



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

Altas dosis de IL-2 inhiben la proliferación inducida por la activación de la vía CD95 en células HeLa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL GUADALUPE SALAZAR VALENCIA

Directora de Tesis: Dra. Isabel Soto Cruz

Asesora Interna: Dra. Adriana Gutiérrez Hoya

Ciudad de México, mayo 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Apoyo institucional

El trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Oncología Molecular (Laboratorio 9 Planta Baja) perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la UNAM a través del programa PAPIIT (IN222218) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto 253262) al cual agradezco por la Beca-Tesis otorgada.

DEDICATORIA

A mis padres Miguel Ángel Salazar Catillo y Mireya Guadalupe Valencia Nava que han dedicado sus mejores años de vida a cada uno de sus hijos, que me han enseñado a amar, a luchar, a siempre seguir adelante pese a cualquier adversidad, a ustedes que me brindan su apoyo incondicional y siempre representaron mi fortaleza, porque en cada momento tuvieron una palabra de ánimo, y mil votos de confianza ¡Gracias!

A mi hermano Miguel Ángel, mi más cercano compañero de vida, por su apoyo incondicional, porque juntos vivimos mil momentos alegrías, tristezas, enojos que nos ayudaron a crecer y saber valorar la importancia de siempre estar ahí, el uno para el otro, solo te digo, no abandones nunca tus sueños, sigue luchando como hasta ahora eres una persona admirable.

A mis más pequeños hermanos Yael Jayden y Jaziel Daniel, gracias por regalarme un poco de su infinita energía de niño, son un pilar fundamental en mi vida. Pronto llegará su momento para realizarse plenamente, no les digo que será fácil, les digo que valdrá la pena.

A mis abuelos, Miguel Valencia Martínez y María Guadalupe Valencia Nava, porque durante todos estos años han estado siempre a mi lado, dando palabras de ánimo y sobre todo compartiéndome su sabiduría, aquella que sólo se encuentra en las memorias de una vida ya recorrida, siempre tomé en cuenta sus palabras, y todo el cariño que supieron sembrar en mi mente y corazón, ahora solo les toca cosechar y este es un fruto que les quiero regalar.

A Diego Francisco Morelos Laguna, por convertirte en esa persona incondicional, por tomar mi mano y ayudarme a descubrir un mundo lleno de amor. Llegaste en el momento indicado, y de la forma más hermosa, no busco una explicación, solo agradezco a la vida por haberte puesto en mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis Dra. Isabel Soto Cruz por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por proporcionarme los recursos necesarios para mi desarrollo académico y principalmente por su confianza, paciencia y enseñanza.

A mi asesora Interna Dra. Adriana Gutiérrez Hoya por haberme acogido durante los últimos años de mi desarrollo universitario en esta facultad, gracias por transmitir sus conocimientos, por su paciencia, tiempo y dedicación, pero sobre todo gracias por su amistad, le garantizo que sabré aprovechar todo lo que me apporto.

A cada uno de los miembros que conforman el grupo de investigación del laboratorio 9, Arturo Valle Mendiola, María del Carmen Lagunas Cruz, Octavio Zerecero Carreón por compartir su conocimiento y profesionalismo e impulsarme a seguir adelante en este profundo mundo de la ciencia.

A los miembros del jurado: Dr. Benny Weiss Steider, Dra. Rosalva Rangel Corona y Dr. Luis Sánchez Sánchez por el tiempo que me han dedicado y por sus valiosos consejos que permitieron mejorar este trabajo.

A Diego Francisco Morelos Laguna, por su apoyo incondicional, porque sin su ayuda no hubiera logrado terminar con gran satisfacción este objetivo en mi vida.

Enfatizo el agradecimiento a mis padres, ya que ellos representan mi motivación constante, gracias por haberme impulsado y apoyado en cada momento, mis logros son el más nítido reflejo de su amor y educación.

A mi hermano, Miguel Ángel Salazar Valencia porque a través de su amor al diseño, transformo mil veces mis pergaminos en blanco y negro, en un mundo a color.

A José Luis Sánchez Carmona, por compartir sus conocimientos y pasión en el área informática, gracias por ayudarme a complementar mi trabajo de una forma excepcional.

“La ignorancia engendra más confianza de la que con frecuencia engendra el conocimiento: son aquellos que saben poco, y no aquellos que saben mucho, los que afirman positivamente que tal o cual problema jamás podrá ser resuelto por las ciencias.”

Charles Darwin

Abreviaturas

AKT: Proteína cinasa específica de serina-treonina cinasa

BcL-2: Células de linfoma B2

BiD y Bidt: Proteína Pro-Apoptótica de la subfamilia BH3 completo y escindido

CaCu: Cáncer cervicouterino

CD4+: Marcador de inmunofenotipo para linfocitos T colaboradores

CD8+: Marcador de inmunofenotipo para linfocitos citolíticos o citotóxicos

DD: Dominio de muerte

DED: Dominio efector de muerte

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas

Fas L, CD95L: Ligando de Fas

Fas, CD95, APO-1: Proteína transmembranal tipo I con dominio citoplasmático de muerte celular

IL-2: Interleucina 2

IL-2R: Receptor para interleucina 2

MAPK/ERK: Proteína activada por mitógenos

NFκB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical

NK: Célula asesina natural

p53: Proteína anti oncogénica supresora de tumores

PI3K: Fosfatidilinositol-3 cinasa

pRB: Proteína del retinoblastoma

PS: Fosfatidilserina

SH2: Dominio homólogo a Scr (Familia de proto-oncogén tirosina cinasa)

TEM: Transición epitelio mesénquima

TNF: Factor de necrosis tumoral

VHS: Virus del herpes simplex

VPH: Virus del papiloma humano

Índice

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| MARCO TEÓRICO | 8 |
| 1. Tumores malignos (Cáncer) | 8 |
| 2. Cáncer cervicouterino (CaCu) | 10 |
| 2.1 Virus del Papiloma Humano (VPH) | 11 |
| 2.2 Infección por VPH..... | 12 |
| 2.3 Transformación de células cervicales. | 13 |
| 3. Inducción de apoptosis | 14 |
| 3.1 Receptor Fas (CD95)..... | 15 |
| 3.2 Ligando de Fas (CD95L) | 17 |
| 3.3 Activación de la vía Fas (Vía Canónica) | 18 |
| 4. Mecanismos de evasión de muerte por Apoptosis | 20 |
| 4.1 Vía no canónica de Fas (CD95) | 20 |
| 4.2 Inhibición de la vía FAS (CD95) por E6 | 21 |
| 4.3 Tumores y Fas-L (CD95L)..... | 22 |
| 4.4 Inducción de autofagia en células tumorales | 22 |
| 5. Estrategias en la eliminación de células tumorales: inmunoterapia..... | 23 |
| 5.1 Interleucina 2 (IL-2) | 23 |
| 5.2 Interleucina 2 en cáncer..... | 24 |
| 5.3 IL-2 en CaCu..... | 24 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 25 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 25 |
| HIPÓTESIS | 26 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 26 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 26 |
| MATERIAL Y METODOS | 27 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSIÓN | 44 |
| CONCLUSIONES | 51 |
| PERSPECTIVAS | 51 |
| REFERENCIAS..... | 52 |

RESUMEN

En México el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Se estima una ocurrencia anual de 13,960 casos con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. Aunado a esto, el panorama empeora en pacientes diagnosticadas en etapas avanzadas con una tasa de supervivencia de 16.5% a 5 años para cáncer cervicouterino metastásico, en comparación con el 91.5% para cáncer cervicouterino diagnosticado en etapas tempranas. El cáncer cervicouterino está asociado con la infección del virus del papiloma humano (VPH), el cual afecta mecanismos bioquímicos, moleculares y de señalización, involucrados en el desarrollo de esta neoplasia. Además, las células tumorales han adquirido diversas estrategias para inducir supervivencia, proliferación, metástasis y evadir mecanismos de muerte, en este contexto, estudios recientes reportan que las células tumorales utilizan diversos receptores como CD95 o el receptor de IL-2(IL-2R), para activar múltiples cascadas de señalización como MAP cinasas, NF κ B, Src cinasas, PI3K y JAK/STAT. Diversos estudios han demostrado la expresión del IL-2R en células de cáncer cervicouterino, así como una respuesta diferencial frente al estímulo con esta citocina, mostrando que, bajas dosis de IL-2 inducen proliferación tumoral, sin embargo, altas dosis la disminuyen, que puede ser atribuido a un mecanismo de arresto en el ciclo celular, entre otros. Otro hallazgo del grupo de trabajo fue la presencia de la molécula CD95 en líneas celulares tumorales VPH⁺, sin embargo, se conoce que dichas células son altamente resistentes a los mecanismos de inducción de muerte celular. Por lo anterior, nuestro principal objetivo fue evaluar si las células de cáncer cervicouterino eran susceptibles a la activación de la vía CD95 y si altas dosis de IL-2 podían aumentarla favoreciendo la inducción de muerte celular.

Con este propósito, se analizaron líneas celulares de cáncer cervicouterino, HeLa (VPH18⁺), INBL (VPH18⁺), HER3⁺ (VPH18⁺), Caski (VPH16⁺), SiHa (VPH 16⁺) y C33A (VPH⁻), tratadas con 100UI de IL-2 durante 48 horas, para evaluar la proliferación celular, observándose disminución significativa en la proliferación de todas las líneas independientemente de la presencia o ausencia del VPH. Posteriormente, se determinó la expresión extracelular e intracelular de CD95 por citometría de flujo en todas las líneas celulares, nuestros resultados mostraron que las células cáncer cervicouterino HPV positivas expresan niveles altos de CD95 extracelular (80-90%), mientras que la línea celular C33A HPV negativa expresa niveles muy bajos de CD95 extracelular (16%), pero altos niveles de CD95 intracelular (73%). El siguiente objetivo fue activar la vía CD95 con diferentes concentraciones del anticuerpo agonista (DX2), lo cual fue evaluado únicamente en células HeLa (VPH18⁺). Observamos que bajas concentraciones del anti-CD95 [0.1-0.2 μ g/ml] inducen proliferación celular, concentraciones medias [1-2 μ g/ml] autofagia y altas concentraciones [2.5- 5 μ g/ml] inducen muerte. Finalmente, se realizó un tratamiento conjunto de CD95 [0.1 μ g/ml] e IL-2 [100UI] en células HeLa de forma simultánea a 48, además de forma escalonada tratando a las células 48H con 100UI de IL-2 y posteriormente 48H más con 100UI de IL-2 más anti-CD95 [0.1 μ g/ml]. Los resultados mostraron disminución de la proliferación inducida por CD95 en los dos esquemas. En conclusión, las líneas celulares VPH⁺ expresan CD95 de forma extracelular e intracelular, las células VPH⁻ (C33A), sólo expresan CD95 intracelular. La activación de la vía CD95 en células HeLa es capaz de inducir proliferación, autofagia y muerte. Altas dosis de IL-2 (100UI) disminuyen la proliferación inducida por la activación de la vía CD95 en células HeLa.

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado el cáncer ha sido reconocido como una enfermedad crónica degenerativa que en la mayoría de los casos conduce a la muerte. La palabra Cáncer se remonta a siglos antiguos, y su definición se adjudica a Hipócrates (460-370 a. C), quien utilizó el término para hacer referencia al aspecto clínico que observó en lo que ahora conocemos como masa tumoral encontrando proyecciones o extensiones hacia tejidos vecinos, dicha morfología la relacionó con un cangrejo denominándola *Karkinos* (Carcinos, habitualmente denominado por su nombre en latín, cáncer, o simplemente como el Cangrejo) (Garza Salazar J.G, 2014).

Hoy en día y después de un sinnúmero de avances en el ámbito médico y científico, el cáncer se posiciona como una de las enfermedades más estudiadas alrededor del mundo, debido a que en pleno siglo XXI sigue causando millones de muertes, además la incidencia y prevalencia continúan siendo muy altas, por lo que queda mucho que esclarecer alrededor de esta enfermedad.

1. Tumores malignos (Cáncer)

Cáncer: es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas» (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

El cáncer, es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, se clasifica en función del tejido y de la célula de origen (Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

Hanahan y Weinberg en su revisión del 2012, recopilaron información durante la última década sobre los posibles fundamentos mecanicistas en el desarrollo del cáncer, proponiendo ocho funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de varios tipos de tumores malignos humanos a los que denominan sellos del cáncer, estos incluyen: 1) Mantenimiento de la señalización autónoma proliferativa, 2) Evasión de los supresores de proliferación, 3) Escape a la muerte celular programada (apoptosis), 4) Potencial replicativo ilimitado (atribuida a la presencia de telomerasa), 5) Inducción de angiogénesis, 6) Capacidad de invasión y metástasis, 7) Reprogramación del metabolismo energético y 8) Evasión del sistema inmune.

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), refieren al cáncer como la primera causa de muerte en el mundo, en 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes y para el 2015 se reportaron 8.8 millones de defunciones, lo que significa que aproximadamente una de cada 6 defunciones en el mundo se deben a esta enfermedad, a pesar del intenso trabajo por parte de miles de investigadores alrededor del mundo en la última década, los horizontes no resultan promisorios ya que se prevé que los casos anuales de cáncer aumenten de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.

Es importante mencionar que los tipos de cáncer con mayor frecuencia en hombres y mujeres son diferentes; según el censo del *Institute for Health Metrics and Evaluation of the University of Washington* de 2016 se reporta al cáncer de próstata con mayor prevalencia en hombres y al cáncer de mama con mayor prevalencia en mujeres, también reporta de forma global 8,927,401.41 muertes a nivel mundial a causa de algún tipo de neoplasia en donde los primeros

lugares los ocupa: cáncer de pulmón, estómago, colon, hígado, mama, próstata páncreas, cérvix y ovario.

A diferencia del contexto mundial que ubica al cáncer cervicouterino como la quinta causa de muerte en mujeres, en México el panorama para esta neoplasia es más drástica ya que el cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte en la mujer ya rebasado por cáncer de mama, las cuales son las dos neoplasias con mayor incidencia en el país (*Institute for Health Metrix and Evaluation of the University, 2016*). Por esta razón, su estudio es de gran importancia para nuestra población (*Figura 1*).

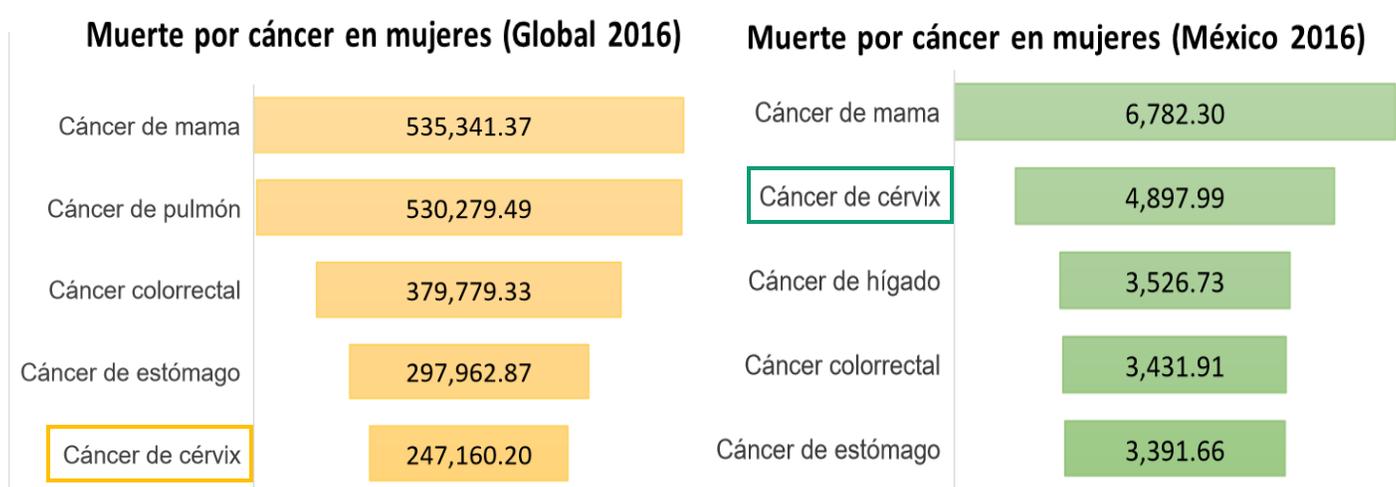


Figura 1. En las gráficas se muestran los tipos de cánceres que ocupan los primeros lugares por muerte a nivel mundial y en México en 2016 según estadísticos del *Institute for Health Metrix and Evaluation, University of Washington*.

2. Cáncer cervicouterino (CaCu)

El cáncer cervicouterino es un carcinoma epitelial que se origina en las células que revisten el cuello uterino, los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (exocérvix) y las células glandulares (endocérvix) (Figura 2). Motivo por el cual, la transformación se puede llevar a cabo en el epitelio escamoso (carcinoma escamoso) o en el epitelio glandular (adenocarcinoma). El tipo histológico comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) (Lizano *et al*, 2009).

A nivel mundial el cáncer cervicouterino representa un severo problema de salud pública ya que ocupa los primeros lugares en mortalidad y prevalencia. Resulta alarmante que en México esta neoplasia se posicione en segundo lugar en mortalidad femenina desde la última década, a pesar de los esfuerzos por controlar y erradicar esta enfermedad, el número de muertes va en aumento (Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

Existen diversos factores que están asociados al desarrollo de CaCu, por ejemplo: inicio temprano de actividad sexual, múltiples parejas sexuales, presencia de infecciones de transmisión sexual, multiparidad, además de las ya conocidas como mala alimentación, falta de actividad física, exposición a radiaciones, tabaquismo, y uso prolongado de ciertos fármacos. Sin embargo, desde hace más de dos décadas se ha correlacionado la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo como agentes causales del cáncer cervicouterino, esta idea concedió el Premio Nobel en 2009 al profesor Herald zur Hausen (García J. P, 2007).

Actualmente se tiene reportado que la infección persistente por tipos oncogénicos de VPH, son el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cérvico uterino, en esencia la mayoría (<70 %) de los casos de cáncer cervicouterino contienen DNA de algún tipo de VPH de alto riesgo (Lizano *et al*, 2009; Secretaria de Salud 2013).

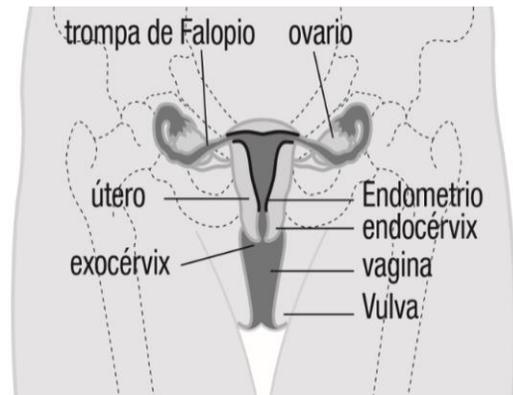


Figura 2. Esquemática del aparato reproductor femenino, enfatizando endocérvix y exocérvix. (Tomado de Control Integral del cáncer cervicouterino, Guía de prácticas esenciales (OMS, 2016).

2.1 Virus del Papiloma Humano (VPH)

El virus del papiloma humano (VPH), es un virus de DNA de doble cadena circular con un tamaño de 7.500 a 8,000 pb, pertenece a la familia de los Papovaviridae incluido en el género Papillomavirus. Las partículas del VPH son icosaédricas, miden entre 52 y 55 nm de diámetro. La cápside está constituida por 72 capsómeros pentaméricos en un arreglo con número de triangulación de 7 (Figura 3) (Santos L.G, 2015).

La infección por algunos serotipos de papilomavirus está estrechamente relacionada con el desarrollo de verrugas genitales, verrugas en boca y garganta, cánceres orofaríngeos, lesiones epiteliales, cáncer *in situ*, cáncer invasor (Concha R.M, 2007). La actividad transformante se explica principalmente por sus oncoproteínas, el VPH sólo codifica 9 a 10 tipos de proteínas, carece de proteasas, ADN polimerasa o de enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleótidos (Lizano *et al*, 2009). La organización del genoma es la misma para los diferentes tipos de VPH (Figura 3) y consiste en dos regiones:

E (Early-temprana): contiene genes para la codificación de proteínas reguladoras, transformadoras y replicadoras, (E1, E2, E4, E5, E6 y E7).

L (Late- tardía): contiene genes para la codificación de proteínas estructurales de la cápside (L1, L2).

Los papilomavirus capaces de infectar a humanos se clasifican en cinco géneros (alfa, beta, gama, mu y nu) y a su vez éstos se clasifican de acuerdo a su capacidad oncogénica, en serotipos de alto riesgo (16, 18, 26, 30, 31,33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67,68, 69, 70, 73, 82) y de bajo riesgo (6, 11,13, 32, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 71, 72, 74, 81, 83, 84 y 85) (Janaina C. *et al*, 2011).

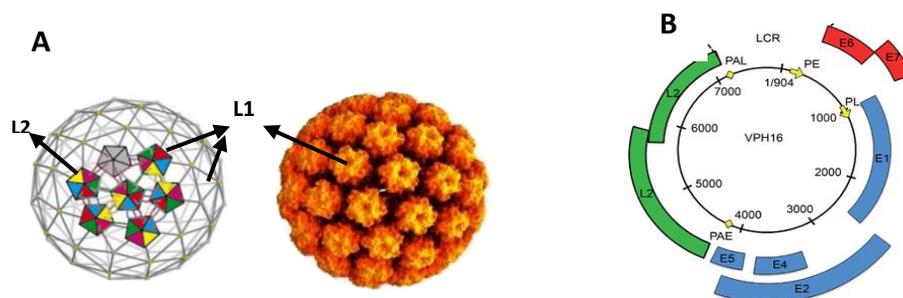


Figura 3. A. Proteínas estructurales L1 y L2, siendo L1 la más abundante, en los mosaicos se muestra el arreglo con triangulación en 7 de cada uno de los capsómeros pentaméricos (Tomado y modificado de Modis. Y, 2002). **B.** Diagrama del genoma del VPH 16 y la distribución de sus proteínas (Tomado y modificado de Santos L.G, 2015).

2.2 Infección por VPH

La infección por VPH de alto riesgo es común, más del 80% de mujeres con vida sexual activa han estado en contacto con el virus en algún momento de su vida. Sin embargo, la mayoría de las infecciones son eliminadas gracias a la activación del sistema inmune. Es importante considerar que la persistencia y las re-infecciones, dentro de otros factores de riesgo pueden contribuir al desarrollo de lesiones y de cáncer en sitios estratificados y glandulares (Torsen E. *et al*, 1998).

El VPH logra establecerse en el tejido mediante la infección de queratinocitos basales, lo cual ocurre a través de lesiones o abrasiones en el tejido. Por ser un DNA virus necesita infectar células con actividad mitótica para producir progenie viral. La introducción de los viriones en la célula es iniciada por la interacción de la proteína L1 (principal proteína de la cápside) con heparán-sulfato y sindecano 3 presente en la superficie celular, otra molécula implicada en el ingreso de las partículas virales es la integrina alfa-6 y cuya interacción puede inducir señales inhibitoras de la apoptosis a través de la activación de las vías de señalización Ras/MAP y PI3K/Akt (Figura 4) (Evander M, *et al*, 1997; Fothergill T y Mc Millan NA, 2006).

Posterior al proceso de internalización viral, las proteínas E1 y E2 comienzan a transcribirse y traducirse, lo cual genera un control en el número de copias del genoma viral episomal (no

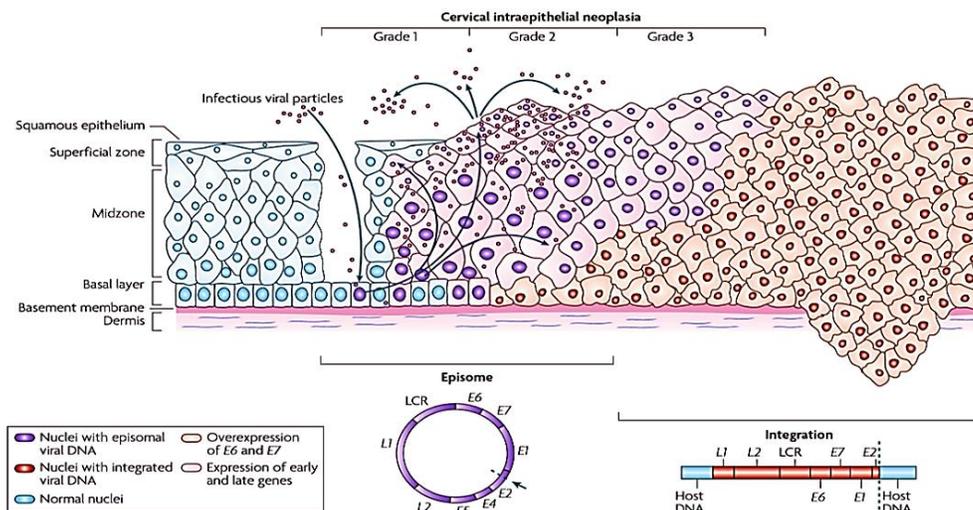


Figura 4. Mecanismo de infección por VPH, el virus del papiloma humano (VPH) tiene acceso a las células basales a través de micro abrasiones en el epitelio cervical. Después de la infección, se expresan los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7 del VPH tempranos y el ADN viral se replica a partir del ADN episomal (núcleos púrpuras). En las capas superiores del epitelio (zona media y zona superficial) se reproduce de nuevo el genoma viral y se expresan los últimos genes L1, L2 y E4. L1 y L2 encapsulan los genomas virales para formar viriones de progenie en el núcleo (Tomado y modificado de Ciaran B. J. *et al* 2007).

integrado al genoma celular). Esas proteínas se mantienen entre 20 y 100 copias por célula. Ambas forman un complejo para reclutar la maquinaria de polimerización celular y factores accesorios para la replicación del genoma (Conway M.J *et al*, 2009).

En la capa suprabasal la expresión de los genes E1, E2, E5, E6 y E7 contribuye al mantenimiento del genoma viral e induce la proliferación celular, incrementando el número de células susceptibles de ser infectadas, lo cual redundaría en una mayor progenie viral (Figura 4). En las zonas donde se encuentran las células más diferenciadas se mantiene la expresión de los genes E1, E2, E6 y E7, además se comienza a expresar el gen E4, que tiene la función de amplificar la replicación del genoma viral, incrementando significativamente el número de copias del genoma, mientras que se activa la transcripción de los genes tardíos L1 y L2, involucrados en el ensamble y en la salida de los nuevos viriones (Santos L.G, 2015).

2.3 Transformación de células cervicales.

La infección por virus de papiloma humano se puede clasificar a nivel clínico como una infección latente, caracterizada por la presencia del virus en las células o tejidos aparentemente normales y sin ninguna manifestación de la enfermedad. Sin embargo, el virus está presente y puede ser detectado por técnicas específicas. Otro comportamiento es la infección subclínica, la cual se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilositos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de tejidos afectados (Lizano *et al.*, 2009).

Estas anomalías histológicas denominadas Neoplasia Intraepitelial Cervical se han clasificado de acuerdo a su severidad en NIC I o displasia leve, NIC II o displasia moderada, NIC III o displasia severa (carcinoma in situ) y finalmente cáncer invasor. En los últimos estadios la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles (Woodman J.B *et al.*, 2007).

A nivel genético y molecular existen cambios y alteraciones durante la progresión de la enfermedad, los cuales originan procesos de transformación celular que implican: la activación de la telomerasa con una subsecuente desregulación del número de divisiones mitóticas, que a su vez conlleva a sobre expresión de receptores y de sus ligandos, factores de crecimiento y sintetización de nuevas proteínas que ayudan a la activación de vías de señalización proliferativas en la mayoría de los casos; degradación de proteínas supresoras de tumor (pRB y p53), desregulación del ciclo celular y la apoptosis. Es importante mencionar que

prácticamente todos estos mecanismos de transformación y resistencia a la muerte celular son causados por las oncoproteínas E6 y E7 (Lizano *et al.*, 2009).

3. Inducción de apoptosis

Existen diversos mecanismos de inducción de muerte para el mantenimiento de la homeostasis celular, la cual incluye la eliminación de células transformadas. El tipo de muerte celular mayormente reportado es el denominado apoptosis, término introducido en 1972, por Kerr y colaboradores, para describir el mecanismo de suicidio celular involucrado en el recambio normal de hepatocitos.

En condiciones fisiológicas normales las células transformadas, dañadas, senescentes, infectadas por virus o bacterias son eliminadas a través de este tipo de muerte celular (Carmen M.E, *et al*, 2001), Sin embargo, durante el desarrollo del cáncer, las células tumorales pueden generar mecanismos de evasión de muerte celular, favoreciendo la progresión del tumor y la resistencia a las terapias antitumorales comunes.

Las características de las células que mueren por apoptosis son: la condensación de la cromatina con la subsecuente fragmentación del material genético y la generación de cuerpos apoptóticos, sin embargo, una de las características primordiales de este proceso es la falta de inflamación con lo que se logra no provocar daño a células aledañas, esto gracias a cambios en la superficie celular que promueven la exposición de moléculas que permiten inmediatamente la fagocitosis por células del sistema inmune (Gupta, 2000).

El proceso apoptótico es organizado, dependiente de energía y de síntesis de nuevas proteínas y puede llevarse a cabo de dos diferentes maneras, la activación de la vía extrínseca o vía dependiente de receptores de muerte y de la vía intrínseca o vía mitocondrial (Alberts *et al.*, 2006). Sin embargo, ambas vías tienen puntos de convergencia, que tienen como finalidad la activación de un grupo de proteasas específicas para aspartatos y cisteínas denominadas caspasas, las cuales tienen diversos blancos moleculares que conllevan al desarrollo de la muerte (Gupta, 2000).

La vía extrínseca de la apoptosis puede ser activada por varios tipos de receptores de muerte, la mayoría pertenecientes a la superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), entre los que destacan TNF-R, TRAIL-R1, TRAIL-R2 y FAS, este último con especial relevancia para el presente trabajo.

3.1 Receptor Fas (CD95)

El receptor Fas también conocido como proteína dependiente de citotoxicidad (CD95), proteína apoptótica-1 (Apo-1) o TNFRSF6 es un miembro prototipo de la superfamilia de receptores de muerte del factor de necrosis tumoral, juega un papel muy importante en inducción de apoptosis (Fuster G.J., 2005).

El gen FAS está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 en la región 23.3, abarca aproximadamente 25kb (Figura 5) que se traduce, en una proteína de 335 aa con un peso de entre 42-52 KDa (NCBI, 2018).

Fas es una proteína transmembranal de tipo I que presenta en su dominio extracelular dos lugares de N-glicosilación y una región rica en cisteínas donde se une a su ligando (Fas-L), y un dominio de muerte intracelular cercano al extremo carboxilo terminal de la molécula (Nagata S. et al, 1995). CD95 contiene tres dominios ricos en cisteína (CRD) CRD2 y la parte superior de CRD3 interactúan con CD95L (Figura 5) (Schneider *et al.*, 1998).

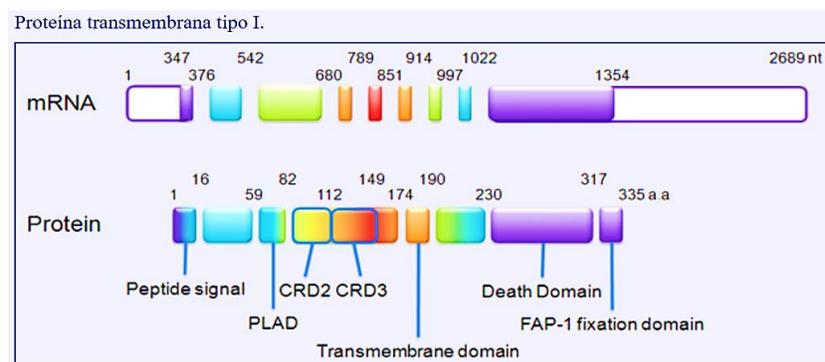


Figura 5. CD95 es una glicoproteína transmembrana de 335 aminoácidos tipo 1. El péptido señal corresponde a los aminoácidos 1 a 16 (Itoh *et al.*, 1991). La PLAD (dominio de ensamblaje pre-ligando) y los CRD (dominio rico en cisteína) están codificados por el exón 2 a 5. El exón 6 abarca el dominio transmembrana (TM), y la región intracelular CD95 consiste en los exones 7 a 9. El FAS DD está codificado por el exón 9 (Tomado de *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*)

La región intracelular de CD95 abarca una región de 87 aminoácidos denominado dominio de muerte (DD) cuya estructura consiste en seis α - hélices anfipáticas dispuestas de forma antiparalela (Figura 6). Los 15 últimos aminoácidos de CD95 ejercen una acción inhibitoria sobre la señal apoptótica mediada por CD95 debido al reclutamiento de la proteína tirosina fosfatasa no receptor 13 (PTPN13/FAP-1) (Huang *et al.*, 1997; Yanagisawa *et al.*, 1997).

El receptor Fas se expresa ubicuamente en la membrana celular de diversos órganos y tejidos, particularmente en el timo, hígado, corazón, riñón y en linfocitos T activados, también existen formas solubles del receptor, sin embargo, las funciones de éste no son claras. CD95 enlazada a la membrana celular es la forma predominante y biológicamente activa, una vez que interactúa con su ligando natural CD95L (CD178) o con anticuerpos agonistas. La función primordial del receptor CD95 es la inducción de apoptosis, sin embargo, recientemente se ha descrito que su activación puede inducir actividades no apoptóticas (Guicciardi M.E, 2005; Shatnyeva M.O, 2011).

Debido a su actividad apoptótica, la expresión de Fas está altamente regulada a través de diferentes mecanismos, uno de éstos es la mínima expresión en la membrana plasmática y un alto contenido de receptores en el citosol y en la red trans del complejo de Golgi (Guicciardi M.E, 2005). Fas también puede ser modulado a nivel post-transcripcional de manera directa por el factor nuclear κ B (NF κ B) también se ha demostrado que la IL-2 regula al RNA mensajero de CD95 en células de cáncer cervicouterino VPH 18⁺ (Aguilar-Solís, 2014; Guicciardi M.E, 2005). Estos mecanismos proveen de una herramienta efectiva para regular la densidad de receptores de muerte en la membrana plasmática, y así se evita la activación espontánea del receptor. Además, Fas (monómero) se encuentra en su forma cerrada evitando el contacto con FADD (Figura 6).

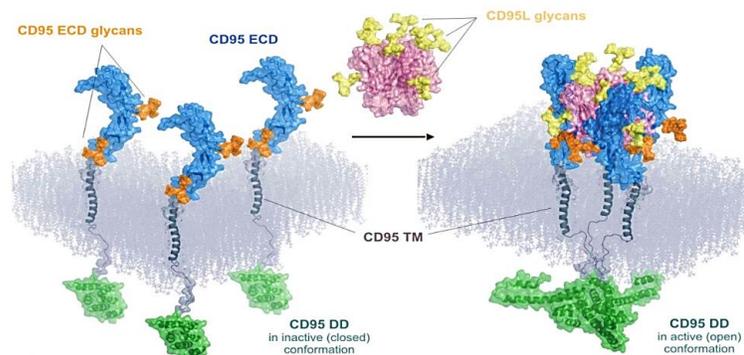


Figura 6. Modelado *in silico* de Fas (CD95, APO 1). Se observan las tres unidades de Fas que formaran el trímero al unirse a FAS L y sus sitios de glicosilación que permiten la unión del receptor a su ligando (ECD). Se distingue la región transmembranal (TM). En verde de lado izquierdo se muestra la forma inactiva o cerrada de Fas (CD95) en el Dominio de Muerte (DD) al contacto con su ligando (lado derecho) se vuelve activo, lo cual representa el cambio conformacional a la forma abierta (Tomado y modificado de Shatnyeva M.O, 2011).

3.2 Ligando de Fas (CD95L)

El gen de FAS L, o también llamado ligando de FAS o CD95L, está ubicado en el brazo largo del cromosoma 1, en la región 2, el cual codifica para una proteína de 281aa, miembro de la familia TNF y factor de crecimiento neuronal. Esta glicoproteína de superficie celular homotrimérica de tipo II, pesa aproximadamente 40 kDa, cuenta con un extremo N terminal que se encuentra en el espacio citoplasmático y el C terminal, en el extracelular (Nagata S., 1999). En contraste con el receptor Fas, que se expresa constitutivamente en gran número de tipos celulares, la expresión de su ligando (Fas-L o CD95L) está restringida (Lambert C. *et al.*, 2003). Se expresa en células T activadas y células NK “natural killer”; aunque también se encuentra en algunos tejidos como los testículos y el ojo. Fas-L participa en el mantenimiento de la homeostasis de las células periféricas B y T, así como en la eliminación de células dañadas, tales como células infectadas por virus. Fas-L también puede ser detectado de forma soluble funcional, circulando en el torrente en forma de trímero y se ha encontrado incrementado en pacientes con algunos tipos de cáncer. La forma soluble de Fas-L se encuentra presente en el suero; sin embargo, la efectividad biológica es considerablemente reducida comparada con la forma que se encuentra ligada a la membrana (Figura 7) (Schneider P. *et al.*, 1998)

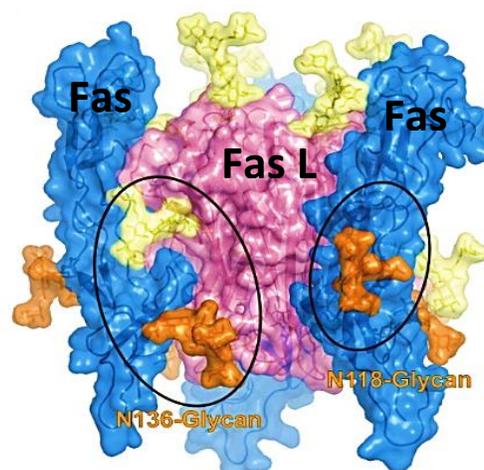


Figura 7. Complejo proteico Fas L / Fas, se observan los sitios de unión (glicosilación) (Tomado y modificado de Shatnyeva M.O, 2011).

3.3 Activación de la vía Fas (Vía Canónica)

Tras la interacción del receptor Fas con su ligando soluble o asociado a la célula, la proteína trimeriza formando microagregados. La agregación de los dominios de muerte (DD) del receptor Fas (CD95) conlleva al reclutamiento de la proteína con dominio de muerte asociada a Fas (FADD) (Figura 8) (Fuster G.J, 2005), con el subsecuente reclutamiento y activación de la procaspasa 8 (isoformas procaspasa-8), lo que se conoce como, complejo de señalización inductor de muerte (DISC) el cual se forma segundos después de la estimulación con el CD95L (Shatnyeva M. *et al.*, 2011).

El dominio de muerte (DD) del receptor interactúa con el DD de FADD, mientras que el dominio efector de muerte (DED) de FADD interactúa con los DED en el N-terminal de procaspasas-8, -10 y c-FLIP^{L/S/R} según los requerimientos celulares. La procaspasa-8 al unirse al DISC sufre una oligomerización que resulta en el procesamiento del zimógeno, rompiéndose autolíticamente para generar caspasa-8 (forma activa) que activa a su vez caspasas efectoras 3, 6 y 7 para inducir la muerte celular (apoptosis) (Shatnyeva M. *et al.*, 2011).

Hasta ahora se han identificado dos formas de activación de la vía apoptótica tras la interacción de Fas con su ligando. Una caracterizada por altos niveles de formación de DISC y grandes cantidades de caspasa-8 activa, que a su vez activa a las caspasas efectoras 3 y 7. La segunda caracterizada por niveles bajos de formación de DISC y, por tanto, bajos niveles de caspasa-8 activa. En este caso, la señalización requiere un bucle de amplificación adicional que implica la escisión de la proteína de la familia Bcl-2, Bid, por la caspasa-8 para generar la Bid trunca (t Bid) y la subsiguiente liberación de citocromo C de las mitocondrias.

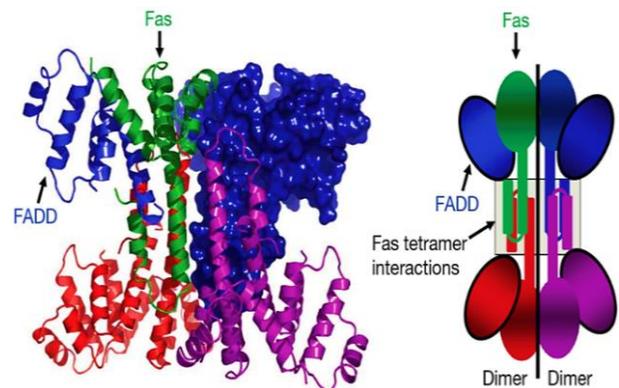


Figura 8. Estructura general del complejo de dominio de muerte Fas-FADD. La estructura (panel izquierdo) muestra una disposición tetramérica de complejos de dominio de muerte Fas-FADD. El panel derecho muestra una representación de la estructura compleja Fas-FADD. Complejo de dominio de muerte se muestra en verde (Fas) y azul (FADD) cintas, mientras que los restantes tres complejos son de color rojo, magenta y azul (Scott L.F, 2009).

4. Mecanismos de evasión de muerte por Apoptosis

Durante la carcinogénesis, las células tumorales desarrollan múltiples mecanismos para evadir al sistema inmune y suprimir la respuesta antitumoral, algunos de estos mecanismos activan nuevas vías de señalización.

4.1 Vía no canónica de Fas (CD95)

Diferentes estudios señalan la resistencia en diferentes células tumorales a la inducción de apoptosis vía CD95, aun cuando son estimuladas con altas dosis de Fas-L (Lina C. *et al.*, 2010). Sin embargo, las células tumorales expresan Fas (CD95), lo que lleva al cuestionamiento del papel de este receptor en el desarrollo tumoral (Ramírez PA. *et al.*, 2009).

Recientemente se han descrito nuevas vías de señalización tras la activación de CD95, antecedentes muestran la importancia de este receptor en mecanismos de proliferación, metástasis y de resistencia a la eliminación tumoral, activando rutas que involucran la señalización a través de MAPK, NFκB, PI3K Sck y JAK (Peter M. *et al.*, 2015).

En un estudio reciente Qadir SA y colaboradores (2017) mencionan que dentro de las funciones no apoptóticas de CD95 destaca su capacidad para acoplarse a múltiples vías de señalización como las que involucran a proteínas activadas por mitógeno (MAPK/ ERK), al factor nuclear Kappa B (NFκB) y a fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (Figura 10). Sin embargo, el aporte más importante es la activación de la vía de STAT 1, en su artículo destacan que la estimulación a largo plazo de la vía CD95 en células de cáncer de mama (MCF-7) dio como resultado la producción de IFN de tipo I, que a su vez activa a STAT 1 confiriendo a las células radio resistencia.

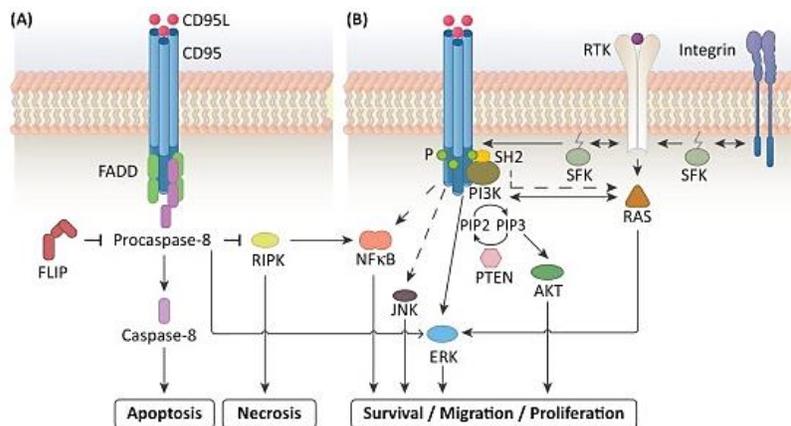


Figura 10. A. Vía canónica de Fas (CD95). B. Vía no canónica de Fas (CD95) que involucra vías de supervivencia, proliferación y metástasis (tomado y modificado de Martín-Villalba y colaboradores 2013).

Por su parte Teodorczyk M, y colaboradores (2015), asocian la vía CD95 con mecanismos de transición epitelio mesénquima (TEM), por medio de una vía alterna de señalización (no canónica). En este artículo se aborda el mecanismo molecular mediante el cual CD95 impulsa el crecimiento del tumor en células de adenocarcinoma ductal pancreático, demostrando que la activación de la vía promueve una cascada de señalización que involucra las vías PI3K y MAPK a través de la cinasa Sck (Figura 11).

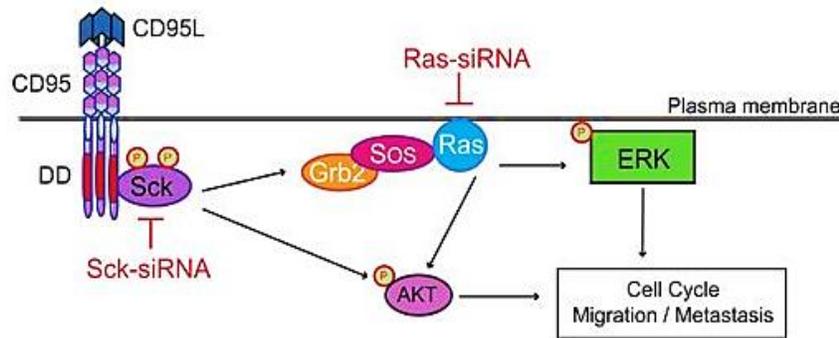


Figura 11. La estimulación del receptor CD95 con CD95L conduce el reclutamiento de Sck y la activación de las vías PI3K / ERK, lo que resulta en la progresión del ciclo celular (Tomado de Teodorczyk. M y colaboradores 2015).

4.2 Inhibición de la vía FAS (CD95) por E6

Existen reportes de la resistencia a la activación de la muerte celular en cáncer cervicouterino, una de las estrategias del virus para llevar a cabo este efecto es mediante el uso de su proteína E6, aunque el papel mejor comprendido de dicha proteína es por la capacidad de mediar la rápida degradación del supresor de tumores p53, la mayoría de las proteínas virales tienen más de una función. En un artículo publicado por Filippova y colaboradores en 2004 se muestra como la proteína E6 del VPH16 es capaz de unirse al extremo C-terminal de TNF R1, para bloquear la transmisión de la señal apoptótica del TNF R1 asociado al dominio de muerte (TRADD). Posteriormente, el mismo grupo de trabajo muestra la capacidad de E6 de unirse al dominio de muerte asociado a Fas (FADD) para evitar la activación de la vía apoptótica (Tungteakkhun, S *et al.*, 2008). Esto muestra el papel de las oncoproteínas virales en la evasión de diversas rutas de muerte celular y su posible desviación hacia vías de supervivencia, proliferación e incluso migración celular.

4.3 Tumores y Fas-L (CD95L)

Algunas células neoplásicas (de vejiga, colon, hígado, pulmón, ovario, tiroides, riñón, sarcoma y melanoma) expresan en su membrana o son capaces de secretar a Fas L, lo cual podría representar un mecanismo para inducir apoptosis en los linfocitos T activados infiltrados en el tumor y con ello un escape del sistema inmune. Además, reportes recientes indican el uso del receptor para promover el crecimiento tumoral. Chen L y colaboradores en 2010, refieren la estimulación de 22 líneas celulares tumorales dentro de las que destacan ovario (HeyA8, SKOV3), colon (HCT116), renal (CAKI-1) mama (MCF7) hígado (HepG2) con Fas-L, sin observar aumento en la proliferación. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal neutralizante para Fas-L (NOK-1) encontraron una reducción significativa del crecimiento celular. Lo que indica el uso de la vía CD95 / CD95L en la promoción del crecimiento tumoral (Chen L. *et al.*, 2010).

4.4 Inducción de autofagia en células tumorales

Recientemente y a consecuencia de la alta resistencia en las células tumorales al proceso de muerte celular, se han estudiado con más detalle diversas vías que pueden activar las células tumorales. Una de ellas es la activación de autofagia, mecanismo de homeostasis que utilizan las células normales para degradar proteínas y organelos disfuncionales, que ocurre en vacuolas especializadas de doble membrana denominadas autofagosomas y que requiere la participación de lisosomas. Este proceso permite el auto-abastecimiento celular de energía a través del reciclaje de diversos substratos energéticos y con eso la homeostasis celular. Se activa en respuesta a diversas formas de estrés, principalmente debido a la ausencia de nutrientes (Peña S, 2013). Sin embargo, este proceso ha sido involucrado recientemente en la progresión tumoral y el desarrollo de resistencia a diversos fármacos quimioterapéuticos.

Con frecuencia se reporta que la autofagia tiene una función paradójica durante la carcinogénesis y la respuesta a tratamiento; si bien se ha reportado la presencia de autofagia como regulador negativo en etapas tempranas de cáncer, también se ha documentado que, en células neoplásicas establecidas, el estrés metabólico (originado como resultado de deficiencias de nutrientes, hipoxia, incremento en la demanda energética producto de una replicación acelerada) induce autofagia.

Este proceso genera ventajas selectivas a las células tumorales tanto en el microambiente tumoral como durante la diseminación y metástasis, incrementando agresividad neoplásica y/o resistencia a fármacos. En diferentes líneas celulares la terapia antineoplásica, radioterapia y quimioterapia inducen autofagia que a su vez conduce a la sobrevivencia de las células tumorales. Sin embargo, aún falta mucho por dilucidar en los diferentes escenarios que regulan la autofagia durante la carcinogénesis (Choi K, 2012; Aredia F, 2012).

5. Estrategias en la eliminación de células tumorales: inmunoterapia

Por años se han buscado nuevas y mejores estrategias en la eliminación de células tumorales con la introducción de nuevos fármacos quimioterapéuticos, y recientemente se ha puesto especial énfasis en la inmunoterapia. La inmunoterapia busca la eliminación de las células tumorales mediante la activación del sistema inmune, además, se han descrito algunas ventajas sobre la terapia convencional, como son la especificidad y una disminución de efectos secundarios (Rosenberg SA *et al.*, 1985; Gutiérrez Y.P, 1997)

5.1 Interleucina 2 (IL-2)

La interleucina 2 (IL-2) es una glicoproteína compuesta por 133 aminoácidos cuyo peso molecular es de 15KD. De manera normal, lo producen principalmente las células T (CD4+) y las NK activadas. Su función consiste en estimular la proliferación de células T activadas, por lo que forma parte de la respuesta de tipo Th1 (Chabner. B, 2008). La interleucina 2, actúa a través de su receptor para activar la vía de señalización JAK/STAT. El receptor IL-2 consta de tres componentes: Una cadena alfa de 55kD, cuya función principal es unirse a IL-2; una cadena beta de 75kD con un dominio intracelular implicado en la señalización, y la cadena gamma común de 64kD, llamada común porque también es un componente de señalización compartido por los receptores para IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (Figura 12) (Rebollo A. 1994; Ching. *et al.*, 2001).

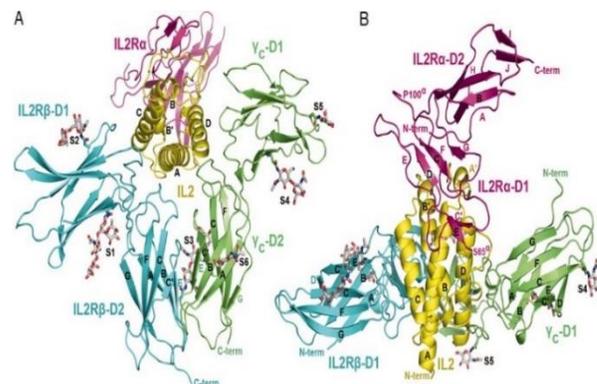


Figura 12. Estructura del receptor para IL-2 humano. Se muestran las vistas laterales (A) y superior (B) del conjunto de señalización de IL-2 cuaternario. Se pueden observar las 3 subunidades IL2R α (rosa), IL2R β (azul) y IL2R γ (verde) y la unión de IL-2 (amarillo) al receptor de alta afinidad (Tomado de Deborah J.S, 2006).

5.2 Interleucina 2 en cáncer

El análisis del efecto terapéutico de la IL-2 se realizó en modelos animales donde se demostró que el tratamiento era capaz de inhibir la metástasis de diferentes tipos de tumores. Posteriormente, se demostró en estos mismos modelos que la combinación de IL-2 con células citotóxicas (LAK y CTL) producía mejores efectos terapéuticos que cualquiera de los tratamientos por separado. La Interleucina-2 recombinante fue una de las citocinas más ampliamente utilizadas en la inmunoterapia de tumores sólidos (Rosenberg SA *et al.*, 1985).

5.3 IL-2 en CaCu

Se ha reportado que células de cáncer cervicouterino expresan el receptor para IL-2 (IL-2R), y que al ser activado con bajas dosis de IL-2 incrementa la proliferación de estas células (Alvarado MJ, 1997). Además, se observa que la fosforilación constitutiva de JAK-3 y STAT-5 aumenta en dichas células, confiriéndoles protección ante mecanismos de muerte celular. Sin embargo, las citocinas tienen efecto pleiotrópico, motivo por el cual una misma cantidad de citocina puede tener efecto sobre diversas estirpes celulares, a su vez, diferentes dosis de una misma citocina pueden tener efectos diferenciales en una misma estirpe celular (Valle-Mendiola *et al.*, 2016).

Nuestro grupo de trabajo evidenció que el tratamiento con 100UI de IL-2 en células de CaCu VPH 18+ (INBL y CALO) inhiben su proliferación a 48 horas (Alvarado MJ, 1997; Valle-Mendiola *et al.*, 2016), datos posteriores mostraron que esta disminución en la proliferación es debida a un arresto en la fase G1 del ciclo celular y que este arresto no induce senescencia o muerte celular por apoptosis (Lagunas-Cruz *et al.*, 2019). Por otro lado, recientemente nuestro grupo de trabajo evidenció la presencia del receptor de muerte CD95 en diversas líneas de CaCu (Gutiérrez-Hoya *et al.*, 2019). Además, datos mostrados por el grupo de trabajo de Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2001, muestran que el tratamiento conjunto de células de CaCu HeLa y SiHa con ciclohexamida más anticuerpo agonista anti CD95 ó TNF- α , potenciaba la muerte celular, por lo cual, decidimos evaluar si el tratamiento conjunto de altas dosis de IL-2 más el anticuerpo agonista anti-CD95 podría potenciar la inhibición de la proliferación.

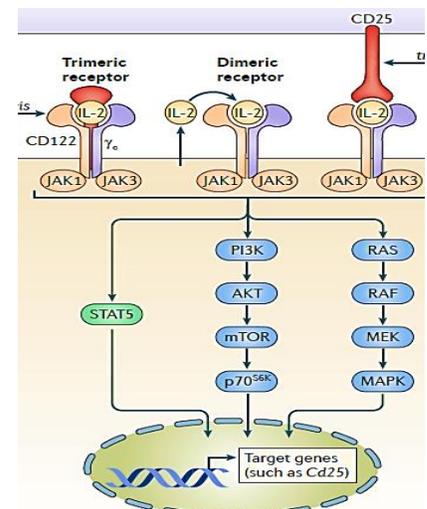


Figura 13. Vías activadas al interactuar IL-2 con su receptor (tomado y modificado de Boyman .O. 2012)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Antecedentes del grupo de trabajo describen que células HeLa positivas para VPH 18 expresan el IL-2R y que al ser estimuladas con 100UI/mL de IL-2, disminuyen significativamente su proliferación. Además, se ha demostrado que las células tumorales expresan el receptor de muerte Fas (CD95) sin embargo, estas son altamente resistentes a la inducción de apoptosis por el sistema inmune. Por tanto, es importante llevar a cabo este estudio ya que se desconoce si el estímulo con 100UI de IL-2 más la activación de la vía CD95, influye en la susceptibilidad de las células de cáncer cervicouterino para activar procesos de muerte celular o para potenciar la disminución proliferativa.

JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un importante problema de salud pública a nivel mundial, en México ocupa el segundo lugar por muerte e incidencia en mujeres. Se estima una ocurrencia anual de 13,960 casos con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres, además se conoce que la probabilidad de sobrevivida disminuye hasta en un 16.5% en personas diagnosticadas con metástasis en comparación con el 91.5% en cáncer localizado, esto debido principalmente a los mecanismos de resistencia a la muerte celular. Las células de CaCu VPH18+, son altamente resistentes a la inducción de apoptosis, por lo cual, es necesario establecer nuevos tratamientos que contribuyan en la eliminación tumoral y la activación del sistema inmune (SI). Por lo anterior se planteó, evaluar un tratamiento conjunto con altas dosis de IL-2 y anticuerpos agonistas para la vía CD95.

HIPÓTESIS

El tratamiento de células HeLa con altas dosis de IL-2 en combinación con el anticuerpo agonista para CD95 inhibirá la proliferación celular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la activación de la vía CD95 en células de cáncer cervicouterino HeLa afecta la proliferación o muerte de estas células al ser tratadas simultáneamente con 100UI/mL de IL-2 y anticuerpo agonista para CD95.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un análisis comparativo de la proliferación de células de cáncer cervicouterino HeLa (VPH18⁺), INBL (VPH18⁺), HER3⁺ (VPH18⁺), Caski (VPH16⁺) SiHa (VPH16⁺) y C33A (VPH) cultivadas en presencia de 100UI de IL-2.
- Determinar la presencia del receptor CD95 en las líneas de cáncer cervicouterino, HeLa (VPH18⁺), INBL (VPH18⁺), HER3⁺ (VPH18⁺), Caski (VPH16⁺) SiHa (VPH16⁺) y C33A (VPH).
- Evaluar el efecto a diferentes concentraciones del anticuerpo agonista para la vía CD95 (DX2) en células HeLa (VPH18⁺).
- Evaluar el desarrollo de autofagia, determinando la presencia de focos de fluorescencia para LC3B en células tratadas con el anticuerpo agonista (DX2) en células HeLa (VPH18⁺).
- Medir el porcentaje de muerte celular por apoptosis en células mononucleares al ser estimuladas con anticuerpo agonista para CD95 (DX2).
- Determinar el efecto de 100UI de IL-2 al ser activada la vía CD95 (DX2) en células HeLa (VPH18⁺).

Material Biológico

Se cultivaron líneas celulares de cáncer cervicouterino: **HeLa**, línea celular humana proveniente de adenocarcinoma cervical metastásico positivo para VPH 18 estadio IVB; **INBL** línea celular humana proveniente de células metastásicas no queratinizadas positivas para VPH18 estadio IVB; **HER3⁺** línea derivada de INBL positiva para receptores HER 3 (VPH 18⁺) (Monrroy-García, 1999) estadio IVB; **CaSki**, línea celular humana proveniente de un carcinoma epidermoide de cérvix derivado de una metástasis de intestino delgado positivo para VPH 16; **SiHa**, línea celular humana proveniente de carcinoma escamosos de cérvix positiva para VPH 16 estadio IIA; **C33A** línea celular humana proveniente de carcinoma de cérvix negativa para VPH (ATCC, 2019).

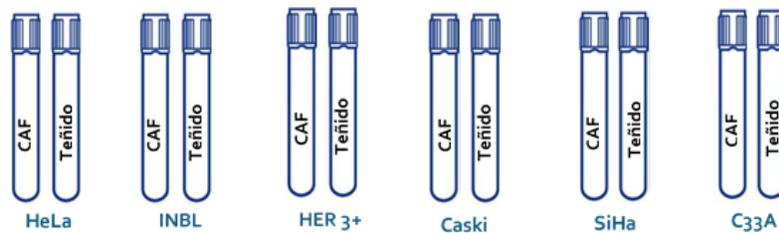
Se mantuvieron en placas de cultivo, medio RPMI-1640 o DMEM (Microlab, México) suplementado con 10% suero fetal de bovino (SFB Gibco, USA), incubadas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Para llevar a cabo los ensayos se mantuvieron siempre condiciones de esterilidad y los cultivos se utilizaron únicamente a un 60-70 % de confluencia para óptimos resultados.

1. Estimulación con 100UI de IL-2

Se sembraron 1,500 células HeLa, INBL, HER3⁺, Caski, SiHa y C33A en placas de 96 pozos, se dejaron adherir durante 3 horas a 37°C con medio RPMI-1640 al 10% de SFB, transcurrido el tiempo, se adicionó el estímulo, 100UI de IL-2 por un lapso de 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo se desechó el medio y se fijaron las células con glutaraldehído (SIGMA USA) al 1.1%; posteriormente se lavaron las células con agua destilada y se tiñeron con cristal violeta (SIGMA USA) al 0.1%, finalmente 15 min antes de la lectura se agregó ácido acético al 10% y se leyó en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 550nm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y en tres ensayos independientes, adicionando un control por línea celular. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el software Prisma 6.0.

2. Evaluación de CD95 por citometría de flujo

Se midió la expresión de CD95 intracelular y extracelular, para lo cual se contabilizaron 1×10^6 células HeLa, INBL, HER3⁺, Caski, SiHa y C33A con ayuda de un hemocitómetro. Las células fueron colocadas en tubos para citometría (Falcon- Thermo Fisher Scientific) y resuspendidas en solución buffer fosfatos (PBS 1X) 100µl, cada muestra con su respectivo control de autofluorescencia (CAF) como se muestra a continuación:



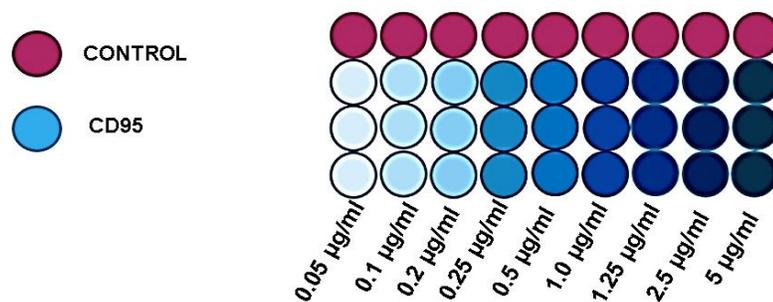
Posteriormente se agregaron 4µl de anti CD95 conjugado con APC (BD Biosciences) únicamente a los tubos teñidos (con anticuerpo para CD95) y se dejaron incubando por 45 minutos a 4°C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados con 250 µl de PBS 1X al 1% de albúmina sérica bovina (ASB). Posteriormente se agregaron 100µl de solución de fijación/permeabilización (Cytotfix/citoperm BD Biosciences) durante 15min a 4°C, posteriormente las células fueron lavadas con Buffer 1X (amortiguador BD).

Se agregaron 3µl de anti-CD95 conjugado con PE Cy7 (BD Pharmingen) para la tinción intracelular y se dejaron incubando en oscuridad por 45min a 4°C.

Finalmente se repitieron dos lavados con 250 µl de PBS 1X al 1% de albúmina sérica bovina (ASB), inmediatamente después se leyeron los resultados por citometría de flujo (FACS ARIA II) adquiriéndose 10,000 eventos. Los ensayos se realizaron por triplicado conservando las mismas condiciones. Los resultados fueron analizados con ayuda del software (FACS DIVA y Summit 4.3).

3. Estimulación de células HeLa con anticuerpo agonista para CD95

Se activo la vía CD95 con un anticuerpo agonista para CD95 (Biolegend, clona DX2), con el fin de evaluar el comportamiento proliferativo de células HeLa a diferentes concentraciones, para ello, se sembraron 3,000 células HeLa en placas de 96 pozos y se dejaron adherir, posterior se colocó el anticuerpo CD95 (Biolegend clona DX2) por triplicado y con su respectivo control durante 48 horas. Las concentraciones se muestran a continuación:



Análisis morfológico:

Una vez colocado el estímulo se realizaron fotografías en microscopio óptico convencional (Microstar American Optical) a diferentes tiempos y con ayuda de una cámara ocular Electronic Eyepiece (QUASAR), prestando atención a cambios morfológicos o presencia de cuerpos apoptóticos, los cambios más significativos se observaron a las 48 horas del tratamiento. Las imágenes fueron analizadas en el software image J (Image Processing and Analysis in Java) en donde se midió el área, perímetro celular y distancia en pixeles para con ello realizar un análisis comparativo respecto al control.

Proliferación celular:

Transcurrido el tiempo de estímulo (48 horas) con las diferentes concentraciones de CD95 se evaluó la proliferación celular con la técnica de cristal violeta, el medio fue desechado y se fijaron las células con glutaraldehído (SIGMA USA) al 1.1%. Posteriormente se lavaron las células con agua destilada y se tiñeron con cristal violeta (SIGMA USA) al 0.1%; finalmente 15min antes de la lectura se agregó ácido acético al 10% y se leyó la densidad óptica en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 550nm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y en tres ensayos independientes, adicionando un control por línea celular. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ayuda del software Prisma 6.0.

4. Detección de focos fluorescentes de la proteína LC3B mediante microscopia confocal

Se analizó la inducción de autofagia en respuesta al estímulo con CD95, por lo que se realizó un análisis de la proteína LC3B en células HeLa. Para ello se sembraron 50,000 células en cubreobjetos (Corning de 22 X 22 mm) previamente esterilizados, se dejaron adherir de 3 a 4 horas. Posteriormente, se colocaron 300 µl de medio al 10% de suero fetal bovino (SFB) con estímulo 0.5 µg/ml de CD95 (anti-CD95 PE Cy7 DX2 BD Pharmingen) y se incubaron por 48 horas.

Una vez transcurridas las 48 horas de estímulo el medio fue retirado, y se realizaron 2 lavados con 250 µl de solución buffer fosfatos (PBS 1X) adicionado al 5% de SFB, para la posterior permeabilización y fijación de las células con solución Cytofix/citoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos. Para retirar la solución se realizaron 2 lavados con la solución de lavado amortiguador Buffer Permash (BD Biosciences 1X). Posteriormente se agregó el anticuerpo primario LC3B en una dilución 1:200 (Anti-body Santa Cruz Biotechnology) y se incubó a 4°C durante 40 min. Las células fueron nuevamente lavadas con 250 µl de buffer Permash 1X, para agregar el anticuerpo secundario dilución 1:200µl (FITC-Thermo Fisher Scientific) por un lapso de 30 min. Finalmente se agregó DAPI en una disolución inicial de 1:2000µl. La muestra control se tiñó únicamente con DAPI siguiendo el mismo protocolo. Las muestras fueron lavadas dos veces más con PBS antes de ser montadas.

Para el montaje se retiró todo el PBS y las muestras se dejaron secar de 20 a 30 minutos en obscuridad a 4°C. Una vez secas, se agregó una gota de solución de montaje para colocar el cubreobjetos (Leica CV ultra Biosystems) y portaobjetos, para enseguida ser analizadas con ayuda del microscopio óptico confocal (Leica invertido DMI8) y del software Leica (LASX 3.30.16799).

5. Evaluación de muerte celular con Anexina V /IP

Se realizó el análisis de muerte celular en linfocitos estimulados con el agonista para CD95 (Biologend clona DX2), para lo cual se obtuvieron linfocitos de pacientes sanos en muestras de sangre periférica (SP) por venopunción siendo ésta depositada en un tubo recubierto con heparina (BD vacutainer). Inmediatamente después de la obtención la sangre fue diluida 1:1 en solución buffer fosfatos (PBS 1X) y se prosiguió a la separación de células mononucleares por estratificación sobre Ficoll - Hypaque en una relación 1:1, SP: Ficoll. La muestra fue centrifugada a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se separó la banda correspondiente a células mononucleares y se colocaron en tubo siliconizado, se lavaron dos veces con PBS 1X, centrifugando a 1500rpm durante 5 min, se decantaron y resuspendieron en PBS para contar 1×10^6 células mononucleares con ayuda de un hemocitómetro, las cuales se colocaron en cajas para cultivo (Petri 60X15mm) con 3mL de medio RPMI al 10% de SFB suplementado con 10UI de IL-2 para el correcto mantenimiento celular, dos de las muestras se utilizaron como control (negativo y positivo), las otras dos fueron estimuladas con anti-CD95 (Biologend DX2) a una concentración de 0.2 y 0.5 µl/ml durante 48 horas.

Una vez cumplidas las 48 horas las células fueron recuperadas en tubos para citometría, se lavaron con 200 μ l de PBS 1X se centrifugaron a 1500-2000 rpm y se resuspendieron en 100 μ l de Buffer Annexin 1X (BD). La muestra control fue separada y el resto de muestras fueron teñidas con 2.5 μ l de Annexina- V/ FITC y 2 μ l de Ioduro de Propidio (IP) (BD KIT II) y se incubaron por 10min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se adicionaron 100 μ l más de Buffer Annexin 1X, inmediatamente se leyeron por Citometría de Flujo 10,000 eventos (FACS ARIA II). Los resultados fueron analizados con ayuda del software FACS DIVA y Summit 4.3.

6. Estimulación CD95 más 100UI de IL-2 en células HeLa

Con el fin de evaluar el efecto de 100UI/ mL de IL-2 sobre el efecto proliferativo de 0.2 μ g/ml de CD95 sobre células HeLa, el ensayo se dividió en dos partes:

En una de las placas se sembraron 3000 células HeLa en medio RPMI suplementado con 10% SFB, se dejaron adherir durante 3 horas; posterior a ese tiempo se retiró todo el medio y se colocó medio nuevo con ambos estímulos 100UI/ mL de IL-2 más 0.2 μ g/ml de CD95 (Biolegend DX2) según correspondiera durante 48 horas de estímulo. Al cumplirse el tiempo de estimulación las células fueron fijadas y teñidas por método de Cristal Violeta (utilizando la misma metodología mencionada en el punto 1 y 3 referente a este apartado).

En el caso de la segunda placa se sembraron 1500 células HeLa, medio RPMI suplementado con 10% SFB, se dejaron adherir durante 3 horas, posterior a ese tiempo se retiró todo el medio y se colocó medio nuevo únicamente con el primer estímulo 100 UI/ mL de IL-2 se mantuvieron en incubación durante 48 horas a 37°. Cumplido este tiempo se retiró todo el medio; se realizó un lavado con PBS para enseguida colocar nuevamente medio fresco re-estimulando las células con 100 UI/ mL de IL-2, pero esta vez adicionando el segundo estímulo 0.2 μ g/ml de CD95 (Biolegend DX2) según correspondiera para nuevamente dejar en incubación durante 48 horas. Finalizado el tiempo total de estímulo (96 horas) las células fueron fijadas y teñidas por método de Cristal Violeta (utilizando la misma metodología mencionada en el punto 1 y 3 de este apartado). Ambos ensayos se leyeron en lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a 550nm y los resultados fueron analizados estadísticamente con ayuda del software Prisma 6.0 (prueba estadística ANOVA).

RESULTADOS

Altas dosis de IL-2 disminuye la proliferación de células de cáncer cervicouterino

Líneas celulares de CaCu fueron tratadas con 100UI de IL-2 durante 48H para analizar el efecto de esta citocina sobre la proliferación celular. Las líneas celulares HeLa (VPH18⁺), INBL (VPH18⁺), HER3⁺ (VPH18⁺), Caski (VPH16⁺) SiHa (VPH16⁺) y C33A (VPH⁻), independientemente del tipo de VPH que tienen incorporado, presentan disminución significativa (20-30%) de proliferación a las 48 horas al ser cultivadas con 100UI de IL-2, incluyendo la línea C33A que es negativa para VPH (Figura 14). Cada línea celular fue comparada con su respectivo control sin tratamiento (SE).

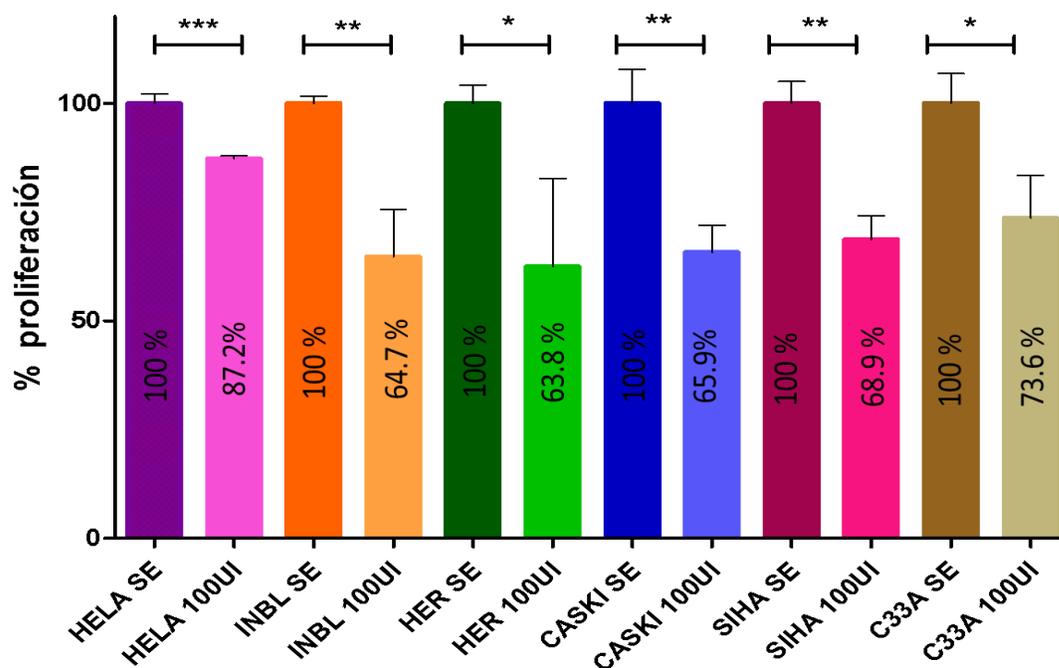
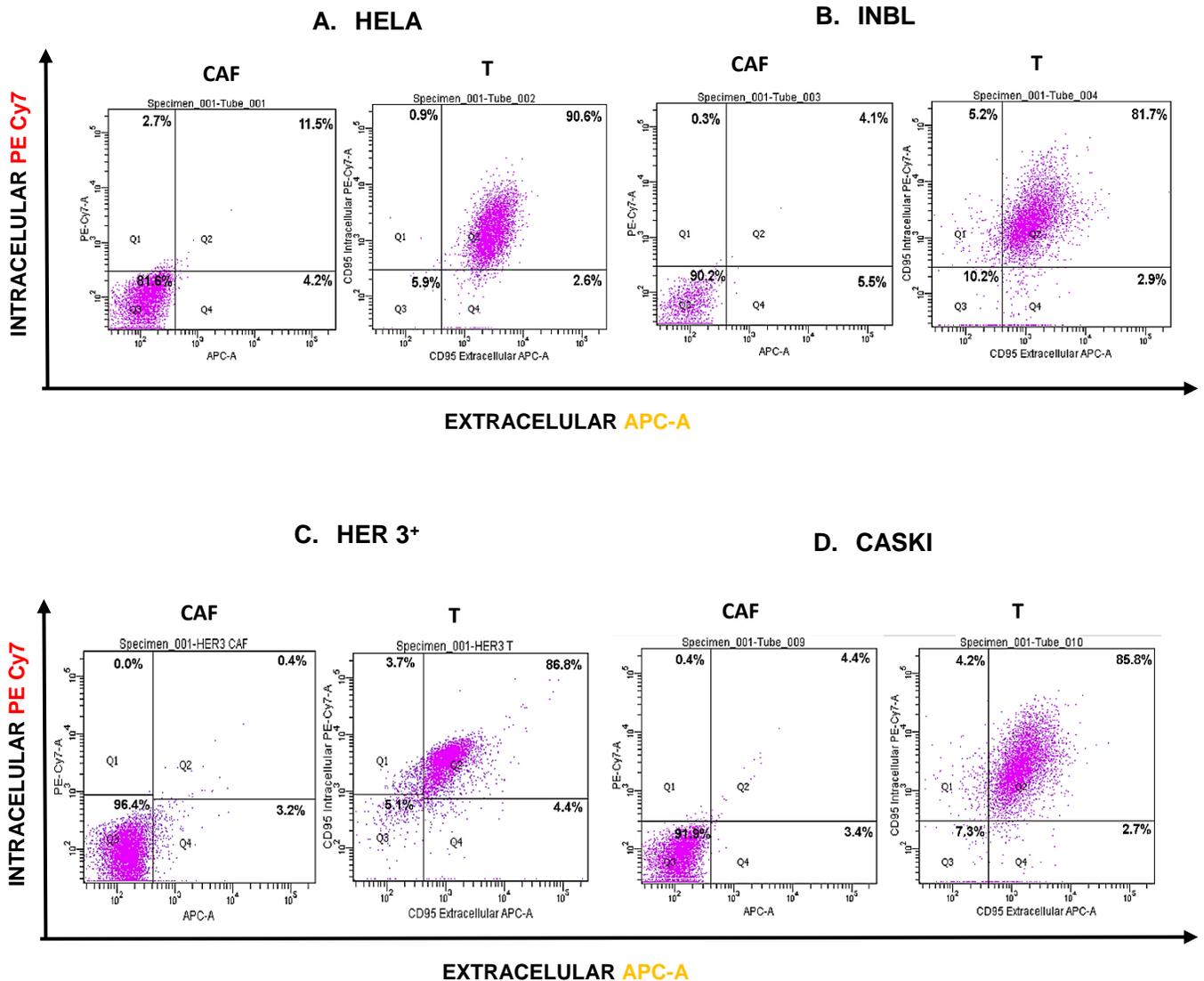


Figura 14. Análisis de la proliferación de células de CaCu tratadas con 100UI de IL-2 durante 48 horas. Se observa una disminución significativa de la proliferación celular en diferentes líneas de CaCu HeLa, INBL, HER3⁺, Caski, SiHa (VPH⁺) y C33A (VPH⁻), $p < 0.05$. Para las células HeLa se obtuvo una disminución del 12.8%, para INBL 35.3%, HER3⁺ 36.2%, Caski 34.9%, 31.1% y para la línea C33A un 26.4%.

Expresión de CD95 en líneas celulares de CaCu

Mediante citometría de flujo se analizó la expresión del receptor CD95 intracelular y extracelular en las diferentes líneas celulares de CaCu. Se observó que las células VPH⁺ expresan al receptor CD95 en un alto porcentaje (80-97.7%) de forma extracelular, en comparación con, la línea C33A VPH⁻ que expresa un bajo porcentaje de CD95 extracelular (16.9%). Sin embargo, independientemente de la presencia o ausencia del virus, todas las líneas celulares expresan un alto porcentaje de forma intracelular (73-90%) como se observa en la [Figura 15](#).



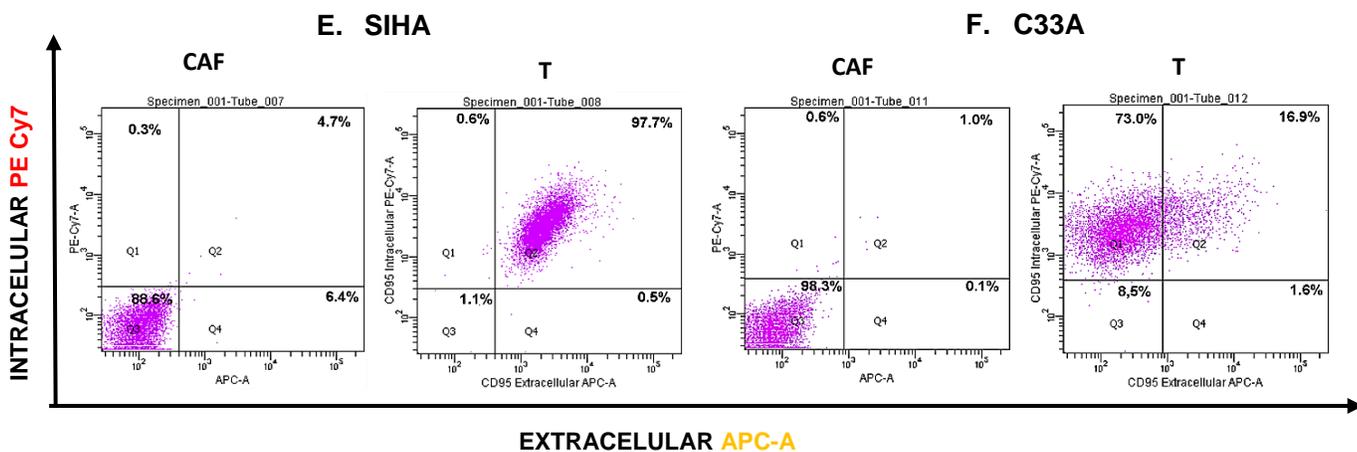


Figura 15. Determinación de CD95 intracelular y extracelular en células de CaCu. Líneas de CaCu positivas para VPH expresan altas cantidades de CD95 intra y extracelular (>80%), en contraste con la línea celular negativa para VPH que únicamente expresa CD95 intracelular significativamente (73%) de lado izquierdo se tiene el control de autofluorescencia (CAF) para cada muestra. **A)** Células HeLa (VPH 18⁺) **90.6%** expresan el receptor intra y extracelular **B)** Células INBL (VPH 18⁺) **81.7%** **C)** Células HER 3⁺ (VPH 18⁺) **86.8%** **D)** Células Caski (VPH 16⁺) **85.8%** **E)** Células SiHa (VPH 16⁺) **97.7%** siendo esta línea la que mayor porcentaje de CD95 intra y extracelular expresó. **F)** Células C33A (VPH negativas) en contraste con todas las líneas anteriores, expresó únicamente **16.9%** extracelular, el mayor porcentaje de expresión se haya en el cuadrante Q1 con un **73.0%**, es decir la mayor parte del receptor esta internalizado.

La activación de la vía CD95 en células HeLa puede inducir proliferación, autofagia o muerte de forma dosis dependiente

Se evaluó el efecto de la activación de la vía CD95 en células HeLa (VPH18⁺), utilizando un anticuerpo agonista de la vía CD95 (DX2) en diferentes concentraciones. Por medio de análisis de imágenes y de proliferación celular, se evaluaron cambios morfológicos y la densidad celular con tinciones por cristal violeta. Para evaluar cambios morfológicos se dio seguimiento a los cultivos celulares con la toma de fotografías a diferentes tiempos y concentraciones de estímulo, como se observa en la figura 16.

Los cambios morfológicos, más significativos se presentaron 48 horas posteriores al estímulo, observándose que a bajas dosis de CD95 [0.1 - 0.25 µg/ml] hubo un incremento en la densidad celular, a concentraciones medias [0.5 - 2.0 µg/ml] no se observaron cambios en la densidad celular. Sin embargo, las células presentaron una morfología anormal, visualmente con prolongaciones celulares y mayor tamaño respecto al control, lo cual fue confirmado analizando las imágenes con el programa imageJ, el cual indicó un aumento en el área celular mayor al doble con respecto al control (Tablas Anexo 1). Finalmente, con altas concentraciones del anticuerpo agonista para CD95 [2.5–5.0 µg/ml] indujeron cambios morfológicos característicos de células apoptóticas (Figura 16 y 17).

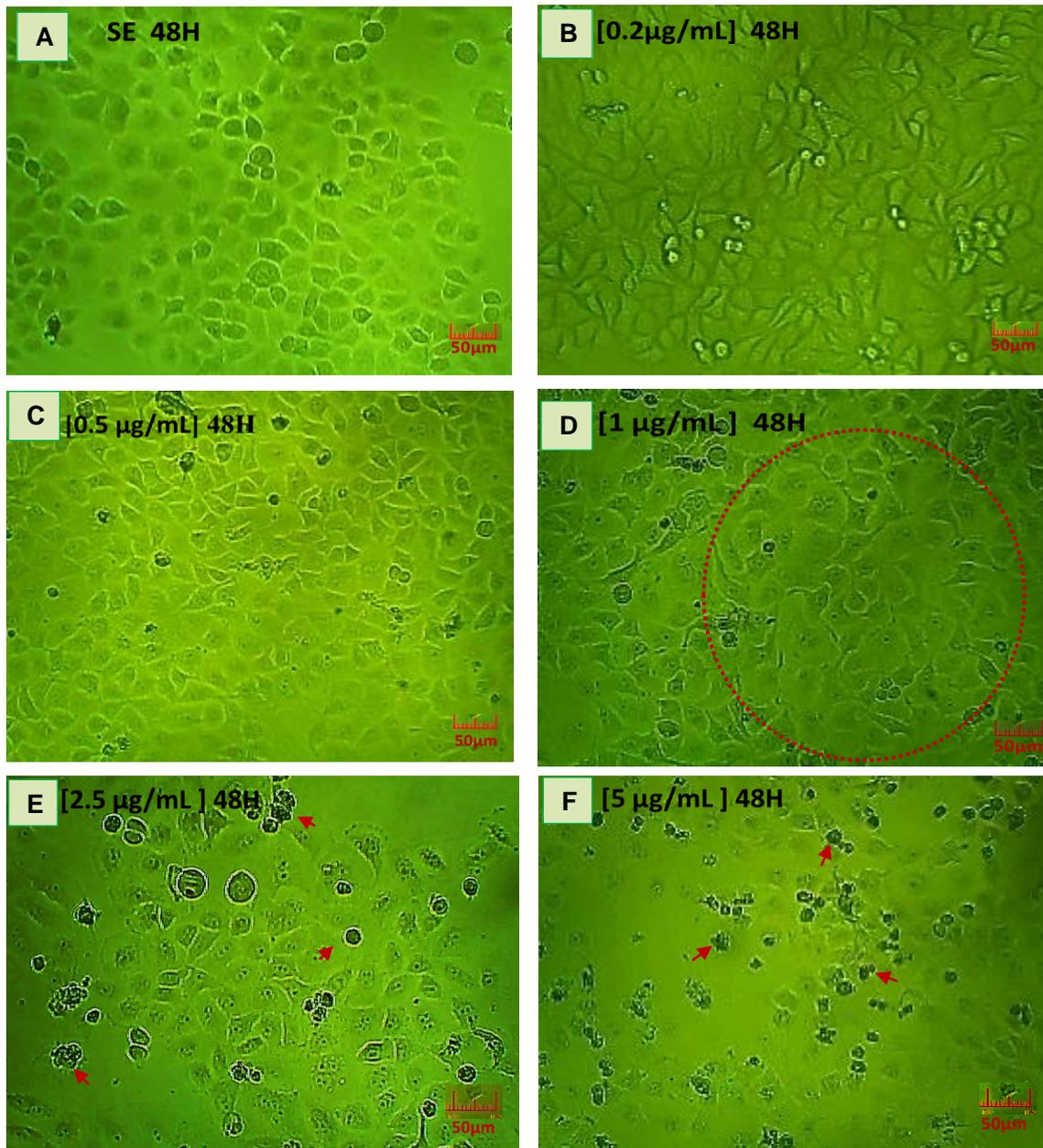


Figura 16. Análisis morfológico de células HeLa tratadas con diferentes dosis del anticuerpo agonista anti-CD95. A-F. Fotografías de células HeLa estimuladas con diferentes concentraciones del anticuerpo agonista para CD95 (DX2) durante 48 horas (campo claro objetivo 10X), se analizaron células al azar por cuadrante y se obtuvo la media (**mean**) y desviación estándar (**SD**) de cada grupo. **A)** Células sin estímulo (**SE**) promedio de área celular ($\bar{X}=481.64 \mu\text{m}^2$) **B)** Células estimuladas con **0.2 $\mu\text{g/ml}$** de anti-CD95, se observa un incremento en la densidad celular respecto al control, pero no se aprecia incremento significativo en el tamaño celular ($\bar{X}=511.43\mu\text{m}^2$) **C)** Células HeLa estimuladas con **0.5 $\mu\text{g/ml}$** de anti-CD95, se puede observar incremento en la densidad celular, e incremento en el tamaño ($\bar{X}=806.6 \mu\text{m}^2$) **D)** Células estimuladas con **1.0 $\mu\text{g/ml}$** de anti-CD95, no se observa aumento en la densidad celular pero si en el tamaño celular que se puede apreciar claramente en las células ubicadas dentro del círculo rojo ($\bar{X}=1071.38\mu\text{m}^2$) **E)** Células estimuladas con **2.5 $\mu\text{g/ml}$** de anti-CD95, en las cuales observa aumento de tamaño ($\bar{X}=916.15 \mu\text{m}^2$), sin embargo, se comienzan a distinguir cuerpos apoptóticos (señalados con la flecha roja) **F)** Células estimuladas con **5.0 $\mu\text{g/ml}$** de anti CD95, se observan claramente cuerpos apoptóticos en todo el cuadrante y pocas células adheridas que presentan disminución de su tamaño ($\bar{X}=393.97\mu\text{m}^2$).

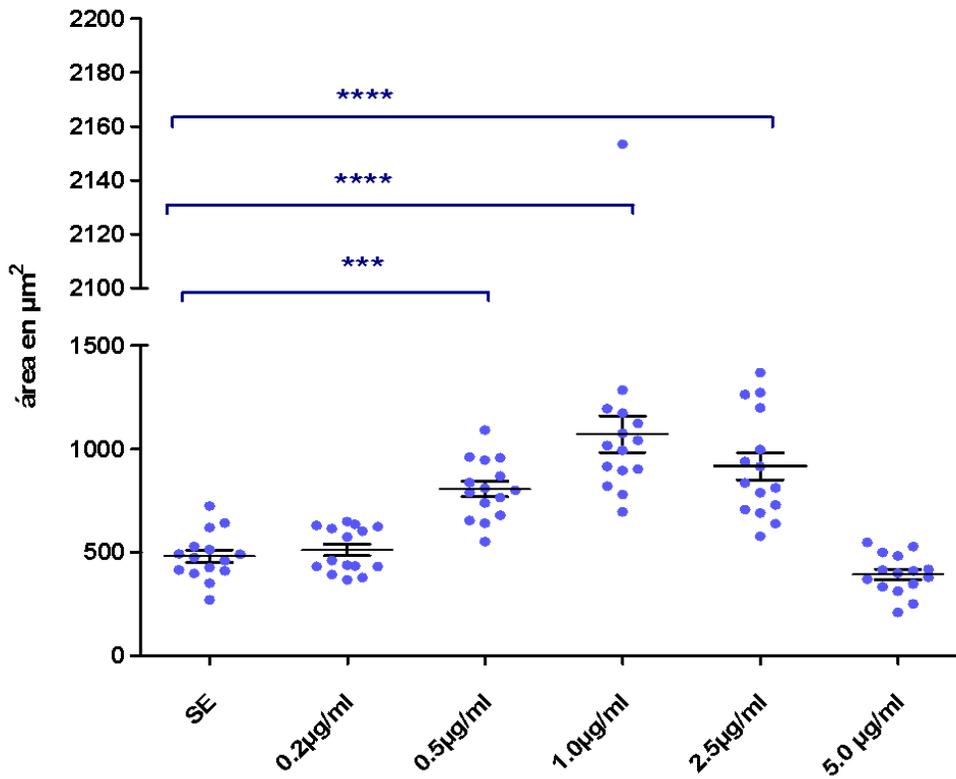


Figura 17. Análisis estadístico de área celular por cada grupo estimulado de células HeLa. La Gráfica muestra el área celular de células HeLa en μm^2 . Se midieron 15 células al azar por grupo. Para el análisis se tomó como base la escala de **50 μm** colocada por la cámara al momento de la captura, cada grupo estimulado fue comparado estadísticamente con el grupo control (SE) por medio de Análisis de varianza (ANOVA) y se encontró significancia en los grupos tratados con 0.5, 1.0 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ con una $p < 0.05$.

Curva de proliferación con anticuerpo agonista para CD95

Para evaluar la densidad celular en cada grupo se realizó el análisis de proliferación con la técnica de Cristal Violeta con el cual se corroboró el incremento en la proliferación celular en células HeLa estimuladas con 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de anti CD95 y una disminución en la densidad celular cuando las células HeLa se estimularon con concentraciones elevadas (5 $\mu\text{g/ml}$) de anti-CD95 (Figura 18).

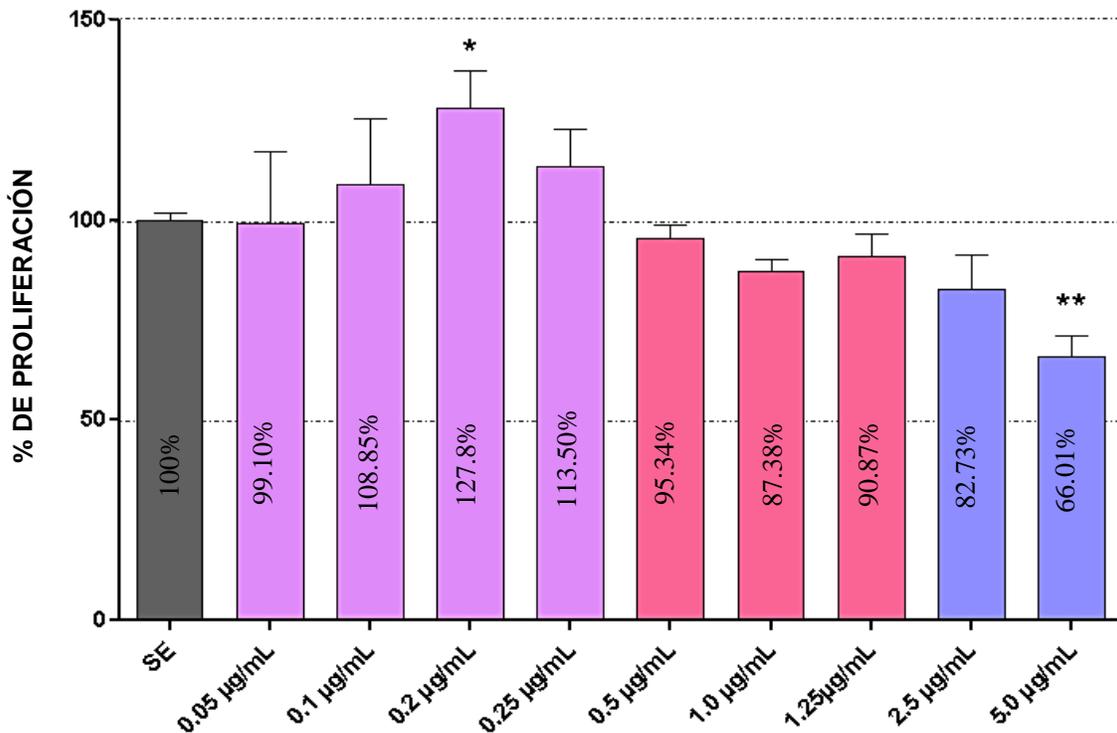


Figura 18. Gráfica de proliferación en células HeLa estimuladas con diferentes dosis de CD95 a 48H.

La gráfica muestra el comportamiento celular dependiendo de la dosis de anti-CD95 utilizada. A bajas dosis 0.1, 0.2 y 0.25 (barras en violeta) muestran un incremento proliferativo (excepto 0.05 $\mu\text{g/ml}$), en donde **0.2 $\mu\text{g/ml}$** es significativo respecto al control ($p < 0.05$). En el caso de las dosis medias 0.5, 1.0, 1.25 $\mu\text{g/ml}$ (barras en rosa) se observa que no hay incremento ni decremento en la proliferación celular, incluso se puede observar que están cerca del control. Sin embargo, a altas dosis del agonista para CD95 2.5 y 5.0 $\mu\text{g/ml}$ (barras en azul) se observa decremento, debido a la muerte celular observada a estas concentraciones en donde **5.0 $\mu\text{g/ml}$** presenta significancia ($p < 0.05$); todos los estímulos fueron comparados con el control (barra gris).

La estimulación de la vía CD95 induce acumulación de la proteína autofágica LC3B

Después de observar incremento en el tamaño de las células HeLa al estimularse con 0.5, 1.0 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y debido a que no se observaron cambios en el porcentaje de proliferación con respecto al control, ni la presencia de cuerpos apoptóticos, surgió la pregunta de sí las células podrían estar activando el proceso de autofagia. Para responder la pregunta, se evaluó por microscopía confocal la presencia de la proteína LC3B focalizada en células HeLa tratadas con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, como se puede apreciar en la figura 16, existen pequeñas acumulaciones de proteína LC3B “*focos de fluorescencia*” característicos de células en autofagia (Figura 19 C y D).

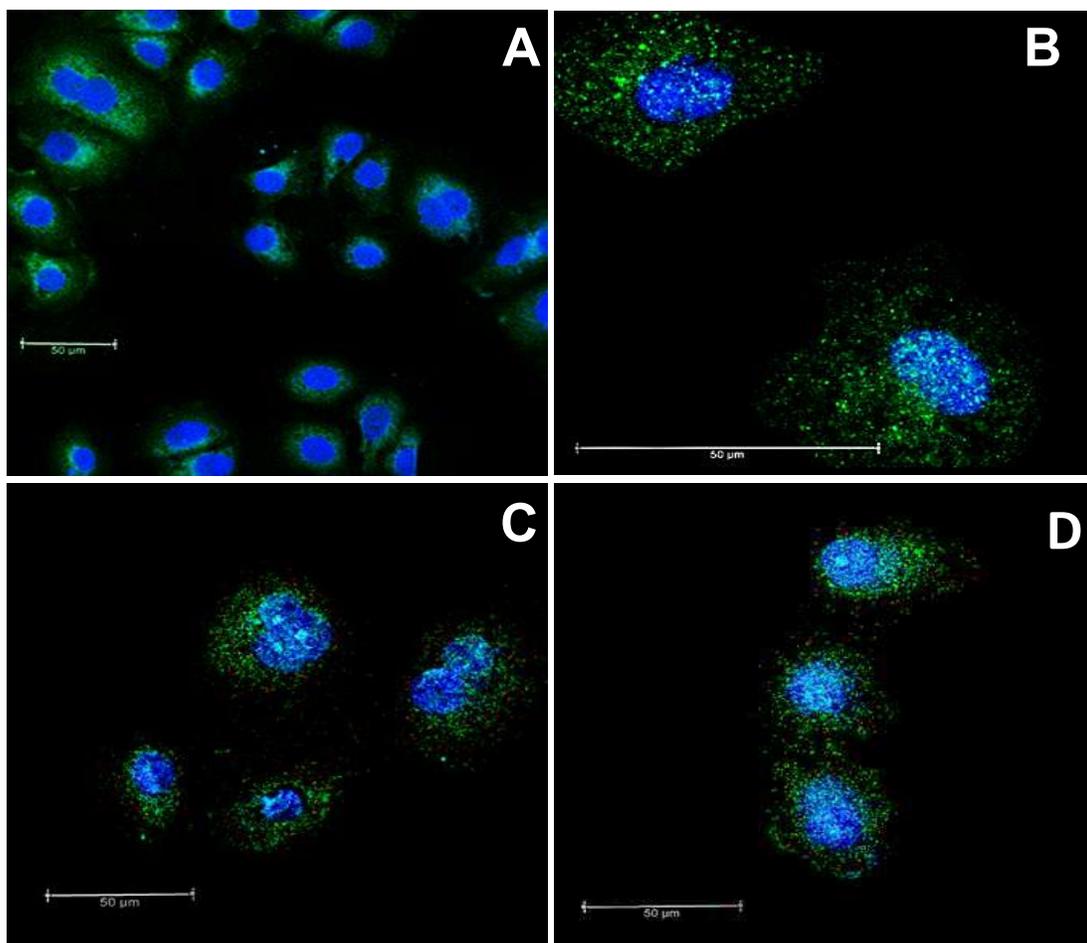
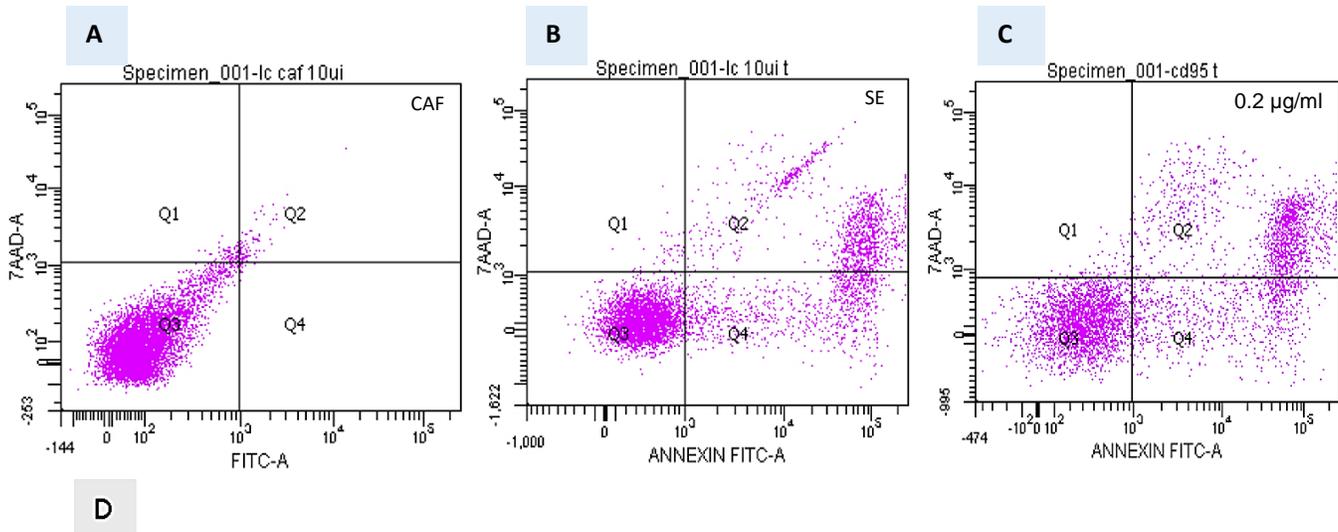


Figura 19. Células HeLa tratadas con anti CD95, evaluación de LC3B por microscopía confocal. A) Células HeLa sin estímulo **B)** Células HeLa tratadas con cisplatino [0.2 μg / mL 48H] como control positivo **C)** y **D).** Células HeLa estimuladas con CD95 [0.5 μg / mL 48H]. En las células HeLa estimuladas con cisplatino y anti CD95, se observan algunos “*focos de fluorescencia*” lo que significa que hay acumulación de la proteína LC3B. En Azul -DAPI, Verde-FITC para la proteína de autofagia LC3B y Rojo-PE-Cy7 para CD95.

La activación de la vía CD95 induce muerte en células mononucleares de sangre periférica

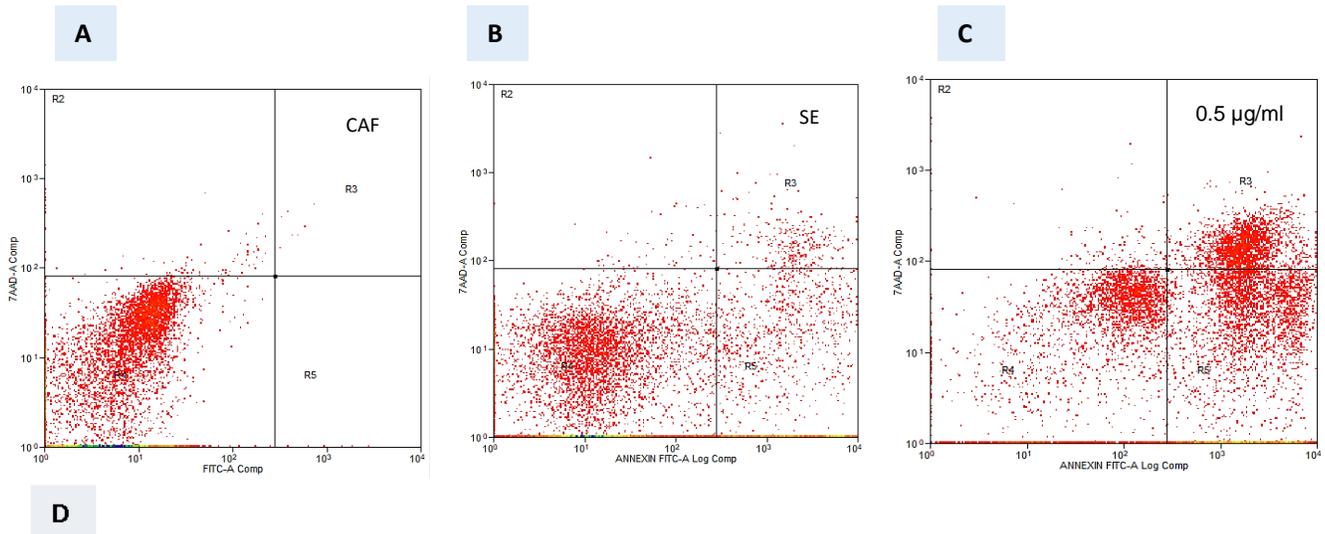
Después de observar que en células HeLa dosis de 0.2µg/ml de anti-CD95 indujeron proliferación y de 0.5 µg/ml de anti-CD95 autofagia, se decidió evaluar el efecto de estas concentraciones en células mononucleares obtenidas de sangre periférica (SP), las cuales fueron estimuladas durante 48 horas, para posteriormente evaluar el porcentaje de muerte celular por medio de citometría de flujo obteniendo los siguientes resultados (Figura 20 y 21).



| (%) Porcentaje de muerte celular | | | | |
|-----------------------------------|----|----------------|-------------------------|---------------------------|
| Condición / cuadrante | | Linfocitos CAF | Linfocitos Sin Estímulo | Linfocitos 0.2 µg/ml CD95 |
| Necrosis | Q1 | 1.3 | 2.8 | 5.5 |
| Apoptosis tardía | Q2 | 2.9 | 29.5 | 37.4 |
| Apoptosis temprana | Q4 | 0.2 | 16.6 | 21.3 |
| Células vivas | Q3 | 95.6 | 51.1 | 35.9 |

Figura 20. Evaluación de apoptosis por citometría de flujo. A) Control de auto-florescencia (CAF) B) Linfocitos sin estímulo teñidos con Anexina V/ IP con un total de apoptosis del **46.1%** C) Linfocitos tratados con **0.2 µg/ml de CD95** y teñidos con Anexina V/IP con un total de apoptosis del **58.7%** D) Tabla de porcentajes de células positivas para el marcaje de FITC conjugado con Anexina V y con Ioduro de Propidio (IP), por cada cuadrante, Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos.

Se observó que células mononucleares estimuladas con dosis de 0.2µg/ml de anti-CD95, aumentan ligeramente el porcentaje de apoptosis (12.6%) con respecto al control y el total de apoptosis (temprana y tardía) fue del 58.7% (Figura 20), mientras que, en células mononucleares estimuladas con dosis de 0.5µg/ml de anti CD95 el aumento en el número de células apoptóticas fue mayor (39.9%) con respecto al control y el total de apoptosis fue de 63.8 % como se observa en la figura 21.



| (%) Porcentaje de muerte celular | | | | |
|---|----|----------------|-------------------------|---------------------------|
| Condición / cuadrante | | Linfocitos CAF | Linfocitos Sin Estímulo | Linfocitos 0.5 µg/ml CD95 |
| Necrosis | Q1 | 0.4 | 0.5 | 1.1 |
| Apoptosis tardía | Q2 | 0.1 | 8.2 | 34.4 |
| Apoptosis temprana | Q4 | 0.0 | 15.7 | 29.4 |
| Células vivas | Q3 | 99.4 | 75.5 | 35.0 |

Figura 21. Evaluación de apoptosis por citometría de flujo. A) Control de auto-florescencia (CAF) B) Linfocitos sin estímulo teñidos con Anexina V/ IP con un total de apoptosis del **23.9%** C) Linfocitos tratados con **0.2 µg/ml de CD95** y teñidos con Anexina V/IP con un total de apoptosis del **63.8%** D) Tabla de porcentajes de células positivas para el marcaje de **FITC** conjugado con **Anexina V** y con **Ioduro de Propidio (IP)**, por cada cuadrante, Q1 representa células en necrosis; Q2 células en apoptosis tardía; Q3 células normales; Q4 células en apoptosis temprana. Los valores obtenidos son producto de 10,000 eventos.

Estos datos indican que concentraciones que inducen proliferación en células HeLa (0.2µg/ml de anti-CD95) inducen apoptosis en un pequeño porcentaje de células mononucleares, y que concentraciones que inducen autofagia en células HeLa (0.5µg/ml de anti CD95) inducen apoptosis en alto porcentaje de células mononucleares (39.9%).

Altas dosis de IL-2 inhiben la proliferación inducida por CD95 en células HeLa

Después de establecer el efecto anti-proliferativo de 100UI/ml de IL-2 en células HeLa y la inducción de proliferación en las mismas con bajas dosis del anticuerpo agonista para CD95, se determinó el efecto del estímulo de forma simultánea y escalonada sobre la proliferación celular. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes graficas a 48 y 96 horas (Figura 22, 23 y 24).

Se observa que a 48 horas 100UI de IL-2 disminuyen la proliferación, 0.2µg/ml de anti-CD95 inducen proliferación y el tratamiento simultaneo de 0.2µg/ml de anti-CD95 más 100UI de IL-2 disminuyen significativamente la proliferación de células HeLa. Los resultados muestran que es mayor el efecto inhibitor de la IL-2 a 96 horas como se observa en la figura 23 y 24, la IL-2 inhibe la proliferación inducida por la activación de la vía CD95 con mayor eficiencia.

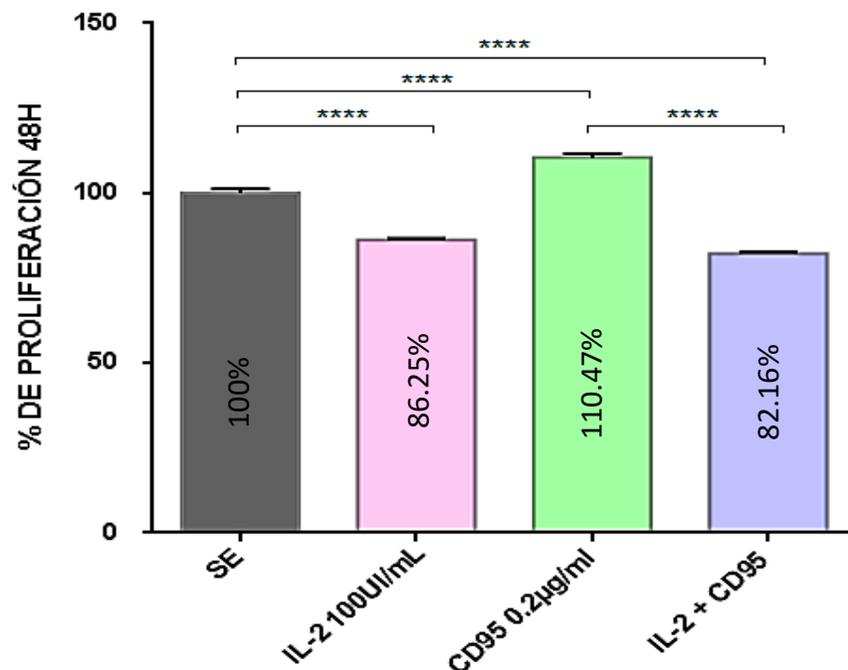


Figura 22. Gráfica de proliferación en células HeLa después de 48 horas de tratamiento con 100UI/ml más CD95. Se muestra el comportamiento celular al estimular simultáneamente células HeLa. La barra gris representa las células control (SE). La barra rosa muestra los resultados obtenidos con 100UI/ml se observa una disminución de la proliferación de **13.75%** respecto al control lo cual resultó significativo ($p < 0.05$). La barra verde representa las células estimuladas con 0.2 µg/ml de CD95, se encontró significancia con incremento en la proliferación del **10.4%** respecto al control. Finalmente, la barra en azul representa el grupo tratado con ambos estímulos simultáneamente 100UI/ml de IL-2 más 0.2 µg/ml de CD95 lo que resultó significativo con una disminución de la proliferación del **17.84%** respecto al control y del **28.31%** respecto al grupo estimulado con 0.2 µg/ml de CD95 ($p < 0.05$).

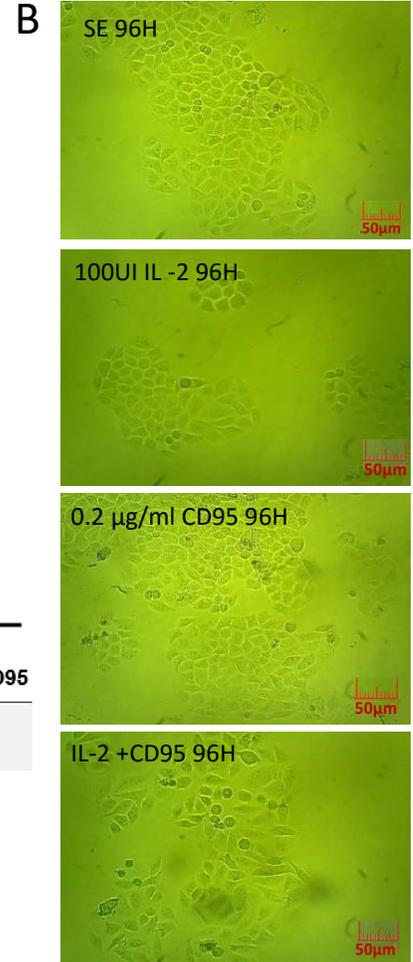
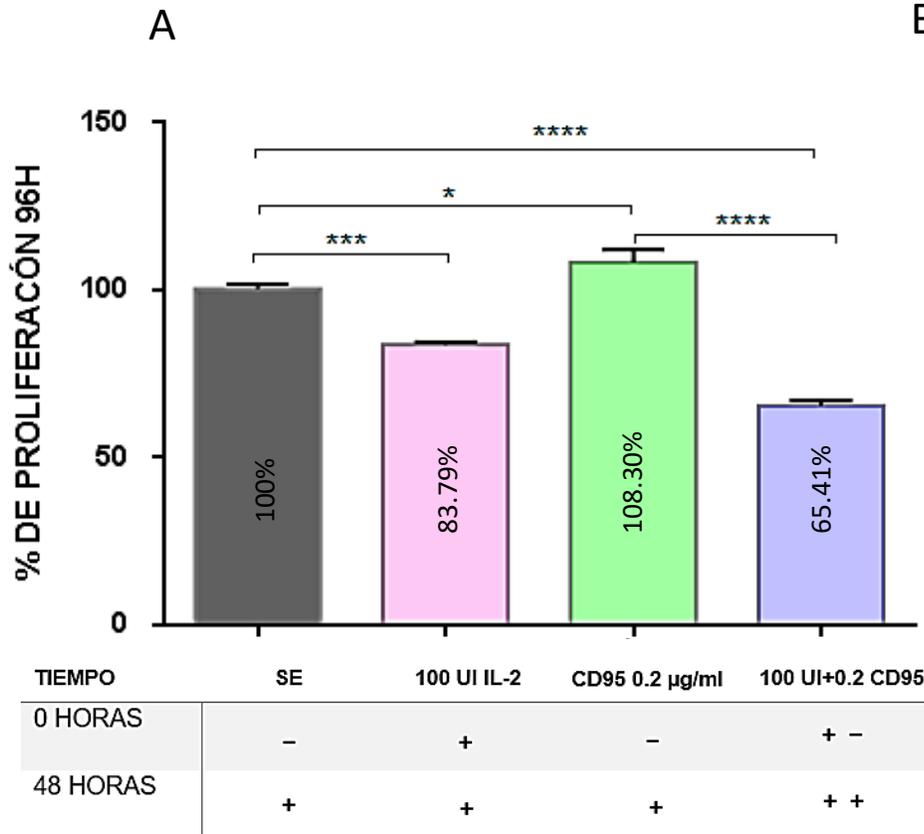


Figura 23. Gráfica de proliferación en células HeLa después de 96 horas de tratamiento con 100UI/ml más CD95. Se muestra el comportamiento celular al estimular simultáneamente células HeLa. La barra gris representa las células control (SE). La barra rosa muestra los resultados obtenidos con 100UI/ml después de 96 horas, se observa una disminución de la proliferación de **16.21%** respecto al control lo cual resultó significativo ($p < 0.05$). La barra verde representa las células estimuladas con 0.2 µg/ml de CD95, se encontró significancia con incremento en la proliferación del **8.30%** respecto al control. Finalmente, la barra en azul representa el grupo tratado con ambos estímulos simultáneamente 100UI/ml de IL-2 más 0.2 µg/ml de CD95 lo que resultó significativo con una disminución de la proliferación del **34.59%** respecto al control y del **42.89%** respecto al grupo estimulado con 0.2 µg/ml de CD95 ($p < 0.05$). **B.** Fotografías de células HeLa estimuladas con 100UI de IL-2, 0.2 µg/ml de CD95 y estimulación simultánea a 96 horas (campo claro objetivo 10X) se observa claramente la disminución proliferativa al estimular simultáneamente, sin embargo, no se observan cuerpos apoptóticos, pero sí un incremento en área celular.

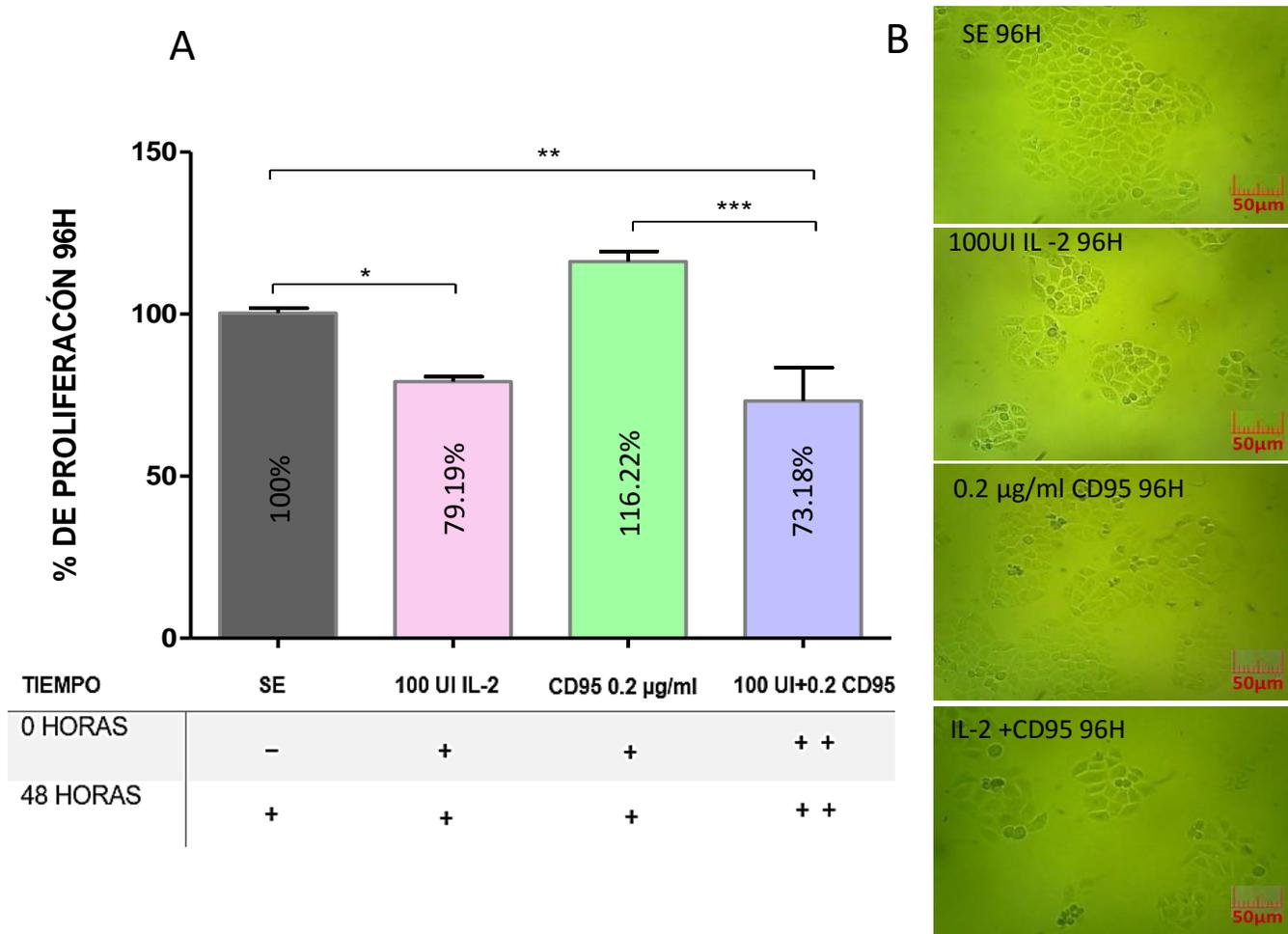


Figura 24. Gráfica de proliferación en células HeLa después de 96 horas de tratamiento con 100UI/ml más CD95. A. Se muestra el comportamiento celular al estimular simultáneamente células HeLa. La barra gris representa las células control (SE). La barra rosa muestra los resultados obtenidos con 100UI/ml después de 96 horas, se observa una disminución de la proliferación de **20.81%** respecto al control lo cual resultó significativo ($p < 0.05$). La barra verde representa las células estimuladas con 0.2 µg/ml de CD95, se encontró significancia con incremento en la proliferación del **8.30%** respecto al control. Finalmente, la barra en azul representa el grupo tratado con ambos estímulos simultáneamente 100UI/ml de IL-2 más 0.2 µg/ml de CD95 lo que resultó significativo con una disminución de la proliferación del **26.82%** respecto al control y del **43.04%** respecto al grupo estimulado con 0.2 µg/ml de CD95 ($p < 0.05$) **B.** Fotografías de células HeLa estimuladas con 100UI de IL-2, 0.2 µg/ml de CD95 y estimulación simultánea a 96 horas (campo claro objetivo 10X) se observa claramente la disminución proliferativa al estimular simultáneamente, sin embargo no se observan cuerpos apoptóticos pero sí incremento en área celular.

DISCUSIÓN

Las células tumorales son capaces de utilizar diferentes citocinas y ligandos para favorecer su supervivencia y/o crecimiento a través de diferentes vías de señalización. Una sobreactivación de estas vías puede desencadenar procesos en la regulación de proliferación, diferenciación e incluso la muerte celular. Bajo este contexto, antecedentes del grupo de trabajo muestran que bajas dosis de la citocina IL-2 favorece la proliferación de células de cáncer cervicouterino mientras que altas dosis disminuyen la proliferación de estas células, lo cual sugiere que la IL-2 juega un papel importante en el crecimiento tumoral (Alvarado MJ, 1997; Valle-Mendiola *et al.*, 2016). Resultados de Lagunas C *et al.*, 2019, muestran que esta disminución en la proliferación celular se debe a un arresto en el ciclo celular en la fase G1 y este arresto no culmina en senescencia o muerte celular.

Además, la resistencia de células de CaCu a la inducción de muerte celular está ampliamente reportada, datos previos de nuestro grupo de trabajo, muestran la presencia de uno de los receptores de muerte celular más importantes y representativos dentro del sistema inmune Fas (CD95) sobre la superficie de las células tumorales (Gutiérrez-Hoya *et al.*, 2019). Estudios recientes describen la importancia de la activación de las vías de señalización para IL-2 y CD95 en diversas células tumorales de forma individual, sin embargo, si se analizan detalladamente, estas dos vías pueden tener puntos de convergencia que derivan en activación de la proliferación, supervivencia y migración de células cancerígenas, a través de cascadas de señalización en donde intervienen las MAP cinasas, PI3K, AKT y NF- κ B (Boyman O., 2012; Martín-Villalba *et al.*, 2013).

La estimulación celular vía CD95 e IL-2 pueden tener diversos efectos dependientes de la estirpe celular y de concentración, por ejemplo, la activación de la vía CD95 en células de cáncer de mama (MCF7), células de cáncer renal (CAKI-1) y en células de adenocarcinoma ductal pancreático conduce a supervivencia celular contraponiéndose con su papel natural como inductor de apoptosis (Chen L *et al.*, 2010; Teodorczyk M. 2015). Por otro lado, la activación vía IL-2 por medio de su receptor de media y alta afinidad ha sido descrito en células de las líneas de cáncer cervicouterino CALO e INBL (VPH18+) jugando un papel crucial en la supervivencia y proliferación de estas células (Zavaleta RL. *et al.*, 2004). Por lo anterior, se decidió evaluar si pueden existir efectos antagónicos o sinérgicos entre las cascadas de señalización inducidas

por la IL-2 y el receptor apoptótico Fas (CD95). El análisis de estas vías representa un punto clave para una mejor comprensión de la biología de las células de cáncer cervicouterino.

El primer punto que se evaluó fue el tratamiento de altas dosis de IL-2 (100UI/mL) sobre diferentes líneas de CaCu, comparando la respuesta entre líneas positivas y negativas para VPH. Como se puede observar en la [figura 14](#), para las células HeLa se obtuvo una disminución del 12.8%, para INBL 35.3%, HER3+ 36.2%, Caski 34.9%, 31.1% y para la línea C33A un 26.4% por lo que, existe disminución en la proliferación celular de manera significativa en todas las líneas celulares independientemente del tipo de VPH que se encuentra incorporado, incluyendo la línea C33A negativa para VPH.

Estos resultados son consistentes con los reportados por [Valle-Mendiola y colaboradores \(2014\)](#), donde observan que líneas celulares VPH18+ (Calo e INBL) disminuyen su proliferación al ser tratadas con altas dosis de IL-2 (100UI/mL). Estudios posteriores de nuestro grupo de trabajo dilucidaron que esta disminución se debe a un arresto transitorio del ciclo celular en la fase G1. Es importante destacar que nuestros resultados muestran que no solo las células VPH18+ disminuyen su proliferación, si no que células VPH16+ o negativas para VPH también lo hacen.

Hasta el momento, se desconoce si el tratamiento con 100UI IL-2 podría incrementar la susceptibilidad de estas células a activar la apoptosis en respuesta a otro tratamiento, ya que, a estas concentraciones de IL-2 la detención del ciclo celular parece ser transitoria y no induce muerte celular por apoptosis. Bajo este contexto datos del grupo de trabajo muestran la expresión de CD95 en líneas celulares de CaCu ([Gutierrez-Hoya et al., 2019](#)), lo cual nos llevó a hacer más extensa la determinación de dicho receptor para esclarecer si la presencia de CD95 podría inducir a las células a muerte por apoptosis. Recientemente, se demostró que el tratamiento con 100 UI de IL-2 induce apoptosis en las líneas de cáncer cervicouterino CALO e INBL ([Corioriles-Torres, 2019](#)) lo cual difiere de los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo para las células cervicouterino HeLa. Esta diferencia podría deberse a las condiciones experimentales del cultivo celular y de las técnicas utilizadas para el análisis del proceso de muerte celular.

Al determinar la expresión de CD95 en células de cáncer cervicouterino, se observó que todas las líneas de CaCu VPH positivas, expresan alto porcentaje de CD95 extracelular (80-90%). Sin embargo, las células VPH negativas (C33A), expresan un pequeño porcentaje de esta molécula en su superficie (5 a 16%). Debido a que el porcentaje de células C33A (VPH⁻)

fluctuaba dependiendo de la confluencia celular o del tiempo de manipulación, se pensó en la probabilidad de que estas células presentaran el receptor CD95 de forma intracelular; motivo por el cual, se analizó la expresión de éste permeabilizando a las células. Los resultados indican que todas las líneas celulares son positivas para CD95 de forma intracelular, incluyendo, las células C33A con un alto porcentaje (73%). El mecanismo por el cual las células C33A evitan la expresión de CD95 extracelular es desconocido, sin embargo, probablemente es parte de su mecanismo de evasión del sistema inmune e inducción de apoptosis. Estos resultados destacan la importancia del virus del papiloma humano en el cáncer cervicouterino y su posible relación con el receptor CD95. Cabe destacar que las células SiHa VPH16⁺ resultaron positivas en casi un 100 % al receptor de muerte FAS.

Filippova. M y colaboradores (2004), enfatizan la relevancia de la proteína E6 del VPH16, al unirse al dominio de muerte asociado a Fas (FADD). Sus resultados muestran que al estar unida la proteína E6 del VPH al dominio de muerte, ésta bloquea la vía apoptótica, e incluso puede estar degradando a FADD y con esto forzando a desviar la vía hacia alguna ruta de sobrevivencia. Esta idea es de relevancia si se compara con el comportamiento de otros virus que han desarrollado estrategias específicas para inhibir o bloquear a Fas, tal es el caso de algunos códigos de adenovirus que forman el complejo llamado RID, éste a su vez media la rápida internalización y degradación de Fas desde la superficie celular. Otro ejemplo cercano es el virus del herpes simplex (VHS) en donde la subunidad R1 previene la activación de caspasa 8 inducida por Fas (Bertin, J *et al.*, 1997; Holzenburg, A., & Bogner, 2002) a diferentes niveles para muchos virus; Fas es un blanco primordial, por lo que para el VPH no es la excepción. Probablemente la proteína E6 de los VPH 18 también pueda llevar a cabo el mismo papel, confiriendo resistencia a la activación de la vía y como consecuencia al desarrollo de apoptosis, pero esto aún no se encuentra reportado.

La expresión de CD95 en diversas células tumorales se encuentra ampliamente descrito (Chen L *et al.*, 2010; Qadir SA *et al.*, 2017), sin embargo, no se había realizado algún estudio para células de cáncer cérvico uterino, de ahí la relevancia del presente estudio. Publicaciones recientes en células tumorales sugieren la activación de la vía CD95 en un contexto no apoptótico por medio de nuevas vías de señalización (Martin-Villalba *et al.*, 2013). Teodorczyk M y colaboradores (2015), muestran la activación de la vía no canónica de CD95 implicada en la capacidad metastásica vía Sck en células de adenocarcinoma ductal pancreático (PANC-1) En otro estudio Chen L y colaboradores (2010) destacan la importancia del receptor CD95 y su

ligando (CD95L) en el crecimiento, proliferación e incluso angiogénesis de células tumorales, los resultados fueron obtenidos a través de líneas de cáncer renal (CAKI-1), cáncer hepático (HepG2), cáncer de mama (MCF7) ovario (SCOV3) y colon (HCT116) y sugieren que la actividad tumoral de CD95 podría involucrar la vía JNK- Jun.

Tomando en cuenta lo anterior analizamos la activación de la vía Fas (CD95) en células HeLa VPH18⁺ utilizando un anticuerpo agonista anti-CD95 de la clona DX2, con base en lo publicado por [Komada y colaboradores en 1999](#), donde utilizan células leucémicas tratadas con diferentes anticuerpos agonistas para CD95 en concentraciones de 1 µg/ml; los resultados muestran que las clonas con mayor efectividad son DX2 y CH11. Este antecedente fue de gran ayuda para establecer la concentración y tiempo de estímulo de la vía CD95. Para fines prácticos y de entendimiento en este trabajo, denominamos “bajas dosis” a cantidades menores a 1 µg/ml, “dosis medias” a concentraciones cercanas a 1 µg/ml y “altas dosis” a cantidades mayores a 1 µg/ml.

Como se puede observar en la gráfica de la [figura 18](#), la respuesta de las células HeLa (VPH 18⁺) frente a la activación de la vía CD95 es diferencial. Bajas dosis (0.1-0.2 µg/ml) del anticuerpo agonista para la vía CD95 induce proliferación celular de manera significativa, el tratamiento con dosis medias del anticuerpo agonista CD95 (0.5, 1.0 y 1.25 µg/ml) no muestra cambios en la proliferación celular con respecto al control y finalmente, se necesitan dosis muy elevadas (5 µg/ml) para disminuir la proliferación celular en apenas un 34%.

La inducción de proliferación en células HeLa cuando son tratadas con bajas dosis del anticuerpo agonista anti CD95, posiblemente se debe a la activación de la vía no canónica de CD95. Como se ha mencionado anteriormente, dentro de las funciones no apoptóticas de CD95 está el acoplamiento a múltiples vías de señalización que involucran a Src, PI3K, MAP cinasas, NF-κB ([Boyman O, 2012](#); [Sancho M. et al., 2009](#)). Recientemente se ha implicado también la activación de STAT-1 mediante la estimulación a largo plazo de CD95 induciendo la proliferación de células progenitoras tumorales ([Qadir SA. et al., 2017](#)).

Otro reporte relevante sobre el papel de CD95 está relacionado a su estructura, ya que se describe la presencia del dominio SH2 que se une a residuos de tirosina. Las bajas concentraciones de agonista para CD95, podrían estar induciendo fosforilación a nivel del propio receptor o de procaspasa 8, ya que en recientes estudios se ha demostrado que la Tyr 291 presente en el dominio de muerte CD95 sufre fosforilación tras la activación del receptor en células tumorales.

Además, la caspasa-8 también contiene un motivo de unión similar a SH2 (YXXM) (Teodorczyk M, *et al.*, 2015), existen reportes de la importancia de Tyr 380 de procaspasa 8 que al ser fosforilada impide la proteólisis de la misma y ésta puede ser reclutada por Src activando así a PI3K y ERK, claros inductores de proliferación celular (Barbero S. *et al.*, 2008; Kleber S, *et al.*, 2008; Sancho M *et al.*, 2009).

Por otro lado, observamos que el tratamiento con dosis medias del anticuerpo agonista para CD95 (0.5, 1.0 y 1.25 µg/ml), no resulta en aumento o disminución de la proliferación, pero tampoco activa la vía apoptótica, incluso con 1.0 µg/ml como se ha reportado para células leucémicas (Komada Y. *et al.*, 1999) Como podemos apreciar en la [figura 16](#), el tratamiento con estas concentraciones indujo cambios morfológicos, las células se visualizan más grandes, con algunas prolongaciones e incluso se puede ver acumulación de células, en las cuales no se distingue con claridad la separación entre las células.

Lo anterior nos llevó a pensar en algún otro mecanismo de resistencia a la muerte. Una de las vías que de manera reciente despertó interés como mecanismo de evasión de muerte en células tumorales, es la activación de la autofagia, que a su vez puede ser subdividida en micro-autofagia y macro-autofagia (Choi K, 2012; Aredia F, 2012; Costas MA & Rubio MF, 2017). Este proceso puede ser desencadenado por diferentes factores como la falta de nutrientes y oxígeno al interior de la masa tumoral; además existen recientes reportes que indican que tratamientos quimioterapéuticos también pueden inducir la activación de la vía autofagica, por ejemplo, el tratamiento de células HeLa con cisplatino induce la activación de esta vía (Lin, W. M., & Li, Z. G. 2015).

Al contar con estos antecedentes y observar el comportamiento de nuestras células decidimos evaluar la presencia de focos de fluorescencia positivos para LC3B, lo cual se llevó a cabo por medio de microscopía confocal. Como se observa en la [figura 19](#), tanto en el control positivo (células tratadas con cisplatino) como en células HeLa tratadas con 0.5 µg/ml del anticuerpo anti-CD95, se aprecia acumulación de LC3B, lo cual sugiere la formación de focos de fluorescencia. Estos resultados indican la activación de la vía autofagica en células de cáncer cervicouterino en respuesta a la activación de la vía CD95, lo cual es consistente con resultados de Zhang Y y colaboradores (2008), en donde demuestran que la activación de la vía Fas (CD95) puede desencadenar autofagia de forma dependiente de las JNK (Zhang Y, *et al.*, 2008).

Finalmente, cuando se utilizaron altas dosis de anti-CD95 (2.5 y 5.0 $\mu\text{g/ml}$), se logró activar la vía apoptótica en un bajo porcentaje (34%). A estas concentraciones se pueden visualizar características típicas de la muerte celular por apoptosis como son, la deshidratación celular, condensación del citoplasma, cambios en la forma y el tamaño que pueden ser fácilmente distinguidos con microscopia óptica convencional y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos (Prado MD *et al.*, 1997). Sin embargo, es importante destacar que estas concentraciones son muy altas y biológicamente no podrían encontrarse presentes.

Una vez que se determinó el efecto de diferentes concentraciones del anticuerpo agonista anti-CD95 sobre las células tumorales HeLa (VPH18⁺), se evaluó el efecto de estas dosis sobre células del sistema inmune de donadores sanos. Para esto utilizamos células mononucleares de sangre periférica que fueron estimuladas con dosis que en las células tumorales inducían proliferación (0.2 $\mu\text{g/ml}$), como se puede observar en la [figura 20](#), tras la estimulación de la vía CD95 en células mononucleares se observó un incremento en la apoptosis del 12.6% con respecto al control y cuando se estimularon con dosis medias (0.5 $\mu\text{g/ml}$) en donde inducían autofagia en células tumorales, las células normales incrementaron el porcentaje de apoptosis en un 39.9% con respecto al control [figura 21](#). Estos resultados indican que en un contexto en el cual existan células tumorales y células del sistema inmune (SI), la activación de la vía CD95 induciría proliferación en las células tumorales y muerte en un pequeño porcentaje de las células del sistema inmune. Por el contrario, la activación de la vía CD95 con dosis más elevadas (0.5 $\mu\text{g/ml}$) afectaría en mayor medida a las células del SI induciéndoles apoptosis, mientras que las células tumorales activarían el proceso de autofagia para evitar la muerte celular.

Lo anterior es congruente con antecedentes que muestran que las células tumorales son capaces de secretar al ligando de CD95 (Barnhart BC *et al.*, 2004), lo que podría servirles como un mecanismo autocrino para promover su proliferación. Sin embargo, la sobre activación de diferentes vías de señalización no solo puede desencadenar la muerte celular programada sino también puede tener efecto sobre el ciclo celular. Tal como sucede con la estimulación a bajas dosis de IL-2 que inducen la proliferación celular. Sin embargo, altas dosis inducen la detención del ciclo celular, pero desconocemos si esta estimulación previa sensibilice a las células para desencadenar la muerte celular de forma más eficiente y si el tratamiento con la IL-2 pueda inhibir la proliferación inducida por la activación de la vía CD95.

Bajo este esquema, analizamos el efecto de estímulos simultáneos y escalonados con altas dosis de IL-2 más la estimulación vía CD95. Como se observa en las [figuras 22, 23 y 24](#), cuando se estimuló de manera simultánea con 100UI de IL-2 más 0.1 del anticuerpo CD95, se inhibió la proliferación inducida por la activación de la vía CD95 y cuando las células tumorales son estimuladas previamente con altas dosis de IL-2 durante 48H, la activación de la vía CD95 a bajas dosis tampoco logra inducir su efecto proliferativo. Estos datos indican que la estimulación de las vías CD95 e IL-2/IL-2R podrían estar activando cascadas de señalización simultáneas o que podría existir comunicación cruzada “crosstalk” entre ambas. Además, las células tumorales podrían responder a la estimulación vía CD95 e IL-2/IL-2R, deteniendo el ciclo celular o activando la vía apoptótica, se requieren estudios posteriores para analizar esta posibilidad.

CONCLUSIONES

- Al realizar la comparación de nuestros resultados con publicaciones previas, confirmamos que líneas de cáncer cervicouterino VPH 18⁺, VPH16⁺ y negativas para VPH, disminuyen significativamente su proliferación al ser cultivadas por 48 horas con 100UI/mL de IL-2.
- Las líneas celulares positivas para VPH expresan el receptor CD95 intra y extracelular, sin embargo, la línea C33A negativa para VPH lo expresa únicamente de forma intracelular.
- Al ser activada la vía CD95 con su agonista, se observa un comportamiento dosis dependiente, ya que con bajas dosis las células incrementan su proliferación, a dosis medias muestran características propias de autofagia y a altas dosis las células logran activar la vía apoptótica.
- El anticuerpo agonista para CD95 (DX2) induce apoptosis en células mononucleares a dosis en las que en células de CaCu (HeLa) induce proliferación y autofagia.
- El estímulo simultáneo IL-2 más CD95, arrojó que 100UI/mL de IL-2 disminuye la proliferación inducida por el anticuerpo agonista para la vía CD95 (DX2).

PERSPECTIVAS

- Realizar un análisis comparativo de la respuesta en células HeLa al anticuerpo agonista CH11 con respecto a la clona DX2.
- Evaluar muerte celular por apoptosis en células estimuladas de manera simultánea con 100UI/mL de IL-2 y el anticuerpo agonista para CD95 (DX2).
- Analizar genes y/o proteínas que definan a mayor profundidad la inducción de autofagia al ser estimuladas con anti-CD95 (DX2 o CH11).

REFERENCIAS

1. Aguilar-Lemarroy, A., Kirchhoff, S., Whitaker, N., Gariglio, P., zur Hausen, H., Krammer, P. H., & Rösl, F. (2001). Differential sensitivity of human papillomavirus type 16+ and type 18+ cervical carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis. *International Journal of Cancer*, 93(6), 823-831.
2. Aguilar-Solis E. (2014). Dilucidación de la vía apoptótica ejercida por IL-2 en líneas celulares de carcinoma de cérvix CALO e INBL. Tesis de licenciatura. UNAM; FES Zaragoza.
3. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. (2006) *Introducción a la biología celular*, 2a edición, Editorial Médica Panamericana, México, pp.740
4. Alvarado M.J (1997). Presencia de la cadena alfa y beta del receptor para IL-2 en células de carcinoma de cérvix y el efecto proliferativo inducido por IL.2 en estas células tumorales: un posible mecanismo de escape inmunológico, Tesis de licenciatura. UNAM; FES Zaragoza.
5. Aredia F, Guamán L.M, Giansanti V, Scovassi I. (2012) Autophagy and cancer. *Cells*; 1: 520-534.
6. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
7. Barbero, S., Barilà, D., Mielgo, A., Stagni, V., Clair, K., & Stupack, D. (2008). Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13031-13034.
8. Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G., & Peter, M. E. (2004). CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal*, 23(15), 3175-3185.
9. Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., ... & Lenardo, M. J. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas-and TNFR1-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1172-1176.
10. Boyman O & Sprent J. (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev. Immunol.* 17;12(3):180-90.
11. Chabner Bruce A, Lynch Thomas J. Longo Dan L. (2008) Harrison Manual de Oncología. Traducción de primera edición, Ed. Mc Graw Hill. Capítulo15. 96-98.
12. Chen, L., Park, S. M., Tumanov, A. V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., ... & Peter, M. E. (2010). CD95 promotes tumour growth. *Nature*, 465(7297), 492.
13. Choi, K. S. (2012). Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine*, 44(2), 109.
14. Concha, M. (2007). Diagnóstico y terapia del virus papiloma humano. *Revista chilena de infectología*, 24(3), 209-214.
15. Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res.* 2009;88(4):307-17.

16. Costas MA & Rubio MF (2017) Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Vol 77: 314-320.
17. Elinos-Báez, C. M., Maldonado, V., & Zajgla, J. M. (2003) Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*, 139(5), 493-499.
18. Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., & McMillan, N. A. (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of virology*, 71(3), 2449-2456.
19. Feldmann, M. (2008) Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *The Journal of clinical investigation*, 118(11), 3533-3536.
20. Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002) Formación continuada del médico práctico: estructura y función de las citocinas. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 39(2), 63-71.
21. Filippova, M., Parkhurst, L., & Duerksen-Hughes, P. J. (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25729-25744.
22. Fothergill, T., & McMillan, N. A. (2006). Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology*, 352(2), 319-328.
23. Fuster Garcia M.J. (2005), La vía de señalización del receptor apoptótico en la adición a opiáceo. Tesis de Doctorado. Universitat de Barcelona, Departamento de Bioquímica.
24. García, P. J. (2007) Que hay en el horizonte sobre el virus del papiloma humano, vacunas y el control del cáncer. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 24(3), 272-279.
25. Garza Salazar J.G y Juárez Sánchez P. 2014. El Cáncer, Universidad Autónoma de Nuevo León, Primera edición 23-31pp.
26. Guicciardi M.E, Gores G (2005), The Fas / FasL signaling pathway in liver diseases. Berlin; Springer.
27. Gupta, S. (2000) Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *Journal of clinical immunology*, 20(4), 229-239.
28. Gutiérrez-Hoya, A., Zerecero-Carreón, O., Valle-Mendiola, A., Moreno-Lafont, M., López-Santiago, R., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz I. (2019). Cervical Cancer Cells Express Markers Associated with Immunosurveillance. *Journal of Immunology Research*. 2019.
29. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
30. Holzenburg, A., & Bogner, E. (Eds.). (2002). *Structure-function Relationships of Human Pathogenic Viruses*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
31. Hsieh, Y. J., Chien, K. Y., Lin, S. Y., Sabu, S., Hsu, R. M., Chi, L. M., ... & Yu, J. S. (2012) Photofrin binds to procaspase-3 and mediates photodynamic treatment-triggered methionine oxidation and inactivation of procaspase-3. *Cell death & disease*, 3(7), e347.

32. Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., & Fesik, S. W. (1996) NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature*, 384(6610), 638.
33. Institute for health Metrix and Evaluation of the University of Washington (2016).
34. Instituto Nacional del Cáncer, Departamento de salud (2015).
35. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A. I., Yonehara, M., Mizushima, S. I., Sameshima, M., ... & Nagata, S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66(2), 233-243.
36. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
37. Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., ... & Schreglmann, N. (2008). Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer cell*, 13(3), 235-248.
38. Komada, Y., Inaba, H., Li, Q. S., Azuma, E., Zhou, Y. W., Yamamoto, H., & Sakurai, M. (1999) Epitopes and functional responses defined by a panel of anti-Fas (CD95) monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 18(5), 391-398.
39. Lagunas-Cruz, M. D. C., Valle-Mendiola, A., Trejo-Huerta, J., Rocha-Zavaleta, L., de Lourdes Mora-García, M., Gutiérrez-Hoya, A., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz I. (2019). IL-2 induces transient arrest in the G1 phase to protect cervical cancer cells from entering apoptosis. *Submitted to Journal of Oncology*.
40. Lambert, C., Landau, A. M., & Desbarats, J. (2003) Fas—beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis*, 8(6), 551-562.
41. Lin, W. M., & Li, Z. G. (2015). Blockage of cisplatin-induced autophagy sensitizes cervical cancer cells to cisplatin. *Genet Mol Res*, 14(4), 16905-16912.
42. Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., & Contreras-Paredes, A. (2009) Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*, 4, 205-16.
43. Manzoor MK. (2008). Inmunopharmacology. Primera edición. Editorial Espringer USA. 61pp
44. Martin-Villalba, A., Llorens-Bobadilla, E., & Wollny, D. (2013). CD95 in cancer: tool or target? *Trends in molecular medicine*, 19(6), 329-335.
45. Modis Y, Trus BL and Harrison SC, (2002). Atomic model of the papilomavirus capsid. *EMBO J*. 21:4754-62.
46. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456 (1995)
47. Nagata S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33: 29-55
48. Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud, (2016) Control Integral del Cáncer Cervicouterino, Guía de prácticas esenciales. Segunda Edición. Washington.
49. Organización Mundial de la Salud, Control Integral del Cáncer Cérvico Uterino (2012 -2018)
50. Pardo F (1998) Anatomía patología general y especial de las neoplasias, editorial Científico-Médico, España, 335pp.

51. Peter ME., Hadji., A., AE Murmann AE., Brockway S., Putzbach W., Pattanayak A and Ceppi P (2015) The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death and Differentiation* vol.22, 549–559.
52. Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., & Ceppi, P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell death and differentiation*, 22(4), 549.
53. Prado, M. D. C. A., Fernández, L. L., Román, T. D., & García, M. E. F. (1997). La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol*, 13(2), 126-134.
54. Qadir, A. S., Ceppi, P., Brockway, S., Law, C., Mu, L., Khodarev, N. N., ... & Chen, Z. (2017). CD95/Fas increases stemness in cancer cells by inducing a STAT1-dependent type I interferon response. *Cell reports*, 18(10), 2373-2386.
55. Ramírez, P. A., Vega, N. A., & Robles, R. G. (2009). Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(1), 83.
56. Rebollo. A y Silva A. (1994). Estructura y función del receptor IL-2. Centro de investigaciones biológicas. Madrid- España. Vol. 13, Num.2.
57. Richard ML, Nigel K, Michael JL, (2001) The TNF and TNF Receptor Superfamilies. Vol.104 pp487-501.
58. Rocha-Zavaleta, L., Huitron, C., Cacéres-Cortés, J. R., Alvarado-Moreno, J. A., Valle-Mendiola, A., Soto-Cruz, I., ... & Rangel-Corona, R. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor- $\beta\gamma$ signalling is activated by c-Kit in the absence of IL-2, or by exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cellular signalling*, 16(11), 1239-1247.
59. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM. (1985). Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313: 1485-92.
60. Safa A.R (2012) c-Flip a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncologic*. 34 (3): 176-184.
61. Sancho-Martinez, I., & Martin-Villalba, A. (2009). Tyrosine phosphorylation and CD95: a Fascinating switch. *Cell cycle*, 8(6), 838-842.
62. Santos-López G, Márquez-Domínguez L, Reyes-Leyva J y Vallejo-Ruiza V.(2015) Aspectos generales de la estructura, clasificación y la replicación del Virus del Papiloma Humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53 Supl 2:S166-71
63. Schneider P, Bodmer JL, Holler N, Mattmann C, Scuderi P, Terskikh A, Peitsch MC, Tschopp J. (1997) Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *Biol Chem*. Jul 25;272(30):18827-33
64. Schneider P, Holler N, Bodner J.L, Hahne M, Freik, Fontana A, Tschupp J. (1998). Conversion of membrane bound Fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *Exp Med*; 187: 1205-13

65. Scott, L.F., Stec B., Margozatak, P.C., Dobaczewska, J.J., Monosov E., Robinson, H., Salvesen, S.G., Scharzenbacher, R and Stefan J. R. 2009. The Fas- FADD death domain complex structure unravels, signaling by receptor clustering. *Nature*. Vol.457 07606.
66. Shatnyeva OM, Kubarenko AV, Weber CE, Pappa A, Schwartz-Albiez R, Weber AN, Krammer PH, Lavrik IN (2011) Modulation of the CD95-Induced Apoptosis: The Role of CD95 N-Glycosylation, *Journal: PLoS ONE* 6(5): e19927.
67. Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., & Lin, R. H. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer research*, 61(1), 237-242.
68. Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A., & Wilson, I. A. (2006) Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2788-2793.
69. Teodorczyk, M., Kleber, S., Wollny, D., Sefrin, J. P., Aykut, B., Mateos, A., ... & Sykora, J. (2015). CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell death and differentiation*, 22(7), 1192.
70. Théze J, Alzari PM and Bertoglio J. (1996). Interleukin 2 and its receptor: recent advances and new immunological function. *Immunology Today*. 17(10):481-486.
71. Torres-Corioriles E., Río-Ortiz I., Weiss-Steider B., Barrios-Maya M., & Rangel-Corona (2019) IL-2 induces apoptosis, increases the production and expression of cytochrome-C and inhibits COX IV in cervical cancer cells. *Journal and solid tumors*. Vol.9 n.1
72. Torsen E.R., Watkins, S., Stanson, J., Johnson, J.T., and Whiteside, L.T., (1998) Endogenous IL-2 in Cancer Cells: A Marker of Cellular Proliferation, *The journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol. 45(5): 603-611.
73. Tungteakkhun, SS., Filippova, M., Neidigh, JW., Fodor, N., and Duerksen-Hughes, PJ. (2008). The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain. *Journal of virology*, 82(19), 9600-9614.
74. Valle-Mendiola, A., Gutiérrez-Hoya, A., Lagunas-Cruz, M. D. C., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2016). Pleiotropic effects of IL-2 on cancer: its role in cervical cancer. *Mediators of inflammation*, 2016.
75. Valle-Mendiola, A., Weiss-Steider, B., Rocha-Zavaleta, L., & Soto-Cruz, I. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer investigation*, 32(4), 115-125.
76. Woodman CB, Collins SI & Young LS (2007), The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* Vol. 7. 11 - 22.
77. Yanagisawa J, J, Takahashi M, Kanki H, Yano-Yanagisawa H, Tazunoki T, Sawa E, Nishitoba T, Kamishohara M, Kobayashi E, Kataoka S and Sato T (1997) The molecular interaction of Fas and

FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *Journal Biological Chemistry*. Mar 28;272(13):8539-45

78. Zhang, Y., Wu, Y., Cheng, Y., Zhao, Z., Tashiro, S. I., Onodera, S., & Ikejima, T. (2008). Fas-mediated autophagy requires JNK activation in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(4), 1205-1210.

ANEXO I

Tablas de áreas en μm^2 evaluadas en células HeLa con ayuda del programa Image J

| Results | | | | | |
|---------|---------|---------|-----|-----|---------|
| File | Edit | Font | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Perim. |
| 1 | 513.720 | 96.255 | 67 | 132 | 92.596 |
| 2 | 271.148 | 87.189 | 50 | 162 | 64.056 |
| 3 | 642.648 | 87.632 | 54 | 163 | 98.017 |
| 4 | 725.056 | 101.105 | 74 | 167 | 103.470 |
| 5 | 620.717 | 99.586 | 82 | 161 | 109.962 |
| 6 | 460.554 | 94.850 | 66 | 135 | 87.751 |
| 7 | 411.375 | 101.468 | 75 | 158 | 78.130 |
| 8 | 398.083 | 102.072 | 79 | 153 | 82.821 |
| 9 | 529.005 | 98.197 | 71 | 139 | 89.135 |
| 10 | 415.362 | 92.843 | 33 | 158 | 94.869 |
| 11 | 427.325 | 94.543 | 54 | 167 | 85.401 |
| 12 | 475.174 | 93.815 | 65 | 132 | 89.024 |
| 13 | 492.453 | 90.789 | 62 | 158 | 87.092 |
| 14 | 491.124 | 88.682 | 65 | 142 | 81.942 |
| 15 | 350.898 | 92.188 | 59 | 162 | 70.520 |

Fig.1 Áreas de células HeLa SE

| Results | | | | | |
|---------|---------|--------|-----|-----|---------|
| File | Edit | Font | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Perim. |
| 1 | 636.806 | 73.790 | 47 | 107 | 100.248 |
| 2 | 434.722 | 75.842 | 61 | 92 | 80.241 |
| 3 | 432.639 | 76.392 | 52 | 93 | 84.095 |
| 4 | 623.611 | 74.748 | 32 | 153 | 105.190 |
| 5 | 574.306 | 74.030 | 42 | 108 | 105.659 |
| 6 | 629.861 | 76.677 | 54 | 113 | 98.803 |
| 7 | 602.778 | 76.930 | 55 | 103 | 94.218 |
| 8 | 431.944 | 78.863 | 58 | 98 | 79.028 |
| 9 | 615.972 | 78.472 | 59 | 109 | 92.365 |
| 10 | 649.306 | 70.312 | 41 | 102 | 101.989 |
| 11 | 393.750 | 76.235 | 37 | 112 | 82.036 |
| 12 | 368.056 | 75.408 | 23 | 138 | 75.374 |
| 13 | 461.111 | 76.785 | 49 | 120 | 89.281 |
| 14 | 438.194 | 73.707 | 41 | 96 | 91.070 |
| 15 | 378.472 | 74.171 | 23 | 111 | 81.940 |

Fig. 2 Áreas de células HeLa 0.2 $\mu\text{g/ml}$

| Results | | | | | |
|---------|----------|---------|-----|-----|---------|
| File | Edit | Font | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Perim. |
| 1 | 552.368 | 80.537 | 53 | 128 | 112.793 |
| 2 | 810.547 | 86.648 | 50 | 129 | 119.070 |
| 3 | 680.542 | 87.288 | 50 | 126 | 104.006 |
| 4 | 765.991 | 95.975 | 57 | 127 | 103.213 |
| 5 | 800.171 | 91.775 | 57 | 133 | 115.564 |
| 6 | 653.687 | 97.550 | 72 | 136 | 112.842 |
| 7 | 642.090 | 87.342 | 61 | 131 | 120.877 |
| 8 | 836.792 | 97.644 | 72 | 139 | 123.455 |
| 9 | 961.914 | 97.787 | 47 | 131 | 114.871 |
| 10 | 790.405 | 94.388 | 68 | 129 | 129.478 |
| 11 | 946.655 | 85.504 | 65 | 113 | 121.624 |
| 12 | 1091.309 | 96.473 | 56 | 137 | 137.558 |
| 13 | 869.141 | 101.943 | 60 | 147 | 116.416 |
| 14 | 957.642 | 97.837 | 47 | 131 | 113.863 |
| 15 | 739.746 | 97.411 | 65 | 139 | 102.298 |

Fig .3 Áreas de células HeLa 0.5 $\mu\text{g/ml}$

| Clipboard | | | | |
|-----------|----------|--------|--------|-----|
| File | Edit | Font | Macros | |
| | Area | Mean | Min | Max |
| 1 | 1124.306 | 73.217 | 38 | 120 |
| 2 | 993.056 | 72.366 | 38 | 141 |
| 3 | 819.444 | 73.569 | 33 | 132 |
| 4 | 1075.694 | 59.117 | 8 | 112 |
| 5 | 1195.833 | 54.626 | 24 | 84 |
| 6 | 1172.917 | 52.404 | 26 | 92 |
| 7 | 895.833 | 52.681 | 26 | 82 |
| 8 | 915.972 | 55.578 | 41 | 76 |
| 9 | 779.861 | 58.362 | 32 | 98 |
| 10 | 696.528 | 67.480 | 38 | 136 |
| 11 | 1042.361 | 65.657 | 43 | 100 |
| 12 | 903.472 | 60.168 | 35 | 103 |
| 13 | 1017.361 | 76.014 | 33 | 145 |
| 14 | 2153.472 | 73.524 | 30 | 133 |
| 15 | 1284.722 | 62.822 | 44 | 109 |

Fig. 4 Áreas de células HeLa 1.0 $\mu\text{g/ml}$

| Results | | | | | |
|---------|----------|--------|-----|-----|---------|
| File | Edit | Font | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Perim. |
| 1 | 1263.889 | 81.930 | 42 | 120 | 134.705 |
| 2 | 729.167 | 82.127 | 38 | 120 | 109.451 |
| 3 | 836.111 | 84.013 | 38 | 150 | 149.230 |
| 4 | 997.917 | 86.521 | 51 | 129 | 129.220 |
| 5 | 639.583 | 84.588 | 41 | 143 | 97.319 |
| 6 | 812.500 | 89.174 | 33 | 146 | 111.747 |
| 7 | 915.972 | 91.663 | 51 | 138 | 124.910 |
| 8 | 691.667 | 90.461 | 46 | 132 | 103.496 |
| 9 | 577.778 | 86.300 | 36 | 126 | 96.641 |
| 10 | 707.639 | 91.571 | 46 | 136 | 108.439 |
| 11 | 1272.222 | 81.345 | 38 | 131 | 182.320 |
| 12 | 789.583 | 66.154 | 0 | 172 | 135.921 |
| 13 | 939.583 | 94.275 | 43 | 162 | 128.792 |
| 14 | 1200 | 89.401 | 38 | 143 | 136.830 |
| 15 | 1368.750 | 70.806 | 33 | 122 | 145.448 |

Fig. 5 Áreas de células HeLa 2.5 $\mu\text{g/ml}$

| Results | | | | | |
|---------|---------|--------|-----|-----|--------|
| File | Edit | Font | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | Perim. |
| 1 | 333.845 | 79.781 | 53 | 130 | 68.641 |
| 2 | 418.771 | 76.456 | 43 | 93 | 81.481 |
| 3 | 399.443 | 76.391 | 37 | 138 | 76.554 |
| 4 | 370.158 | 78.568 | 25 | 186 | 76.786 |
| 5 | 500.768 | 83.634 | 25 | 201 | 94.777 |
| 6 | 379.529 | 85.025 | 45 | 134 | 79.325 |
| 7 | 313.346 | 80.202 | 14 | 117 | 67.356 |
| 8 | 528.881 | 61.951 | 19 | 113 | 86.657 |
| 9 | 548.209 | 91.793 | 62 | 150 | 96.859 |
| 10 | 482.611 | 88.177 | 22 | 144 | 83.878 |
| 11 | 411.157 | 81.916 | 36 | 142 | 77.324 |
| 12 | 209.678 | 72.793 | 35 | 99 | 57.047 |
| 13 | 414.085 | 94.001 | 56 | 168 | 77.776 |
| 14 | 251.262 | 84.089 | 36 | 163 | 61.183 |
| 15 | 347.902 | 85.015 | 45 | 134 | 72.180 |

Fig. 6 Áreas de células HeLa 5.0 $\mu\text{g/ml}$

PRESENTACIÓN PROYECTO DIGITAL

El presente trabajo surgió del interés por implementar el uso de Tecnologías de Información y Comunicación (TICs) en el área científica como un apoyo al aprendizaje autodidáctico y de calidad a nivel superior, de esta forma se desarrolla un proyecto verdaderamente multidisciplinario, innovador y de vanguardia.

El surgimiento y fortalecimiento del Internet ha propiciado múltiples cambios en las diferentes áreas del saber, aunado a esto, en los últimos años ha habido un aumento progresivo en el número de usuarios de smartphones y tablets, esto ha provocado el incremento de numerosas aplicaciones orientadas al uso y explotación de las capacidades de estos dispositivos móviles, por lo que, la presente aplicación tiene como fin dar a conocer los nuevos alcances de estas herramientas, y su utilidad en diferentes disciplinas como lo son las ciencias biológicas.

“Si quieres llegar donde la mayoría no llega, necesitas hacer lo que la mayoría no hace”

Anónimo



Por medio de la Aplicación CD95 (disponible en Play store) podrás visualizar el trabajo digital realizado