ubiquitina se transfiere a continuación a una enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Una ligasa de ubiquitina (E3) ayuda a la transferencia de ubiquitina al sustrato objetivo. PPI, pirofosfato; AMP, adenosina monofosfato; Ub, ubiquitina. Tomada de (Haas, 2009).

La degradación de proteínas es un proceso importante que afecta un gran número de vías de señalización entre ellas la apoptosis, ya que un gran número de proteínas pro-apoptóticas son ubiquitiladas en K48 para promover su degradación proteosomal y mantener un fenotipo de resistencia a quimioterapias. Como fue descrito anteriormente gran parte de las proteínas involucradas en las vías apoptóticas son sujetas a mono y poliubiquitilación, en diferentes residuos de lisina. Los componentes del DISC son un ejemplo importante de este aspecto ya que el estar o no poliubiquitilados depende si continúan con la señalización apoptótica o por el contrario activan vías de supervivencia.

Está bien establecido que la activación de NF- κ B depende del sistema de ubiquitina. En el caso de la señalización de TNFR1, TRAF2 y cIAP1/2 unen cadenas de ubiquitina en K63 a RIP1 (Bertrand & Vandenabeele, 2011) (Wajant, 2011). La ubiquitilación de RIP1 conduce al reclutamiento y activación de TAK1 y TAB1 junto con TAB2 o TAB3. El reclutamiento y la activación del complejo TAK/TAB es esencial para la señalización NF- κ B (Haas, 2009). Tanto cIAP1 como cIAP2 contienen el dominio UBA y por lo tanto no solo conjugan

polímeros de ubiquitina a sus sustratos, sino que también reconocen cadenas de ubiquitina y por lo tanto funcionan como un receptor de ubiquitina (Gyrd-Hansen M, 2008).

2.2. Mecanismos de resistencia a la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso evolutivamente conservado que desempeña un papel esencial en el desarrollo del organismo y la homeostasis tisular. Sin embargo, en condiciones patológicas, particularmente en el cáncer, las células pierden su capacidad de sufrir muerte inducida por apoptosis que refuerza una proliferación descontrolada. Con frecuencia, se encuentra que las células cancerosas utilizan diversos mecanismos que les permiten escapar de la muerte celular programada (Mohammad, 2015).

La transformación progresiva de células normales en malignas es un proceso complejo y de etapas múltiples, el cual requiere alteraciones del genoma y la evasión (un incumplimiento) de los puntos de control intracelulares. En este sentido, las células cancerosas a menudo residen en un microambiente originado por algunas mutaciones, tales como defectos en la maquinaria apoptótica, que les confieren una ventaja para su supervivencia (Indran, 2011).

Las terapias contra el cáncer están diseñadas principalmente para inducir la muerte celular. Cuando las células tumorales adquieren la capacidad de escapar a la muerte celular inducida por fármacos, ya sea por defectos en proteínas pro-apoptóticas, como las solo-BH3, o por la sobreexpresión de proteínas pro-supervivencia, cualquiera de estos eventos conducirá a una resistencia a la quimioterapia (Obexer, 2014).

La regulación positiva de la familia de proteínas anti-apoptóticas es una explicación frecuente para la resistencia observada en las células cancerosas. Las IAP son una clase de proteínas anti-apoptóticas sobre-expresadas en gran variedad de cánceres humanos. Las IAPs inhiben la actividad de las caspasas y, por lo tanto, protegen a las células de los efectos deletéreos de caspasas activas ⁽⁵²⁾. La proteína cFLIP inhibe la escisión autoproteolítica de la pro-caspasa-8, que ocurre en el complejo asociado a los receptores de muerte, por lo tanto, bloquea la transducción de señales de muerte río abajo de la vía extrínseca de apoptosis. Además de la regulación positiva de factores pro-supervivencia, la supresión de proteínas pro-apoptóticas también contribuye a la resistencia contra los regímenes terapéuticos inductores de la apoptosis.

La resistencia a la apoptosis es multifactorial e implica la interacción de diversas vías de señalización a múltiples niveles. Por lo tanto, el uso de agentes dirigidos a una sola vía para comprometer a las células cancerosas a experimentar apoptosis no es una estrategia factible (excepto en casos aislados). Por lo tanto, esto requiere una cuidadosa selección de estrategias de tratamiento que se basen en una comprensión integral de las vías de señalización involucradas en la resistencia (Obexer, 2014).

3. Familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis

La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis es una de las principales responsables de la resistencia a diversos estímulos apoptóticos y con frecuencia se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer (Obexer, 2014). Las IAPs fueron originalmente identificadas en los baculovirus, y son indispensables para impedir la apoptosis inducida por el virus y, por ende, permiten la infección y propagación viral. Actualmente se han identificado algunos homólogos en humanos (XIAP, cIAP1, cIAP2 y Survivina) que al igual que su contraparte viral, pueden inhibir la apoptosis inducida por

distintos estímulos. Se han identificado dos dominios en las IAPs: el dominio "BIR" y el dominio "RING". El BIR es un dominio de unión a residuos de zinc, su presencia en una proteína, la hace miembro de la familia IAPs. Se han identificado de una a tres copias de este dominio en varias proteínas. Los BIRs son esenciales para la propiedad antiapoptótica de las proteínas, y en varios casos, a este dominio le ha sido atribuido la unión e inhibición de las caspasas (Figura 6) (LaCasse, 1998). Algunas IAPs contienen un segundo dominio que se encuentra invariablemente en el extremo carboxilo de las proteínas, llamado dominio RING, el cual tiene actividad de ubiquitin ligasa, de tal forma que reconoce a diversas proteínas y las dirige a su degradación vía proteasoma o favorecer la formación de plataformas multiproteicas que favorecen otras vías de señalización, por ejemplo NF- κ B. cIAP1 y cIAP2 son las únicas IAPs que han sido identificadas bioquímicamente, como parte de un complejo de señalización que es reclutado por el dominio citoplásmico del TNFR (Rothe, 1995). Las actividades de XIAP y otras IAPs no solamente están restringidas a la inhibición de las caspasas, se han obtenido datos en donde algunas de estas proteínas intervienen en la regulación del ciclo celular, degradación de proteínas y en las cascadas de transducción de señales, probablemente mediante su actividad de ubiquitin ligasas.

El regulador fisiológico de las IAPs es SMAC (por sus siglas en inglés, Second Mitochondrial Derived Activator of Caspases), el cual promueve la activación de las caspasas, al impedir la actividad de las IAPs. SMAC es sintetizado como un zimógeno en donde el extremo amino terminal sirve como señal de localización mitocondrial. La forma madura de la proteína se origina cuando se elimina esta señal. En presencia de un estímulo apoptótico la forma madura es liberada al citosol (Chai, 2000). SMAC requiere homodimerizarse para interactuar con las IAPs. Un motivo NH₂-terminal formado por cuatro aminoácidos, Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) es el responsable de la unión con las IAPs (Wu, 2000). SMAC interactúa con los dominios BIR2 y BIR3 de XIAP,

permitiendo la liberación de la caspasa 3 y la caspasa 9 respectivamente; además, SMAC media la disminución de los niveles de cIAP1 y cIAP2, mediante ubiquitilación y degradación por el proteasoma (Srinivasula, 2001).

Las IAPs a su vez, regulan negativamente a SMAC. Los miembros de la familia IAP que poseen un dominio de ubiquitín ligasa, como XIAP, cIAP1, cIAP2, pueden regular los niveles de SMAC por la vía proteasomal. Por lo que su regulación no depende únicamente de los niveles de expresión del RNA mensajero, sino también del balance entre la expresión de las IAPs y de su mecanismo de liberación mitocondrial por ubiquitilación y degradación por el proteasoma (Hu, 2003).

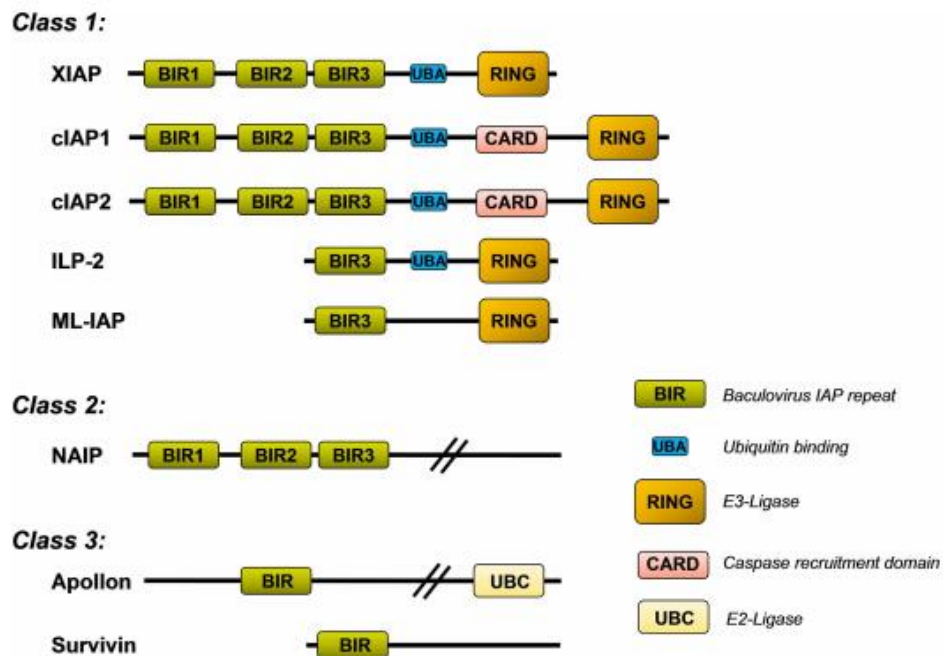


FIGURA 6. Familia de las IAPs. Se muestra la estructura de los 8 miembros de las IAPs en mamíferos que tienen dominios funcionales. Tomada de (Obexer, 2014)

Un enfoque terapéutico prometedor, es sensibilizar las células cancerosas a fármacos quimioterapéuticos mediante el bloqueo funcional de las IAPs a través de compuestos químicos que se unen a los dominios BIR. El hecho de que SMAC actúa como un antagonista natural de las IAPs y que el extremo N-

terminal de SMAC se une con alta afinidad a los dominios BIR2 y BIR3, ha conducido al desarrollo de los denominados "Miméticos de SMAC (SMAC-Mimetics)". Estos miméticos de SMAC son compuestos químicos derivados estructuralmente de la secuencia peptídica AVPI de la parte N-terminal de SMAC. Se han desarrollado una gran cantidad de estos compuestos para tratar de impedir el bloqueo de la apoptosis impuesto por las IAPs (Obexer, 2014).

Los miméticos de SMAC son potentes agentes proapoptóticos, y sus mecanismos incluyen: (I) impedir estéricamente los sitios de unión de XIAP a las caspasas-3, -7 y -9; (II) degradación de XIAP; (III) muerte celular mediada por TNF α ; y (IV) inhibición y degradación de otros miembros de la familia IAP. Esto es importante debido al hecho de que, en muchos casos, otros miembros de la familia IAP (principalmente cIAP1) suprimen la apoptosis mediante mecanismos compensatorios (Bertrand M. M., 2008) (Lu, 2008) (Petersen S. W.-C., 2007) (Varfolomeev E. B., 2007) (Vince JE, 2007).

El Birinapant (TL32711) es un nuevo mimético de SMAC dimérico diseñado específicamente para la degradación de cIAP1 y cIAP2, lo que resulta en un cambio en la señalización del TNFR; la activación de TNFR tras la unión de TNF α con la presencia de cIAP1 y cIAP2 conduce a la activación de NF- κ B y a una proliferación celular incrementada. Por el contrario, después de la inhibición de cIAP1 y cIAP2 mediante el Birinapant, la señalización de TNF α conduce a la activación de caspasa-8 y la inducción de apoptosis (Figura 7) (Gyrd-Hansen & Meier, 2010).

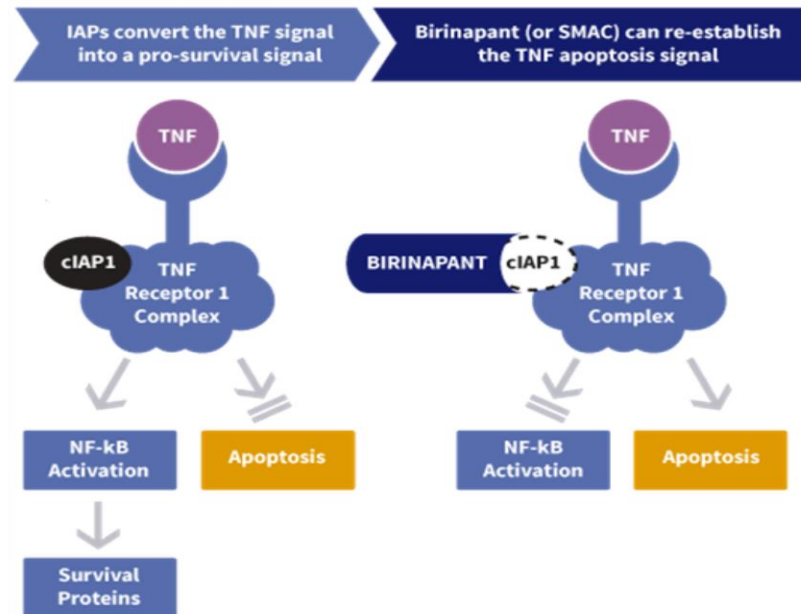


FIGURA 7. Mecanismo de acción del Birinapant. Izquierda, señalización pro-supervivencia promovida por cIAP1. Derecha, el efecto del birinapant sobre cIAP1 provoca que se reestablezca la señalización apoptótica. Modificado de (Gyrd-Hansen & Meier, 2010).

Sin embargo, como la actividad de las IAPs no solamente está restringida a la inhibición de la apoptosis, también surgieron algunos inconvenientes con el desarrollo de estos compuestos, lo que conduce a efectos secundarios no deseados y en parte tóxicos (Obexer, 2014).

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente la resistencia a la apoptosis del cáncer cervical, utilizando como modelo de estudio las líneas celulares C33-A, CaSki (HPV-16), HeLa (HPV-18 y SiHa (HPV-16) que fueron derivadas de cáncer cervicouterino.

Mediante ensayos para evaluar la viabilidad celular, hemos observado que muestran diferentes niveles de resistencia a la apoptosis inducida por diferentes estímulos, tanto de la vía extrínseca como FAS, TNF α y TRAIL,

como de vía intrínseca (usando UV o cisplatino como inductores), siendo las más sensibles C33-A y HeLa, curiosamente las HPV-16+ CaSki y SiHa a pesar de contener el mismo tipo viral, presentan una resistencia diferencial a los estímulos apoptóticos mencionados, siendo CaSki más resistente que SiHa, lo que sugiere que cada una de ellas utiliza diferentes vías para resistir la muerte celular.

Tratando de explicar estas marcadas diferencias en la sensibilidad de nuestras líneas a los tratamientos, hemos analizado marcadores antiapoptóticos como las IAPs (cIAP1, cIAP2, XIAP y Survivina) y hemos encontrado una alta expresión de estos, siendo más expresados en las líneas menos sensibles a la inducción de muerte (CaSki y SiHa), lo que refuerza la hipótesis de que cada línea utiliza estrategias distintas para su sobrevivencia.

Otro parámetro que ha sido evaluado en nuestro grupo y por otros más es el defecto en la activación de la pro-caspasa-8; lo que sugiere que la resistencia podría ser atribuida en parte a la incapacidad para activar Caspasa-8 del Complejo Asociado a los Receptores de Muerte, lo que impide la transmisión exitosa de la respuesta apoptogénica.

Adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha estudiado si esta resistencia no solo se debe a defectos a nivel de la maquinaria apoptótica, sino también el impacto que pudieran tener vías de señalización pro-supervivencia en esta resistencia observada. El factor de transcripción NF- κ B juega un papel crítico en el desarrollo y la progresión maligna del cáncer a través de la inducción de diferentes proteínas pro-supervivencia, así como por sus efectos sobre la angiogénesis, invasión y metástasis de células cancerosas. Por medio de diversos experimentos hemos observado que el factor NF- κ B se encuentra encendido constitutivamente en CaSki y en SiHa, pero de formas distintas, lo que al final pudiera explicar las diferencias observadas en el momento en el

que son sometidas a estímulos de muerte. A pesar de estos resultados, aún falta mucho por analizar y de entender.

Para el caso concreto de la incapacidad del complejo asociado a los receptores de muerte para activar Caspasa-8, debido a que estas células son resistentes a inducción de muerte por ligandos de la familia de TNF. Se ha propuesto que la ubiquitilación es un proceso clave para la regulación de este. De tal forma que es importante conocer la mayoría de los componentes que son reclutados al receptor después del estímulo, y examinar los patrones de ubiquitilación de algunas proteínas reclutadas, y analizar sus vías de degradación. Esto nos daría un panorama de lo que pudiera estar ocurriendo en nuestras líneas celulares y en parte podría ayudar a tratar de explicar el fenómeno de resistencia, y tratar de revertirlo.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en mujeres de países en vías de desarrollo. El 99% de los casos de cáncer cervical están relacionados etiológicamente con el virus del papiloma humano de alto riesgo, principalmente HPV-16 y HPV-18.

Se ha demostrado que las líneas celulares derivadas de cáncer cervical muestran una resistencia diferencial a diversos estímulos externos de muerte; esto parece estar mediado principalmente por defectos en el procesamiento y activación de la pro-caspasa-8, posiblemente debido a la conformación alterada del complejo asociado al TNFR1, del cual no conocemos a profundidad su composición, ni los cambios que debe tener para permitir la activación de la pro-caspasa-8. Por lo que es importante analizar los componentes de este complejo, su localización y sus patrones de ubiquitilación.

IV. HIPÓTESIS

Las líneas celulares CaSki y SiHa, presentan diferencias en la composición del complejo asociado al Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR1), lo que repercute en su resistencia diferencial a la apoptosis

V. OBJETIVOS

5.1. General

Analizar los componentes del complejo asociado al TNFR1 y sus interacciones, además investigar el patrón de ubiquitilación de por lo menos uno de sus componentes en las líneas celulares CaSki y SiHa.

5.2. Particulares

- i. Analizar y comparar los componentes del complejo asociado al Receptor 1 de TNF en las líneas celulares CaSki y SiHa en condición basal.
- ii. Estudiar el reclutamiento de los componentes del complejo asociado al Receptor 1 de TNF bajo estímulos de apoptosis extrínseca.
- iii. Investigar el patrón de ubiquitilación de por lo menos uno de los componentes del complejo asociado al Receptor 1 de TNF en condiciones basales y bajo un estímulo de apoptosis extrínseca.
- iv. Evaluar el impacto de la disminución de los niveles de proteínas remodeladoras del complejo asociado al Receptor 1 de TNF en la resistencia a la apoptosis de las líneas celulares.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

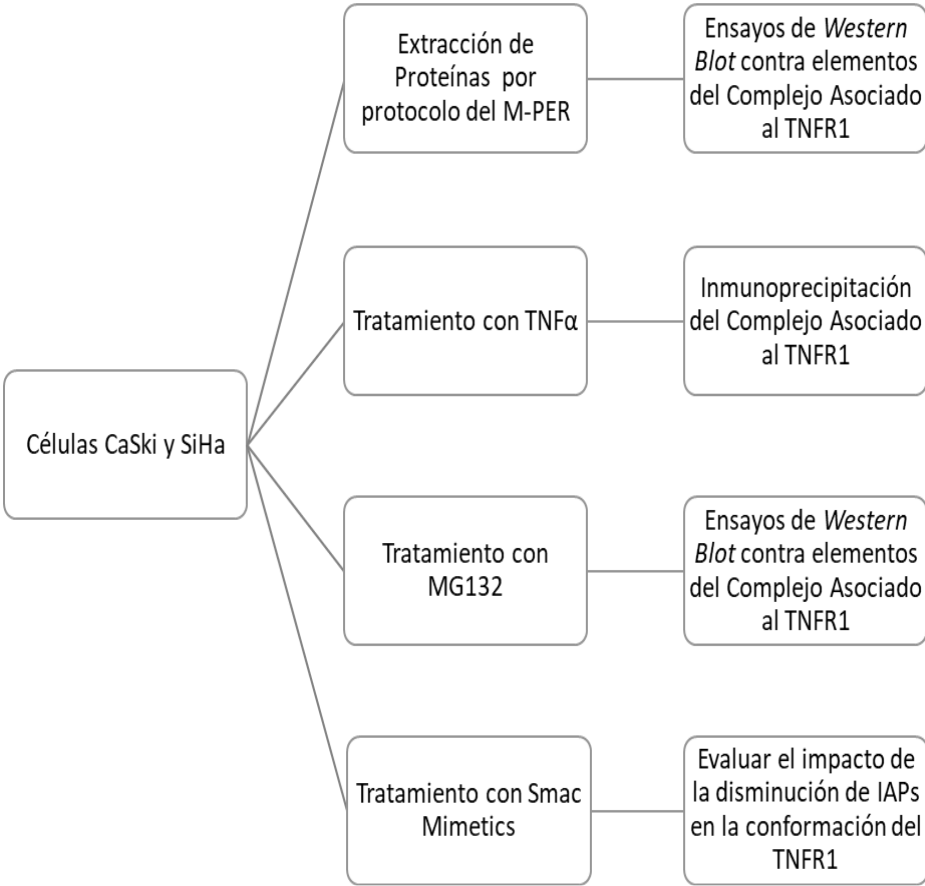


FIGURA 8. Diagrama simplificado de la estrategia experimental llevada a cabo en este trabajo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de carcinoma cervical HPV16+ CaSki y SiHa fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC® CCL-243™). Las células CaSki fueron crecidas a 37° C y 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 50 µg/ml de Estreptomicina, 50 U/ml de Penicilina y 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales. Las células SiHa fueron crecidas a 37° C y 5% de CO₂ en medio MEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 50 µg/ml de Estreptomicina, 50 U/ml de Penicilina. Para los ensayos, se sembraron 2-4 x 10⁶ células en cajas de cultivo de 60mm x 15mm y tratadas con 1, 3 y 5 µM de Birinapant (Active Biochemical Co, Hong Kong, A1901) a diferentes tiempos; con 10 mM de MG132 (Sigma Chemical Co, USA, SML1135) por 6 horas, y con 10-200 ng/ml de TNFα a diferentes tiempos (amablemente proporcionado por el Dr. V. Ortiz, Cinvestav-IPN). Las células control fueron tratadas con 0.1% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) de Sigma Chemical Co. Los medios de cultivo, el suero fetal bovino y antibióticos fueron adquiridos de Gibco BRL (Invitrogen, USA).

7.2. Ensayos de *western blot* e inmunoprecipitación

Los extractos de proteínas totales para *western blot* fueron preparados utilizando 5x10⁶ células. Las células fueron lavadas con solución salina amortiguadora de fosfatos 1X (PBS) y lisadas en 400-600 µl de M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) que fue suplementado con un inhibidor de Proteasas (Complete, Roche, DE). Los extractos fueron clarificados por centrifugación a 12,000 rpm/min a 4° C durante 20 min. La concentración de proteínas fue determinada utilizando Bradford Protein assay Kit (Bio-Rad, USA). Los extractos de proteína (30 µg)

fueron mezclados con una concentración apropiada de Buffer Laemmli 2X o 4X, fueron hervidas a 96°, y separadas por SDS-PAGE y posteriormente transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (PerkinElmer, USA). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo sin grasa en solución salina amortiguadora de Tris (TBS) 1X suplementada con 0.1 % Tween-20 y se dejaron incubando toda la noche utilizando el anticuerpo primario apropiado. Finalmente, los inmunocomplejos fueron revelados utilizando SuperSignal West Pico o West Femto Maximum Sensitivity substrates (Thermo Fisher Scientific, USA) y utilizando el sistema de captura de imagen ChemiDoc (Bio-Rad, USA). La mayoría de las membranas fueron desnudadas y reutilizadas para otros anticuerpos primarios o actina.

Para la inmunoprecipitación de TNFR1 endógeno, las células CaSki y SiHa fueron crecidas en cajas de cultivo de 10 cm, cuando alcanzaron la confluencia apropiada (5×10^6 células), fueron incubadas en presencia o en ausencia de 10-200 ng/ml de TNF α por 15 min. Las células fueron lisadas por 30 min con Buffer DISC (1% Triton X-100, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 20mM Tris, pH 7.5, 2 mM EDTA, y un cocktail inhibidor de Proteasas [Complete, Roche, DE]) en baño de hielo. Los lisados celulares fueron centrifugados a 12,000 rpm/min a 4° C durante 20 min y el material soluble fue preaclorado con Pierce® Protein G Agarose (Thermo Fisher Scientific, USA, 20399) por 2 h a 4° C; anti-TNFR1 (#3738, Cell Signaling, USA) fue agregado a la muestra preaclorada y se incubo toda la noche a 4° C. El complejo asociado al TNFR1 fue precipitado utilizando Pierce® Protein G Agarose (Thermo Fisher Scientific, USA, 20399) por 4 h a 4° C. Las perlas fueron lavadas 4 veces con Buffer DISC y fueron eluidas con Buffer Laemmli 1X calentando a 96° C por 5 min. Por último, fueron centrifugadas a 14,000 rpm/min durante 10 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron separados por SDS-PAGE y analizadas por *western blot*.

7.3. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados fueron: Caspasa-8 (ab32125, abcam), cFLIP (ALX-804-428-C0150, Enzo) y FAS (sc-715, Santa Cruz Biotechnology); A20 (#4625), BID (#2002), Caspase-3 (#9662), Caspase-8 (#9746), cIAP1 (#4952), cIAP2 (#3130), CYLD (#4495), NIK (#4994), PARP (#9542), Survivin (#2808), TNFR1 (#3736), TRAF2 (#4724), TRAF3 (#4729), XIAP (#2042) fueron adquiridos de Cell Signaling Technology; FADD (556402) y RIP1 (610458) fueron comprados a BD Biosciences; Anti-Actina fue amablemente donado por el Dr. M Hernandez, Cinvestav-IPN. Se utilizaron anticuerpos secundarios comerciales anti-conejo (Thermo Fisher Scientific, USA), anti-ratón (Invitrogen, USA) o anti-cabra (Thermo Fisher Scientific, USA) acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP).

7.4. Ensayos de viabilidad celular

Se sembraron células CaSki y SiHa en cajas de cultivo de 60mm x 15mm. Cuando llegaron a una confluencia de 2×10^6 células fueron tratadas por separado y en combinación con 5 μM de Birinapant (Active Biochemical Co, Hong Kong, A1901), 200 μM de Cisplatino (Sigma Chemical Co, USA, P4394) y con 200 ng/ml de TNF α (amablemente proporcionado por el Dr. V. Ortiz, Cinvestav-IPN) por 8, 12 y 24 H. Como control positivo de muerte ambas líneas celulares fueron irradiadas con 40 mJ/cm² UV light.

Se recuperaron las células y fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min a 4°C. El botón celular fue resuspendido en PBS 1X ajustándose la densidad a 1×10^6 células/mL. Posteriormente se adicionó Ioduro de Propidio (1 mg/mL) (Sigma Chemical Co, USA) a una concentración final de 10 mg/mL, manteniendo las muestras en hielo por 30 min, protegidas de la luz. La viabilidad celular fue analizada en el citómetro de flujo Dako Cytomation CyAn ADP, Beckman

Coulter. Para cada análisis 20000 eventos fueron evaluados. Los datos fueron analizados con el software FlowJo V10.

VIII. RESULTADOS

8.1. Los niveles citoplasmáticos de los componentes reclutados al complejo TNFR1 son diferentes en CaSki y en SiHa, principalmente en los niveles de las proteínas IAP y DUB.

Se evaluaron por *western blot* algunos componentes que pueden ser reclutados al complejo asociado al TNFR1 en dos líneas celulares HPV-16+ (CaSki y SiHa) con resistencia diferencial a la muerte celular, para conocer si estos niveles de resistencia se debían a diferencias que pudieran impactar en la conformación de este complejo.

En primer lugar, se evaluaron los niveles de dos miembros de la familia de los receptores de muerte como son el TNFR1 y FAS (Figura 9) para descartar que la resistencia se debiera a una falta de expresión de estos. Se observó una buena expresión de ambos receptores en las dos líneas celulares, sin embargo, la línea celular SiHa, más sensible que CaSki a algunos de los diferentes estímulos de muerte, presenta mayores niveles del receptor de FAS, lo que correlacionaría con su sensibilidad. Por otro lado, CaSki presenta mayores niveles del TNFR1, este receptor además de señalar hacia apoptosis tiene la capacidad de encender vías de supervivencia, esta mayor expresión en CaSki pudiera correlacionar con su mayor resistencia.

Una vez que conocimos los niveles de los receptores, evaluamos algunas proteínas que son reclutadas a estos, después de que la célula recibe un estímulo de muerte. Fueron analizados elementos pro-apoptóticos como Caspasa-8 y FADD, y elementos anti-apoptóticos como cFLIP, RIP1, cIAP1,

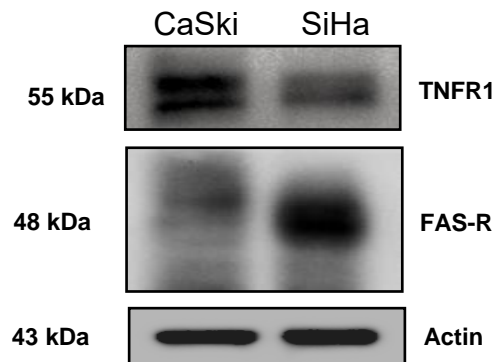


FIGURA 9. Niveles de expresión de los receptores de muerte. Imagen representativa de tres ensayos independientes de western blot en células CaSki y SiHa. Se utilizó actina como control de carga.

cIAP2, TRAF2 y TRAF3 (Figura 10). Las principales diferencias entre las dos líneas se observaron en los niveles de expresión de Caspasa-8, cIAP1, cIAP2, TRAF2 y TRAF3; las últimas 4 proteínas mencionadas forman un complejo con actividad de ubiquitin-ligasa, el cual funciona como regulador de los componentes del complejo asociado al TNFR1, ya sea porque los ubiquitilan en Lisina48 para promover su degradación proteosómica o en Lisina63 para la formación de nuevas plataformas de señalización; dichas diferencias pudieran estar impactando en la resistencia de ambas líneas celulares, ya que CaSki, donde observamos mayor expresión de estos componentes reguladores estaría favoreciendo la activación de vías de supervivencia como la de NF- κ B y con esto impidiendo la señalización apoptótica, caso contrario estaría ocurriendo en SiHa.

Debido a que la regulación del complejo TNFR1 en gran parte es debida a la actividad de ubiquitin ligasa de las proteínas en las que observamos mayor diferencia de expresión, decidimos estudiar proteínas con actividad de deubiquitilasas (DUB) y explorar si los niveles de estas podrían afectar la composición de las proteínas reclutadas al TNFR1, se evaluó A20 y CYLD las cuales rompen específicamente las cadenas de ubiquitinas ligadas K63, y su función es regular la vía clásica de NF- κ B, con lo cual se estaría impidiendo la

formación de la plataforma de activación, lo que pudiera impactar en los niveles de resistencia (Figura 11).

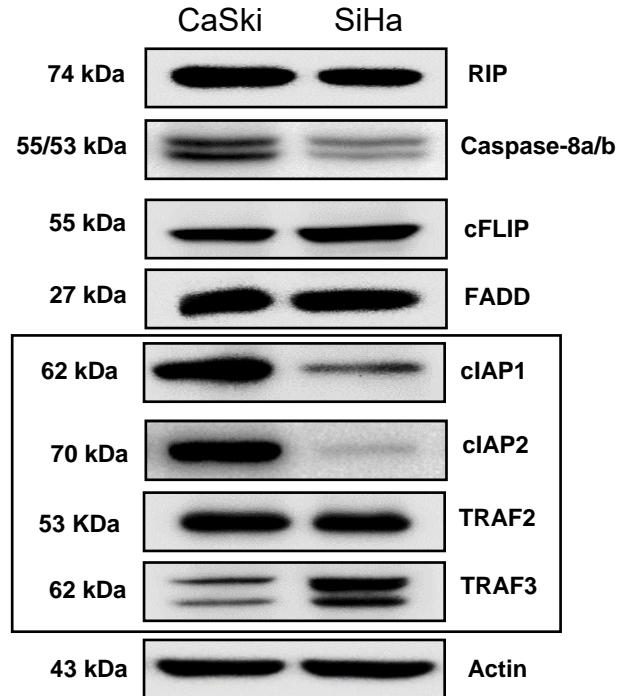


FIGURA 10. Niveles de expresión basal de algunos componentes que pudieran ser reclutados al complejo asociado al TNFR1. Imagen representativa de tres ensayos independientes de western blot para la detección de proteínas involucradas en la señalización apoptótica en células CaSki y SiHa. Se utilizo actina como control de carga. El rectángulo encierra las mayores diferencias observadas.

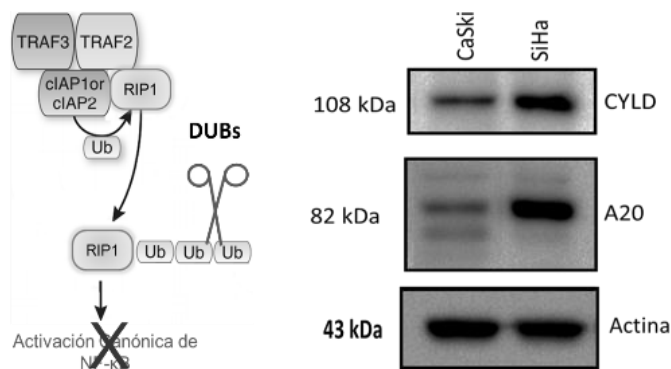


FIGURA 11. Las DUB se encuentran más expresadas en SiHa con respecto a CaSki. Izquierda, diagrama simplificado de la actividad de ubiquitin-ligasa de cIAP-TRAF ubiquitilando a RIP1 en K63, lo que favorece la activación canónica de NF-κB; las tijeras ejemplifican la actividad de las DUB impidiendo la ubiquitilación de RIP1 y bloqueando la activación de NF-κB. Derecha, Imagen representativa de tres ensayos independientes de western blot en células CaSki y SiHa. Se utilizo actina como control de carga.

8.2. Se reclutan exclusivamente componentes anti-apoptóticos al complejo asociado al TNFR1 estimulado con TNF α

La señalización mediada por los receptores de muerte se inicia cuando un ligando de muerte se une a su receptor, el cual por medio de su extremo citoplasmático recluta proteínas que desencadenan la señalización río abajo; una vez que conocimos los niveles basales de expresión de estas proteínas, decidimos evaluar si estos niveles diferenciales impactaban en la conformación de este complejo de señalización después de recibir un estímulo de TNF α . Para esto, tratamos ambas líneas celulares con 10-200 ng/mL de TNF α a diferentes tiempos y llevamos a cabo la inmunoprecipitación del TNFR1 endógeno, para evaluar que componentes del complejo I, co-inmunoprecipitaban junto con el receptor (Figura 12).

Nuestros resultados de co-inmunoprecipitación muestran que en ausencia del estímulo con TNF α ninguna proteína de las esperadas se encuentra asociada al TNFR1, como sucede en las células normales. Después de que las células recibieron el estímulo con TNF α , exclusivamente se observa un reclutamiento de componentes anti-apoptóticos: cIAP1, TRAF2, TRAF3 y RIP1, una posibilidad para explicar estos resultados es que estos componentes podrían estar asociados al complejo de señalización del TNFR1 evitando con ello reclutamiento de los componentes pro-apoptóticos, que corresponden al complejo II, como la Caspasa-8 y FADD.

Todos estos datos indican que al estar reclutados solo los elementos anti-apoptóticos el TNFR1 estaría señalizando hacia la activación de NF- κ B, explicando en parte la resistencia de nuestras líneas a estímulos de apoptosis extrínseca, y refuerzan las observaciones hechas por nuestro grupo en relación con la activación de NF- κ B.

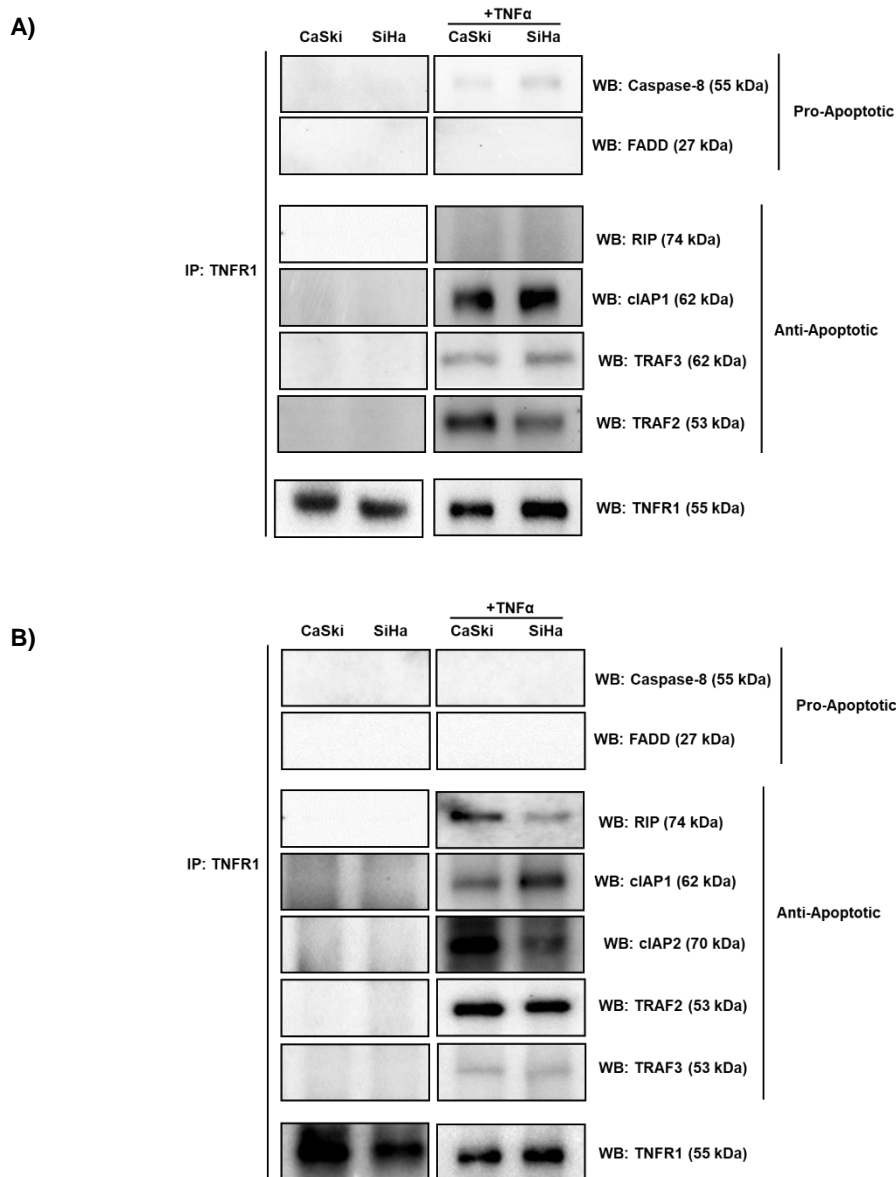


FIGURA 12. Reclutamiento exclusivo de proteínas anti-apoptóticas al TNFR1 estimulado con TNF α . Imagen representativa de tres ensayos de co-inmunoprecipitación independientes para evaluar el reclutamiento de componentes pro y anti-apoptóticos en células CaSki y SiHa, en ausencia y presencia de un estímulo de 10(A) y 200 (B) ng/mL de TNF α por 15 min. Se utilizó TNFR1 como control de la inmunoprecipitación. IP: Inmunoprecipitación. WB: *Western blot*.

Para corroborar estas interacciones proteína-proteína, decidimos realizar la Inmunoprecipitación de RIP endógeno (Figura 13), en las mismas condiciones que realizamos la de TNFR1; y así reforzar nuestras observaciones en las cuales después de un estímulo de muerte, solo se reclutan los elementos anti-

apoptóticos lo que impacta directamente en los niveles de resistencia a los tratamientos. Cabe señalar que RIP fue solo detectado en la inmunoprecipitación usando grandes cantidades de TNF α (200 ng/mL) como estímulo y no con 10ng/ml como el resto de los componentes. Además, se detectan cantidades menores de RIP reclutadas en el receptor TNFR1 de las células SiHa y correlaciona con un menor reclutamiento de TRAF2.

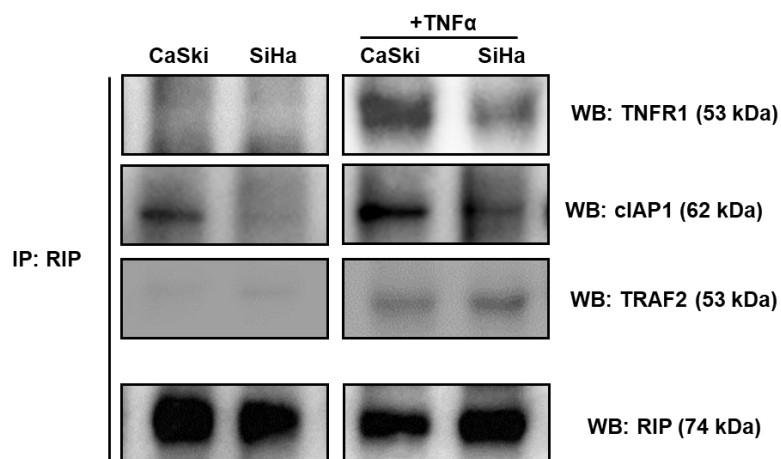


FIGURA 13. Reclutamiento del complejo cIAP/TRAF al TNFR1 estimulado con TNF α . Imagen representativa de tres ensayos de co-inmunoprecipitación independientes en células CaSki y SiHa para evaluar elementos que se encuentran asociados a RIP1 en ausencia y presencia de un estímulo de 200 ng/mL de TNF α por 10 min. Se utilizó RIP1 como control de la inmunoprecipitación. IP: Inmunoprecipitación. WB: *Western blot*.

8.3. La inhibición del proteosoma por MG132 impacta los niveles de expresión de las proteínas que pueden formar parte del complejo asociado al TNFR1.

Las ubiquitilaciones juegan un papel muy importante en la regulación de la composición del complejo asociado al TNFR1, además, de estas depende la señalización río debajo del receptor. De acuerdo con nuestros resultados en la inmunoprecipitación de TNFR1, sabemos que se reclutan cIAP1, TRAF2 y TRAF3, las cuales forman un complejo multi-proteico con actividad de ubiquitin ligasa, de tal forma que para conocer si este complejo se encuentra activo y

regulando a los demás elementos del complejo asociado al TNFR1, decidimos utilizar el inhibidor del proteosoma MG132 para evaluar el impacto en CaSki y SiHa (Figura 14).

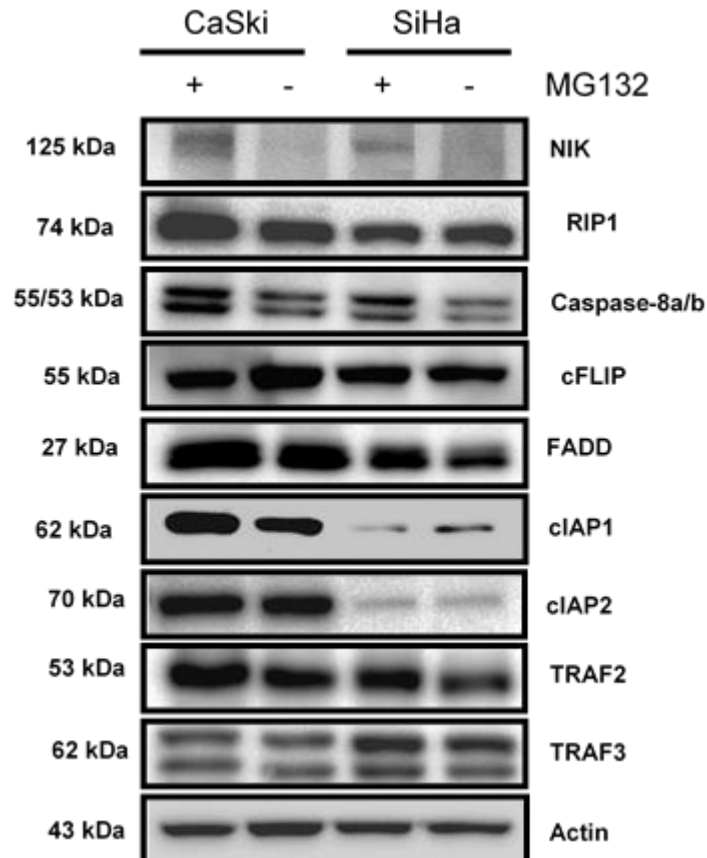


FIGURA 14. Efecto de la inhibición del proteosoma sobre los niveles de expresión de las proteínas que pudieran formar parte del complejo TNFR1. Imagen representativa de tres ensayos independientes de western blot en células CaSki y SiHa, en ausencia y presencia de 10 mM de MG132 por 6 horas. Como control de la inhibición del proteosoma se utilizó NIK; Actina fue empleada como control de carga.

Nuestros resultados muestran que la inhibición del proteosoma por el MG132 solo impacta claramente en los niveles de proteínas pro-apoptóticas como son las Caspasa-8 y FADD, y en los niveles de la cinasa NIK, que fue utilizada como control, demostrando que el complejo cIAP-TRAF pudiera estar ubiquitilando en K48 a Caspasa-8 y FADD promoviendo su degradación proteosomal y así impedir la señalización apoptótica, lo que debería analizarse

con mayor detalle en el futuro. En el resto de los componentes el efecto de MG132 no es significativo.

Para poder afirmar que cIAP-TRAF están regulando al complejo TNFR1 mediante ubiquitilaciones, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de NIK (Figura 15), su principal blanco para la ubiquitilación en K48, por lo cual siempre está siendo degradada por la vía proteosomal; adicionalmente llevamos a cabo la inmunoprecipitación de RIP1 (Figura 16), como control de la ubiquitilación en K63, como describimos anteriormente, esta ubiquitilación funciona como plataforma de activación de NF- κ B.

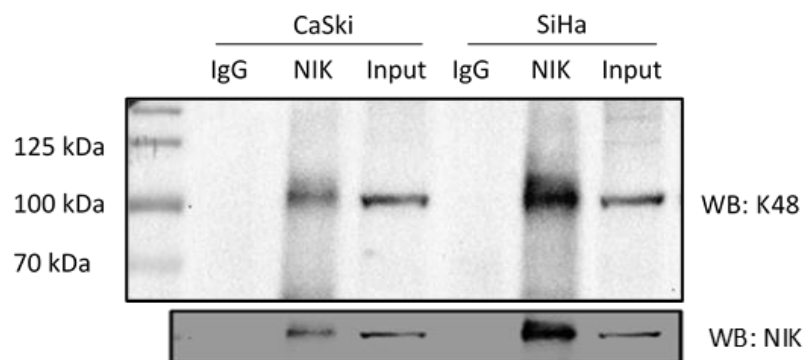


FIGURA 15. NIK se encuentra ubiquitilado en K48. Imagen representativa de tres ensayos independientes de co-inmunoprecipitación en células CaSki y SiHa. Como control de la inmunoprecipitación se utilizó NIK.

Nuestros datos permiten observar que el complejo cIAP/TRAF si es funcional y tiene un efecto sobre NIK, regulando sus niveles por la vía proteosomal; de tal forma que esperábamos observar claramente la ubiquitilación en K63 sobre RIP1, sin embargo, esto no fue posible en nuestro experimento; por lo que decidimos evaluarlo indirectamente realizando una extracción de proteínas totales en condiciones no desnaturizantes donde evaluamos RIP1 en presencia o ausencia de TNF α , donde pudimos observar claramente un barrido correspondiente a la ubiquitilación después del estímulo con TNF α (Figura 17).

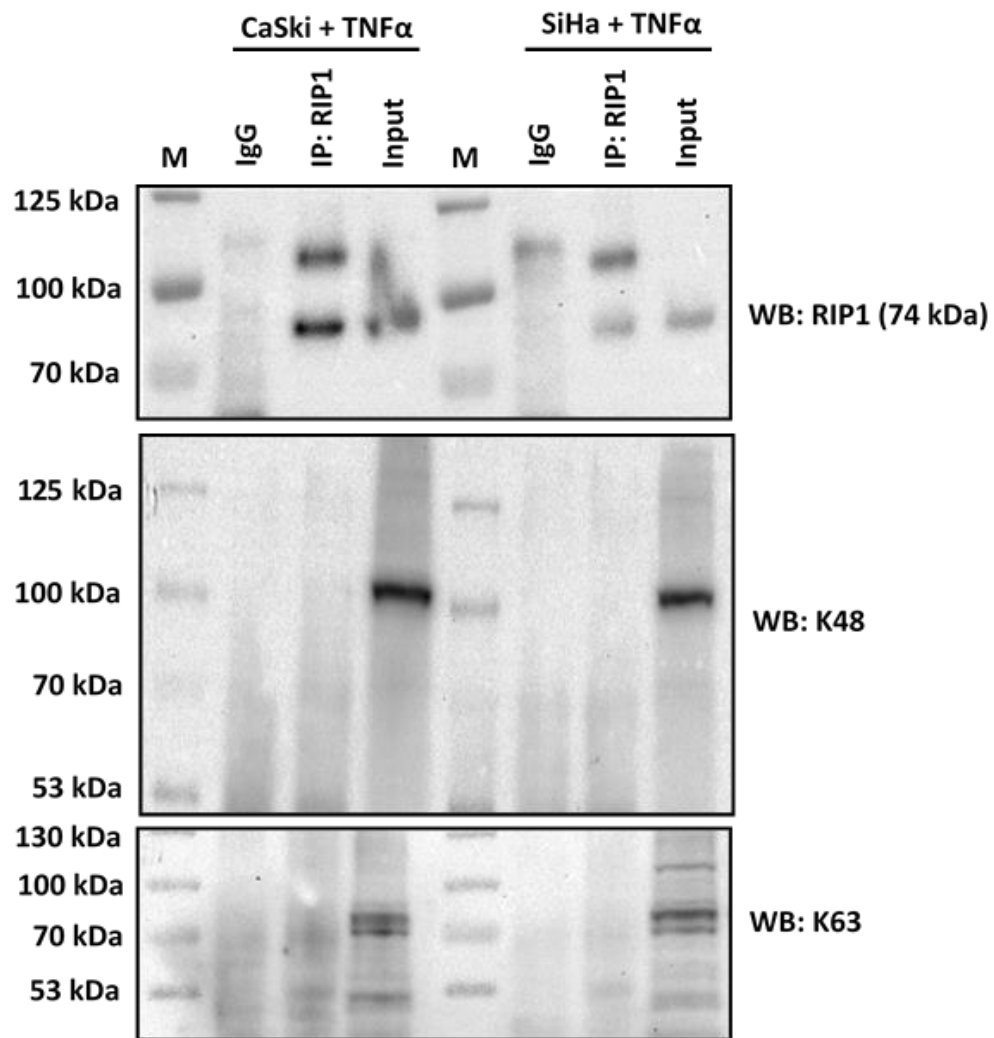


FIGURA 16. Inmunoprecipitación de RIP en CaSki y SiHa estimuladas con TNF α . Imagen representativa de tres ensayos independientes en células tratadas con 10 ng/mL. Como control de la inmunoprecipitación se utilizó RIP1.

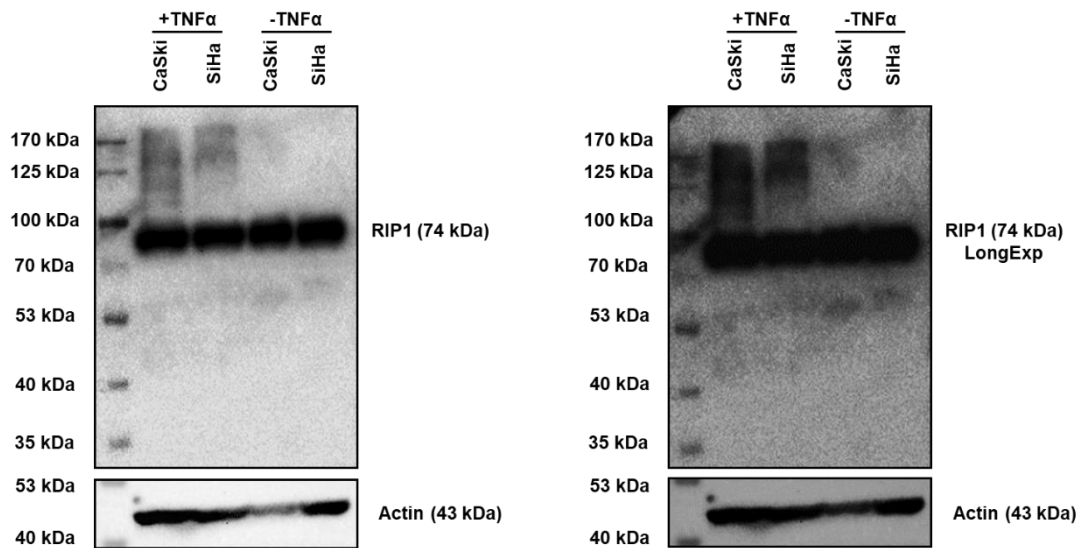


FIGURA 17. RIP es ubiquitilado después del estímulo con TNF α . Imagen representativa de tres ensayos independientes en células tratadas con 10 ng/mL Como control de la inmunoprecipitación se utilizó RIP1. El panel derecho solo muestra una sobreexposición de la imagen de la derecha para hacer más evidente la ubiquilación.

8.4. El Birinapant impacta fuertemente en el nivel de cIAP1 y provoca muerte celular en CaSki.

Nuestros resultados anteriores confirman que cIAP1 juega un papel trascendental en la regulación del complejo asociado al TNFR1, y posiblemente sea uno de los principales responsables en la resistencia diferencial a la apoptosis observada en CaSki y SiHa. Por esta razón decidimos evaluar el impacto de la disminución de esta proteína en la formación y conformación del complejo TNFR1, con este fin utilizamos un Mimético de SMAC: el Birinapant, el cual es un compuesto dimérico diseñado específicamente para la degradación de cIAP1, lo que resultaría en un cambio en la señalización del TNFR.

En primer lugar, basándonos en reportes previos, determinamos la concentración de birinapant a utilizar, por lo que realizamos una curva de concentración desde 1 a 5 μ M durante 8 horas, y se evaluaron los niveles de

clAP1 y clAP2 en ambas líneas celulares (Figura 18); siendo que se ha reportado que el birinapant es específico para inhibir clAP1, se evaluó el nivel de XIAP como control en células CaSki, debido a que es la línea celular en donde se observa una mayor expresión.

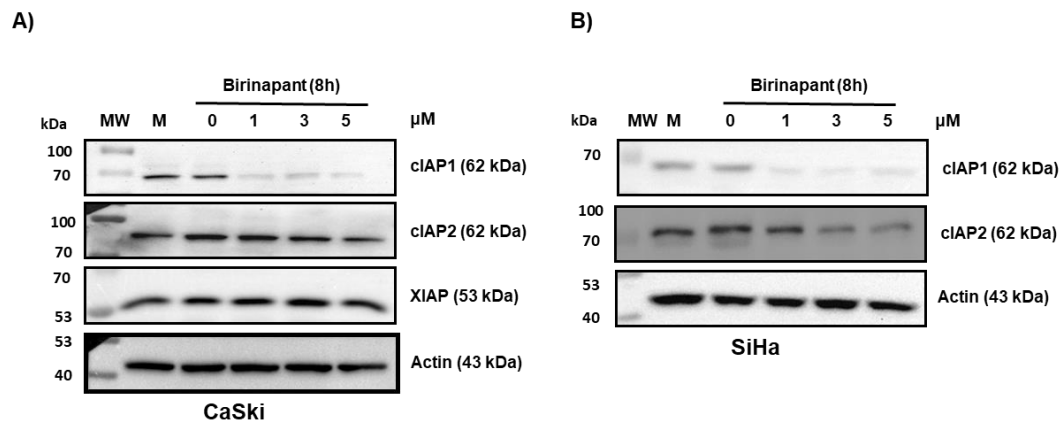


FIGURA 18. Efecto del Birinapant sobre los niveles de la familia IAP. Imagen representativa de tres ensayos independientes en células CaSki (A) y SiHa (B) tratadas con birinapant a los tiempos y concentraciones indicados. Como control de carga se utilizó actina. MW: Marcador de peso molecular. 0: DMSO. μM : Micromolar. kDa: Kilodaltons.

Lo que observamos fue que desde la concentración más baja ($1\mu\text{M}$) se disminuye considerablemente la expresión de clAP1 en ambas líneas celulares; como se esperaba este tratamiento no tuvo efecto sobre las otras IAPs (clAP2 y XIAP) en CaSki, sin embargo, a las concentraciones más altas ($5\mu\text{M}$) el birinapant parece afectar el nivel de proteína de clAP2 en SiHa.

Posteriormente, para corroborar el efecto del birinapant sobre clAP1, se evaluó el nivel de expresión de NIK, el principal sustrato de ubiquitilación en K48 de clAP1. Lo que observamos fue que desde la concentración más baja se restablecen los niveles de NIK en ambas líneas celulares. Lo que confirma la inhibición funcional de clAP1. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de otras proteínas, que como hemos visto pudieran verse afectadas

por la actividad de cIAP1, de las cuales ninguna sufrió diferencias significativas en sus niveles después del tratamiento con birinapant (Figura 19).

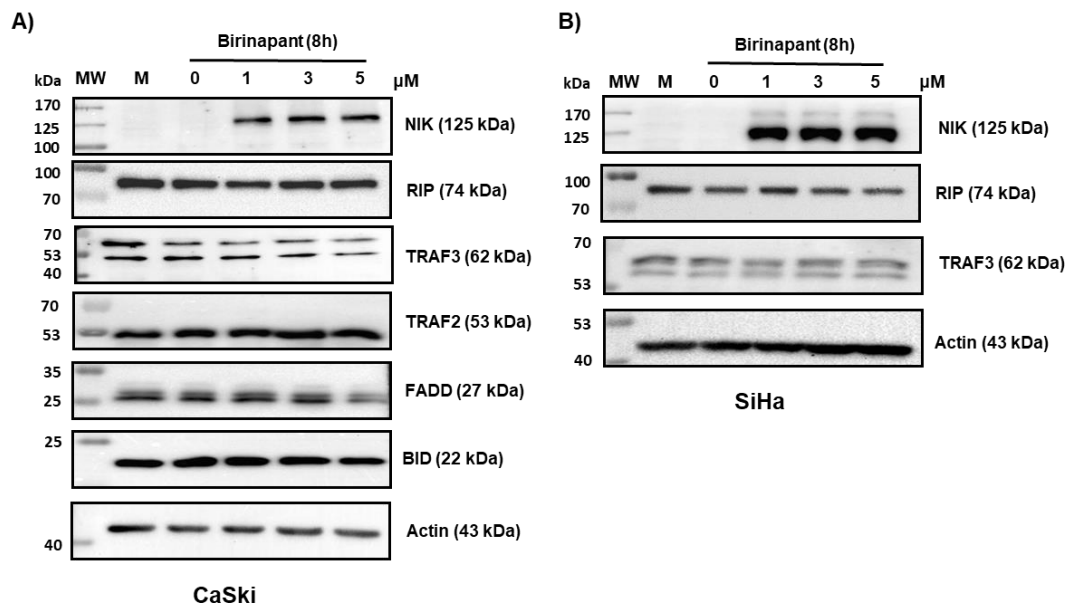


FIGURA 19. Restablecimiento de NIK y efecto del birinapant sobre otras proteínas que pueden conformar el complejo TNFR1. Imagen representativa de tres ensayos independientes en células CaSki (A) y SiHa (B) tratadas con birinapant a los tiempos y concentraciones indicados. Como control de carga se utilizó actina. MW: Marcador de peso molecular. 0: DMSO. μM: Micromolar. kDa: Kilodaltons.

8.4.1. El birinapant induce muerte celular en CaSki.

Después de observar los efectos de la inhibición de cIAP1 sobre sus sustratos, y teniendo en cuenta que la resistencia de nuestras líneas celulares podía deberse en gran medida a la actividad de cIAP1; decidimos evaluar si el birinapant sensibilizaba nuestras líneas celulares a los diferentes tratamientos utilizados en nuestro laboratorio. Por lo tanto, llevamos a cabo ensayos de viabilidad, evaluando la incorporación de yoduro de propidio (PI) por medio de citometría de flujo, donde las células CaSki y SiHa fueron tratadas con birinapant, solo y en combinación con 10-200 ng/mL de TNF α y con 200 μM Cisplatino, durante 8, 12 y 24 horas (Figura 20).

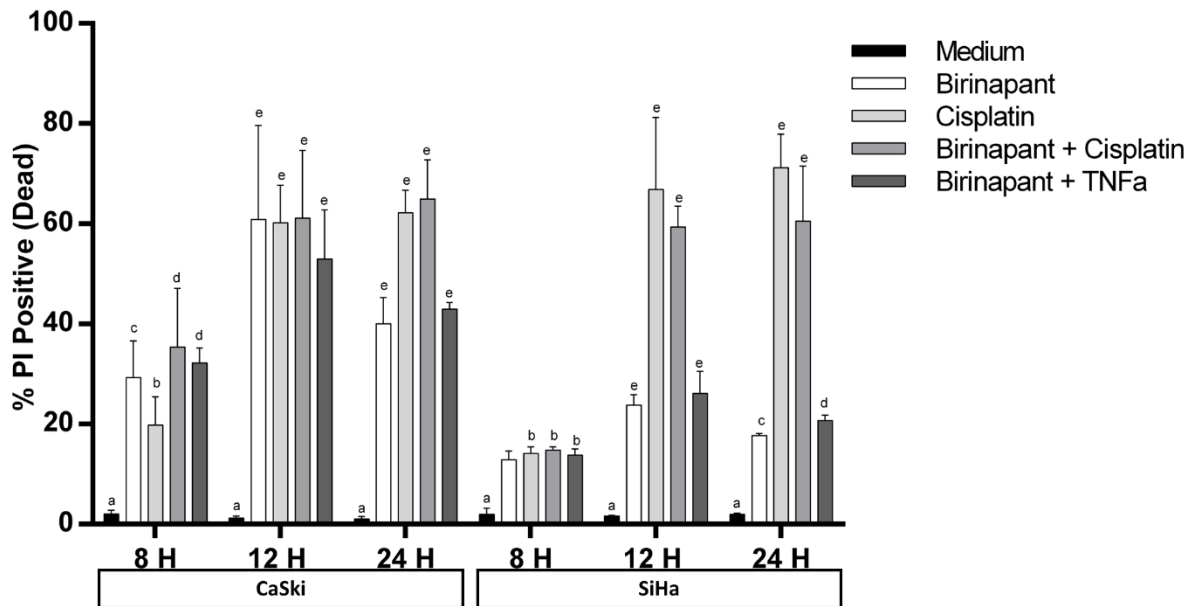


FIGURA 20. El birinapant induce muerte celular en CaSki. Las barras corresponden a los valores expresados como la media de 3 experimentos independientes en células CaSki y SiHa tratadas en las condiciones indicadas, por 8, 12 y 24 horas. Como control de muerte ambas líneas celulares fueron irradiadas con 40 mJ/cm² UV light. Prueba de ANOVA. Post-hoc Dunnett. Las letras indican diferencia significativa respecto al control de cada condición (a); p <0.0001 (b); p <0.001 (c); p <0.01 (d); p <0.05 (e).

El ensayo de viabilidad nos permitió observar que CaSki es altamente sensible al tratamiento con birinapant, caso contrario al de SiHa a la cual no se afecta su viabilidad. La combinación de birinapant con cisplatino parece tener un efecto significativo en CaSki. Estos resultados refuerzan nuestras observaciones en las cuales la resistencia de CaSki se ve mediada principalmente por clAP1 y una vez inhibida por el birinapant, su sensibilidad aumenta; caso contrario en SiHa donde los niveles de clAP1 no parecen incidir en la resistencia y por lo tanto el birinapant no muestra un efecto significativo sobre la viabilidad.

8.4.2. La caspasa-8 se procesa y activa completamente en CaSki después del tratamiento con birinapant.

Posteriormente, para explicar el efecto del birinapant sobre las células CaSki, se realizaron ensayos de *western blot*, sobre proteínas pro-apoptóticas como la caspasa-8, la cual por observaciones nuestras y de otros grupos, no era capaz de procesarse ni activarse en líneas celulares derivadas de cáncer cervical; sorprendentemente, el birinapant promueve la activación de la caspasa-8 en CaSki, además se observó procesamiento de caspasa-3 y corte de PARP (Figura 21), sugiriendo que el tipo de muerte provocado es dependiente de caspasas, pudiendo ser muerte celular apoptótica.

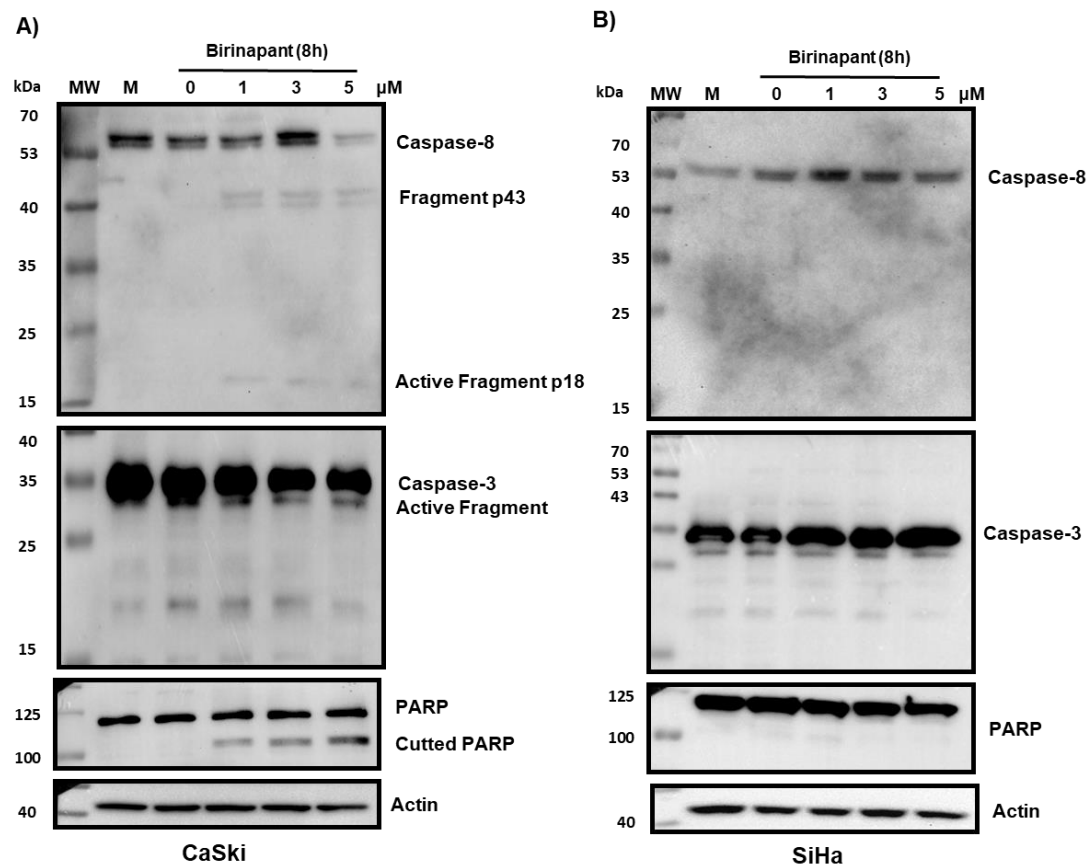


FIGURA 21. Activación de Caspasa-8 inducida por birinapant en células CaSki. Imagen representativa de tres ensayos independientes en células CaSki (A) y SiHa (B) tratadas con birinapant al tiempo y concentraciones indicados. Como control de carga se utilizó actina. MW: Marcador de peso molecular. 0: DMSO. μM: Micromolar. kDa: Kilodaltons.

8.4.3. Formación de una plataforma de activación de caspasa-8 en células CaSki.

Después de los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad y la detección de caspasa-8 activada, decidimos investigar el mecanismo por el cual esto ocurría. Por lo que llevamos a cabo la inmunoprecipitación de RIP1, para evaluar la posible formación del ripoptosoma, la cual se ha reportado que funciona como plataforma de activación de la caspasa-8, y efectivamente, logramos detectar que tanto FADD como Caspasa-8 co-inmunoprecipitaron con RIP1 en las células CaSki tratadas con birinapant (Figura 22); sugiriendo la formación de un complejo de activación de caspasa-8 que pudiera ser el ripoptosoma.

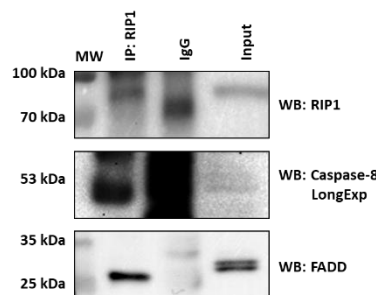


FIGURA 22. Formación de una plataforma de activación de Caspasa-8. Imagen representativa de tres ensayos independientes en células CaSki tratadas con 5 μ M de birinapant durante 8. MW: Marcador de peso molecular. IP: inmunoprecipitado. WB: western blot.

IX. DISCUSIÓN

Cada año en el mundo se registran más de 8 millones de muertes por cáncer y alrededor de 14 millones de nuevos casos, la gran mayoría en países en vías de desarrollo, como México. El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte entre las mujeres, teniendo un fuerte impacto en la economía, por lo que la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas es de gran interés. El 99%

de los casos de cáncer cervical están relacionados etiológicamente con el virus del papiloma humano de alto riesgo, principalmente HPV-16 y HPV-18.

La resistencia a la apoptosis es una característica clásica de las células cancerosas, lo que contribuye a la progresión del tumor y al fracaso del tratamiento; la resistencia a la apoptosis en las células transformadas ha sido ampliamente estudiada, aunque en el caso del cáncer cervicouterino hasta el momento es poco entendida. La resistencia a los tratamientos involucra la alteración a múltiples niveles del proceso apoptótico; la inhibición de la activación de la familia de las caspasas se ha implicado como un mecanismo importante para la tumorigénesis en muchos tipos de cáncer (Zörning, 2001). La activación deficiente de las caspasas se ha relacionado con el fracaso de muchas terapias anticáncer (Kaufmann & Vaux, 2003).

En años recientes, se han publicado algunos trabajos de apoptosis alterada en cáncer cervicouterino (Chung, 2002) (Cheung, 2002) (Zannotti, 2003). Hougardy demuestra que la vía de apoptosis mediada por Fas si es funcional en cáncer cervicouterino, pero diferencialmente. Ellos también sugieren que la sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas en carcinoma cervical depende de los niveles de FAS, Caspasa-8 y Bid (Hougardy, 2005). Fillipova atribuye al HPV la responsabilidad de las alteraciones en la apoptosis por un mecanismo independiente al efecto que E6 ejerce sobre p53 (Filippova, 2007). Aguilar-Lemarroy reporta una diferencia en la sensibilidad a la apoptosis inducida por CD95 en células SiHa y HeLa; sugiere que el complejo DISC no se ensambla en células SiHa, pero si en células HeLa, pero solo ocurre si las células HeLa son tratadas también con cicloheximida, activando caspasa-8 solo en células HeLa, pero no en SiHa (Aguilar-Lemarroy, 2001). La interpretación de este resultado es que la inhibición de la apoptosis en HeLa requiere de un factor que depende de la síntesis *de novo* continua en células HeLa. La falta de activación y procesamiento de la caspasa-8 puede explicar la resistencia a la

apoptosis de las células de carcinoma cervical, como ha sido observado en nuestro laboratorio (Aréchaga-Ocampo, 2007).

En reportes realizados en cáncer colorrectal y adenocarcinomas esofágicos, las células escapan de los estímulos apoptóticos por pérdida genómica o reorganización estructural del locus del gen *fas* o disminuyendo la cantidad de receptores de muerte en la superficie celular. Por esta razón decidimos evaluar los niveles de expresión de los receptores en nuestro trabajo, y mediante ensayos de *western blot* observamos que TNFR1 y FAS, son expresados diferencialmente; CaSki presenta altos niveles de TNFR1 y bajos niveles de FAS, lo que favorecería la resistencia; mientras que en SiHa se observa lo contrario, TNFR1 bajo y FAS alto. Estos datos sugieren un comportamiento diferencial a los inductores de apoptosis. Lo que ha sido observado por otros investigadores y nosotros. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio muestran una mayor sensibilidad de SiHa versus CaSki al ser inducidas a apoptosis con UV y cisplatino. Cabe señalar que nuestro abordaje al evaluar los niveles de receptores no fue el más adecuado, sin embargo, solo fue realizado para conocer el panorama general de los mismos, en futuras aproximaciones, la mejor forma de evaluar los niveles de receptores de muerte debe realizarse por FACS, para comprobar su correcta localización, como lo hicieron Hougardy y Aguilar-Lemarroy en sus estudios mencionados previamente.

Dado que los niveles de receptores aparentemente no son los responsables de la resistencia diferencial en las líneas celulares observada por nosotros y otros grupos, evaluamos la expresión de algunos reguladores de apoptosis, tales como, RIP1, Caspasa-8, cFLIP, FADD, cIAP1, cIAP2, TRAF2 y TRAF3. Aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión basal entre la mayoría de las proteínas evaluadas, las células CaSki expresaron altos niveles de cIAP1, cIAP2 y TRAF2, las primeras dos consideradas como

inhibidores de la apoptosis, e implicadas en el desarrollo de tumores malignos (Bertrand M. M., 2008), presumiblemente estas tres proteínas desempeñan un papel funcional en nuestro sistema celular experimental ya que se observaron niveles aumentados en CaSki, la cual es la línea celular con mayor resistencia a diferentes estímulos de muerte, los altos niveles de IAPs han sido observados por estudios previos en nuestro laboratorio y por otros grupos (Deveraux, 1998) (Bertrand M. M., 2008).

El reclutamiento de estas tres proteínas al complejo asociado al TNFR1 podría favorecer la activación canónica de NF- κ B promoviendo la ubiquitinación en K63 de RIP1; por esa razón decidimos evaluar los niveles de dos deubiquitilasas de K63, A20 y CYLD, que funcionan cortando los enlaces de ubiquitina en K63 de los componentes de señalización (como RIP1, TRAF2, TRAF6 e IKK γ) en la vía NF- κ B y, en consecuencia, inactivan esta señalización (Chen, 2005). Los resultados muestran una mayor expresión de CYLD y A20 en SiHa con respecto a CaSki; nuestros datos correlacionan con los obtenidos por An (An, 2008), donde observan niveles elevados de CYLD en SiHa, además, ellos realizaron ensayos donde noqueaban la expresión de CYLD y se favorecía la activación canónica de NF- κ B en condiciones hipóxicas.

La estimulación con el ligando conduce a la agrupación de los receptores de muerte y la posterior activación de caspasa-8 mediante el reclutamiento de FADD en las células normales. TNF α , además de utilizar FADD y caspasa-8 para activar la muerte celular, incluye otras moléculas adaptadoras adicionales asociadas a la parte citoplásmica del receptor ⁽⁶⁴⁾. Por datos obtenidos en nuestro laboratorio sabíamos que la caspasa-8 no se activa ni en CaSki ni en SiHa, esto condujo a la suposición de que el fenotipo resistente podría deberse a la incapacidad de las células para formar un complejo asociado al TNFR1 funcional. Como se observó en los ensayos de co-inmunoprecipitación ninguna de las dos líneas celulares reclutó FADD o procaspasa-8 a través de

los dominios DED, este resultado correlaciona con el obtenido por Aguilar-Lemarroly en donde utilizando células SiHa no observó reclutamiento de caspasa-8 ni de FADD, sugiriendo que esta falta de conformación del complejo asociado al receptor era el responsable de la resistencia. Moléculas como cFLIP, que bloquean la activación de caspasa-8 río arriba no fueron evaluadas ya que al faltar FADD en el complejo no puede reclutarse y por lo tanto no puede ser responsable de la resistencia. La incapacidad de ensamblar un complejo funcional para activar la caspasa-8 podría ser una de las formas en que las células HPV-16 eluden las señales o favorecen la activación de vías de supervivencia durante la progresión de múltiples etapas hacia el cáncer de cuello uterino, Filippova ha propuesto que los niveles de E6 impactan directamente en la conformación del complejo TNFR1, al interactuar con el receptor y con la pro-caspasa.8 (Filippova, 2007).

Interesantemente lo que si observamos en la co-inmunoprecipitación fue un reclutamiento de proteínas antiapoptóticas al receptor en ambas líneas, incluso con niveles que no correlacionan a los niveles que observamos en condiciones basales, donde CaSki presenta elevados niveles de cIAPs con respecto a SiHa, no tenemos una explicación clara para esto, pero suponemos que los espacios en el complejo TNFR1 se ocupan completamente o los elementos reclutados están modificados post-traduccionalmente, por ejemplo una ubiquitilación alterada. Aunque en el citoplasma exista mayor nivel de proteínas esta no puede reclutarse en mayor cantidad al complejo.

Por otra parte, trabajos recientes usando antagonistas sintéticos de las IAP han demostrado que cIAP1 y cIAP2 desempeñan un papel fundamental en la regulación de la señalización de TNFR1 hacia NF- κ B (Gaither, 2007) (Varfolomeev E. ., 2007) (Vince J. ., 2007). Sin embargo, la unión de cIAP1 a los receptores, o la regulación fisiológica de cIAP1 por la señalización del receptor de TNF, permanece poco caracterizada; en este sentido es necesario

seguir explorando este escenario para comprender mejor el proceso de reclutamiento y conformación del complejo TNFR1; recientemente se ha reportado el reclutamiento de proteínas relacionadas con el *splicing* al TNFR1; Zhang, reportó que la sobreexpresión de Ro52/SSA, otra ubiquitin ligasa, promovió apoptosis inducida por receptores de muerte de manera dependiente de caspasa-8 (Zhang, 2012). En otro reporte, Ramakrishnan observó que Sam68 es reclutado al TNFR1, donde actúa como un adaptador de señalización tanto en el complejo I asociado a la membrana como en el complejo II citoplasmático, por lo que regula tanto la apoptosis como la activación de NF- κ B (Baltimore, 2011). Con esto se demuestra que la conformación del complejo asociado al TNFR1 puede ser conformada por una variedad mayor de proteínas y por eso es necesario seguir explorando su dinámica de conformación.

Otra cosa que es importante destacar que hemos observado en nuestro grupo y que han observado otros grupos es la frecuente activación constitutiva de NF- κ B en muestras de cáncer cervical y de cabeza-cuello de pacientes. Un estudio destaca la conexión HPV-NF- κ B: donde se reporta que el grado de activación de NF- κ B se correlaciona con el estado del HPV en el cáncer de cabeza y cuello (Mishra, 2006). Esto reforzaría nuestra teoría de que la resistencia a la apoptosis extrínseca que hemos observado en CaSki es mediada por el reclutamiento al complejo TNFR1 de proteínas que favorecen la activación de NF- κ B.

Está bien establecido que la activación de NF- κ B depende del sistema celular de ubiquitinas (Ub) (Chen, 2005) (Karin, 2002). Para tratar de abordar este punto, evaluamos el efecto de la inhibición del proteosoma con MG132 sobre los marcadores apoptóticos evaluados previamente, la mayoría presentó un restablecimiento de sus niveles después del tratamiento, lo que indica que están siendo ubiquitilados en K48; sin embargo, no pudimos detectar estas

ubiquitilaciones en los complejos de señalización del TNFR1. No obstante, se necesitan más ensayos a futuro para determinar con precisión el tipo exacto de ubiquitilación y el tipo de ubiquitin ligasa que lo está llevando a cabo, asimismo, no aseveramos que el complejo TNFR1 solo sea regulado por ubiquitilaciones, ya que recientemente se reportó que la estimulación de otro miembro de los receptores de muerte: FN-14 (TNFRSF12A, TWEAKR, CD266) con TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) dirige al complejo cIAP1-TRAF2 hacia degradación lisosomal; esto abre un nuevo panorama hacia la búsqueda de más elementos del complejo TNFR1 que pudieran ser regulados por vía lisosomal (Vince J. D.-L., 2008).

Tratando de explicar el patrón de ubiquitilación de RIP1, el cual juega un papel determinante en la señalización apoptótica y antiapoptótica, realizamos inmunoprecipitación RIP1, la proteína blanco del complejo cIAP-TRAF. Desafortunadamente, no logramos detectar la ubiquitilación de RIP1 en K63 ni en K48, no descartamos que se haya debido a limitaciones técnicas. Tratando de resolver estos inconvenientes decidimos llevar a cabo la extracción de proteínas totales en condiciones no desnaturalizantes para evaluar RIP1 y compararlo con lo obtenido en el *western blot* con extractos solubles, interesantemente logramos observar un barrido correspondiente a la poliubiquitilación de RIP1 solo en los extractos tratados con TNF α ; reportes recientes mencionan que RIP1 puede ser blanco de ubiquitilación en otros residuos de lisina (M1, K6, K11, K27, K29, K33) (Komander, 2009) (Pickart, 2009) (Fushman, 2010). Por lo que se necesitan estudios futuros para determinar con certeza el patrón de ubiquitilación de RIP1 en cáncer cervical.

Uno de los factores responsables de las dificultades en la activación eficaz de la cascada apoptótica en cáncer es la sobreexpresión de las IAPs. Las IAP juegan un papel importante en la inhibición de la vía extrínseca de apoptosis y favorecen la activación de la señalización pro-supervivencia de NF- κ B (Gyrd-

Hansen & Meier, 2010) (Petersen S. W., 2007) (Wang L, 2008). La inhibición de las IAP puede restablecer el equilibrio entre las señales de supervivencia y muerte, facilitando así la apoptosis. Los antagonistas sintéticos de IAP (miméticos de SMAC) van dirigidos hacia cIAP1 y cIAP2 para su completa degradación proteosomal (Gaither, 2007) (Varfolomeev E. ., 2007) (Vince J. ., 2007). Los miméticos de SMAC han demostrado una buena actividad anticancerígena en estudios preclínicos. Por un lado, están los miméticos de SMAC monovalentes y los bivalentes/diméricos; en nuestro trabajo decidimos utilizar el TL32711/Birinipant, que pertenece a los bivalentes ya que estos estos compuestos diméricos muestran una afinidad significativamente mayor a las IAPs que los miméticos monovalentes y son más eficaces en el desencadenamiento de la apoptosis.

En el análisis por *western blot* demostramos que el birinapant a diferentes concentraciones es capaz de inducir la degradación completa de cIAP1 en ambas líneas celulares; curiosamente los niveles de cIAP2 se estabilizan, posiblemente debido a que se encuentra bajo la supresión prolongada de la actividad de E3 ligasa de cIAP1. Probablemente con mayores tiempos de tratamiento o mayores concentraciones el efecto del birinapant sobre cIAP2 fuera similar al de cIAP1. Conjuntamente, observamos en ambas líneas celulares el restablecimiento NIK, el resto de las proteínas evaluadas no sufrieron cambios significativos después del tratamiento. Interesantemente, solo en CaSki observamos procesamiento de Caspasa-8, Caspasa-3 y la escisión de PARP, lo que es un indicativo de muerte celular apoptótica.

En los ensayos de viabilidad surgieron dos patrones de respuesta al birinapant: CaSki notablemente sensible, y SiHa marcadamente resistente. Esto correlaciona con lo que observamos en los ensayos de *western blot*. Cabe señalar que los niveles de cIAP1/cIAP2 son muy bajos en células SiHa comparadas con CaSki. Mediante FACS logramos demostrar que el birinapant

sinergiza la muerte celular y probablemente sensibiliza una subpoblación de células CaSki al cisplatino. La capacidad de los miméticos de SMAC para potenciar la citotoxicidad de diferentes fármacos quimioterapéuticos como el irinotecán y la gemcitabina ha sido observada en distintos estudios (E., 2004) (Probst BL, 2010).

Aunque los resultados observados en este estudio son alentadores, habrá que explorar con más estudios para entender y caracterizar el mecanismo de muerte desencadenado por el birinapant en CaSki. Informes recientes han descrito la formación espontánea del ripoptosoma, compuesto por RIP1, caspasa-8 y FADD, generado por pérdida de cIAP1 y cIAP2 (Feoktistova, 2011) (Tenev, 2011), eso concuerda con nuestro ensayo de inmunoprecipitación realizado en células CaSki tratadas con birinapant. Por lo que hipotetizamos que la disminución de cIAP1, permite el restablecimiento de NIK, mismo que promueve la activación no canónica de NF- κ B, esto promueve la producción de TNF α que, en ausencia del complejo cIAP1-TRAF2, provoca apoptosis.

Como hemos descrito, se observó una eficacia antitumoral significativa del birinapant a bajas concentraciones (posiblemente no tóxicas), lo que destaca su seguridad y eficacia en modelos preclínicos. Además, nuestros resultados respaldan la investigación clínica con el birinapant tanto como agente único como en combinación con múltiples quimioterapias. Se requiere de mayor investigación para definir un biomarcador en los tumores que pudieran ser sensibles al birinapant, lo cual sería muy útil en la aplicación clínica.

X. CONCLUSIONES

- 1) El miembro de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis, cIAP1, promueve la supervivencia de las células CaSki y confiere resistencia a la quimioterapia.
- 2) El birinapant produce muerte celular por apoptosis como agente único en células CaSki, predominantemente por la disminución de cIAP1. Además, el birinapant promueve la formación de un complejo formado por RIP1, Caspasa-8 y FADD, lo que resulta en la activación de caspasas río abajo y corte de PARP. Conjuntamente, el tratamiento con birinapant proporcionó citotoxicidad sinérgica con el cisplatino.

XI. PERSPECTIVAS

- Evaluar más elementos que pudieran estar siendo reclutados al complejo asociado al TNFR1.
- Profundizar en el estudio del tipo de ubiquitilación del que es blanco RIP1, y buscar el patrón de ubiquitilación de otros elementos del complejo TNFR1.
- Caracterizar a profundidad el mecanismo de muerte celular observado en CaSki y entender el mecanismo de resistencia de las células SiHa.
- Definir un biomarcador en los tumores que pudieran ser sensibles al birinapant, para aumentar el porcentaje de éxito de los tratamientos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- (IARC), International Agency for Research on Cancer. (2007). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 90 Human Papillomaviruses. *IARC Press: Lyon, France, 90*.
- Aguilar-Lemarroy, A. K. (2001). Differential sensitivity of human papillomavirus type 16+ and type 18+ cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *Int J Cancer, 93*, 823-831.
- An, J. D. (2008). Inactivation of the CYLD Deubiquitinase by HPV E6 Mediates Hypoxia-Induced NF- κ B Activation. *Cancer Cell, 14*, 394–407.
- Androphy, E. H. (1987). Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J, 6*, 989–992.
- Aréchaga-Ocampo, E. P.-S.-H.-B.-S.-Á.-B.-S. (2007). HPV+ cervical carcinomas and cell lines display altered expression of caspases. *Gynecologic Oncology, 108*, 10-18).
- Baltimore, P. R. (2011). Sam68 Is Required for Both NF- κ B Activation and Apoptosis Signaling by the TNF Receptor. *Molecular Cell, 43*, 167–179.
- Barbosa, M., & Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene, 4*, 1529–1532.
- Bernard, H. B. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology, 401*, 70-79.
- Bertrand, M. M. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell, 30*, 689–700.
- Bertrand, M., & Vandenabeele, P. (2011). The Ripoptosome: death decision in the cytosol. *Mol Cell, 43*, 323-325.
- Biton, S. a. (2011). NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF-alpha feedforward signaling. *Cell, 145*, 92-103.
- Bouvard, V. B.-T. (2009). A review of human carcinogens—Part B: Biological agents. *Lancet Oncol., 10*, 321–322.
- Chai, J. e. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature, 406*, 855–862.
- Chaturvedi, A. A.-T. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J. Clin. Oncol., 31*, 4550–4559.
- Chen, Z. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. . *Nature cell biology, 7*, 758-765.

- Cheung, T. C. (2002). Apoptosis-related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*, *86*, 14-18.
- Chung, T. C. (2002). Expression of apoptotic regulators and their significances in cervical cancer. *Cancer Lett*, *180*, 63-68.
- De Villiers, E. F. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*, 17-27.
- Deveraux, Q. R. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, *17*, 2215-2223.
- Diessenbacher, P. H. (2008). NF-kappaB inhibition reveals differential mechanisms of TNF versus TRAIL-induced apoptosis upstream or at the level of caspase-8 activation independent of cIAP2. *J Invest Dermatol*, *128*, 1134-1147.
- Dikic, I. W. (2009). Ubiquitin-binding domains – from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*, 659–71.
- Doorbar, J. Q. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30*, F55–F70.
- E., D.-R. (2004). New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist*, *9*, 282–294.
- Ea, C. D. (2006). Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell*, *22*, 245-257.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*, 495-516.
- Feoktistova, M. G. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell*, :449–463, *43*.
- Filippova, M. J.-H. (2007). The large and small isoforms of human Papillomavirus Type 16 E6 Bind to and Differentially Affect Procaspase 8 Stability and Activity. *J Virol*, *81*(8), 4116-4129.
- Fukushima, T. M. (2007). Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor-associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, *104*, 6371-6376.
- Fulda, S. M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, *21*, 2283-2294.
- Fushman, D. a. (2010). Exploring the linkage dependence of polyubiquitin conformations using molecular modeling. *J. Mol. Biol.*, *395*, 803–814.

- Gaither, A. . (2007). A Smac mimetic rescue screen reveals roles for inhibitor of apoptosis proteins in tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cancer Res*, *67*, 11493 – 11498.
- Ganti, K. B. (2015). The human papillomavirus E6 PDZ binding motif: From life cycle to malignancy. *Viruses*, *7*, 3530–3551.
- Gyrd-Hansen M, D. M. (2008). IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol*, *10*, 1309–1317.
- Gyrd-Hansen, & Meier. (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*, *10*, 561–74.
- Gyrd-Hansen, M., & Meier, P. (2010). *Nat Rev Cancer*, *10*, 561–574.
- Haas, T. L. (2009). Recruitment of the Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex Stabilizes the TNF-R1 Signaling Complex and Is Required for TNF-Mediated Gene Induction. *Molecular Cell*, *36*, 831–844.
- Habelhah, H. T. (2004). Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J*, *23*, 322-332.
- Hanahan, D. a. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell*, *100*, 57-70.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, *407*, 770–776.
- Himeji, D. T. (2002). Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*, *99(11)*, 4070-4078.
- Hinz, S. T. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, *19*, 5477-5486.
- Hougardy, B. v. (2005). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: Relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecologic Oncology*, *97*, 353-64.
- Hu, S. &. (2003). Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *The Journal of biological chemistry* , *278*, 10055–10060.
- Indran, I. R. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1807*, 735-745.
- Karin, M. a. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.*, *3*, 221–227.
- Kaufmann, S., & Vaux, D. (2003). Alteratios in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 7414-7430.
- Komander, D. C. (2009). Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *10*, 550–563.

- LaCasse, E. C. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, *17*, 3247–3259.
- Laimins, C. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, *10*, 550–560.
- Li, X. F. (2001). Role of IKKgamma/nemo in assembly of the Ikappa B kinase complex. *276*, 4494-4500.
- Lu, J. B.-C. (2008). SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP. *Cancer Res*, *68*, 9384–9393.
- Mantovani, F., & Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, *20*, 7874–7887.
- Mathes, E. O. (2008). NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha. *EMBO J*, *27*, 1357-1367.
- Matsuda, T. A. (2005). Resistance to Apo2 ligand (Apo2L)/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis and constitutive expression of Apo2L/TRAIL in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines. *Journal of Virology*, *79*, 1367-1378.
- Mishra, A. B. (2006). Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int. J. Cancer*, *119*, 2840–2850.
- Mohammad, R. M. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S78–S103.
- Mollinedo, F. a. (2006). Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *9*, 51-73.
- Naude, P. d. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *The FEBS journal*, *278*, 888-898.
- Obexer, P. a. (2014). X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer. *Front. Oncol.*, *4*, 1-9.
- Ohtsuka, T. B. (2003). Synergistic induction of tumor cell apoptosis by death receptor antibody and chemotherapy agent through JNK/p38 and mitochondrial death pathway. *Oncogene*, *22*, 2034-2044.
- Papa, S. B. (2006). The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ*, *13*, 712-729.

- Parkin, D., & Bray, F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, *24*, 11–25.
- Petersen, S. W. (2007). Autocrine TNF-signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell*, *12*, 445–456.
- Petersen, S. W.-C. (2007). Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell*, *12*, 445–456.
- Pickart, C. a. (2009). Polyubiquitin chains: Polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, *8*, 610–616.
- Probst BL, L. L. (2010). Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNFa-dependent manner. *Cell Death Differ*, *17*, 1645–1654.
- Rangamani, P. a. (2007). Survival and apoptotic pathways initiated by TNF-alpha: modeling and predictions. *Biotechnology and bioengineering*, *97*, 1216-1229.
- Rothe, M. M.-G. (1995). The TNFR2-TRAF Signaling Complex Contains Two Novel Proteins Related to Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Cell*, *83*, 1243-1252.
- Schile, A. G.-F. (2008). Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes & development*, *22*, 2256-2266.
- Scott, F. F. (2008). Caspase-8 cleaves histone deacetylase 7 and abolishes its transcription repressor function. *J Biol Chem*, *283*, 19499-19510.
- Shi, C. a. (2003). umor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem*, *278*, 15429-15434.
- Siu, W. P. (2008). ax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), distinct from the mitochondrial permeability transition, is a key mechanism in diclofenac-induced hepatocyte injury: Multiple protective roles of cyclosporin A. . *Toxicol Appl Pharmacol*, *227*, 451-461.
- Smotkin, D., & Wettstein, F. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *83*, 4680–4684.
- Srinivasula, S. M. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac / DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, *411*, 0-5.
- Strati, K., & Lambert, P. (2007). Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer Res*, *67*, 11585–11593.
- Tait, S. a. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *11*, 621-632.

- Tenev, T. B. (2011). The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell*, *43*, 432–448.
- Thomas, M. N. (2008). Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*, *27*, 7018–7030.
- Tran, T. T. (2009). TNF α induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. *Apoptosis*, *14*, 320–332.
- Varfolomeev, E. . (2007). *Cell*, *131*, 131 : 669 – 681 .
- Varfolomeev, E. B. (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF κ B activation, and TNF α -dependent apoptosis. *Cell*, *131*, 669–681.
- Vermeulen, K. V. (2011). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, *36*, 131–149.
- Vince JE, W. W. (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF α -dependent apoptosis. *Cell*, *131*, 682–693.
- Vince, J. . (2007). IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF -dependent apoptosis. *Cell*, *131*, 682 – 693.
- Vince, J. D.-L. (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1–TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF α . *J. Cell Biol.*, *182*, 171–184.
- Wajant, H. a. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF κ B pathway. *The FEBS journal*, *278*, 862–876.
- Wallach, D. K. (2008). The extrinsic cell death pathway and the elan mortel. *Cell Death Differ*, *15*, 1533–1541.
- Wang L, D. F. (2008). TNF α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, *133*, 693–703.
- Wang, L. D. (2008). TNF α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, *133*, 693–703.
- Wicovsky, A. H. (2009). Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1–TNFR2 cooperation. *Oncogene*, *28*, 1769–1781.
- WU, C. C. (2005). TNF α induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO*, *24*, 1886–1898.
- Wu, G. e. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature*, *408*, 1008–1012.

Zannotti, S. F.-E. (2003). Changes in the topological expression of markers of differentiation and apoptosis defined stages of human cervical dysplasia and carcinoma. *Gynecol Oncol*, 89, 376-384.

Zhang, J. L.-C. (2012). Ro52/SSA sensitizes cells to death receptor-induced apoptosis by down-regulating c-FLIP(L). *Cell Biol. Int.*, 36, 463–468.

Zörning, M. H. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta*, 1551, F1-F37.

Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 342–350.