



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Determinación de autofagia y apoptosis en
células SiHa y HeLa tratadas con IL-2 y anti-CD95**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVÁN ORTIZ GARRIDO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

ASESORES:

DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA

DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN



CD. MX. 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a todos los ciudadanos que con sus aportaciones hicieron posible este sueño.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Oncología molecular (Laboratorio 9, planta baja) de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, de la FES Zaragoza, con apoyo del programa PAPIIT IN222121, DGAPA, UNAM.

A la Dra. Isabel Soto Cruz por permitirme trabajar en su grupo de investigación y brindarme lo necesario para realizar este proyecto, así como por toda su enseñanza y paciencia.

A la Dra. Adriana Gutiérrez Hoya por guiarme durante la realización del proyecto y por todo el tiempo dedicado al mismo. Agradezco también por todo el apoyo y conocimiento que me brindó, la enseñanza teórica y práctica, que permitió la conclusión experimental y escrita de este trabajo.

A Christopher Romero por todo su apoyo, amistad, consejos y el conocimiento que me aportó.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por el conocimiento que me compartió, así como por la revisión y los comentarios del trabajo escrito.

A los sinodales, la Dra. María de Lourdes Mora García y al Dr. Luis Sánchez Sánchez por sus revisiones, observaciones, comentarios y consejos que permitieron afinar el trabajo.

A todos los miembros, amigos y compañeros del laboratorio: M. en C. Octavio C., Dr. Arturo V., Rubén F., Erika C., Fernando L., Rodrigo R. y Armando G., que siempre que fue necesario me brindaron su apoyo y conocimiento.

DEDICATORIA

A mi madre Eusebia Garrido Vásquez, a mi padre Morelio Ortiz Villa y a mis hermanos: Wilfrido, Maribel, Erika y Yesenia, que sin su apoyo y ánimos, esto no sería posible, además de que siempre son una gran motivación.

A Laura Isela R. V. por siempre apoyarme y ser otro gran motivo.

ABREVIATURAS

IL-2: Interleucina 2

IL-7: Interleucina 7

IL-2R: Receptor de IL-2

CD95: Receptor de muerte CD95

CD95L: Ligando de CD95

DED: Dominio efector de muerte

DD: Dominio de muerte

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

FADD: Dominio de muerte asociado a FAS

ICAD: Chaperona de la nucleasa CAD

CAD: ADNasa activada por caspasa

VPH: Virus del papiloma humano

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa

LC3: Cadena ligera 3-I de la proteína asociada a microtúbulos

LC3II: forma conjugada con fosfatidiletanolamina de LC3

PHS: proteoglicanos heparán sulfato

IP: Yoduro de propidio

FS: fosfatidilserina

FAS: Receptor de muerte

FASL: Ligando de FAS

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral (receptor de muerte)

TNF: Ligando de TNFR

DR4/5: Receptores de muerte

TRAIL: Ligando de receptores DR4/5

pRb: Proteína del retinoblastoma

pH2AX: Fosfohistona H2AX

JAK: Janus cinasa

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción

pSTAT: Transductor de señal y activador de la transcripción fosforilado

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

ERK: MAPK cinasa reguladora de la señal extracelular

NF- κ B: Factor nuclear κ B

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal

EGF: Ligando de EGFR

AMPK: Cinasa activada por AMP

mTORC1: Objetivo de mamífero del complejo de rapamicina 1

ATG: Proteína relacionada con la autofagia

VPS: Proteína asociada a la clasificación de proteínas vacuolares

PI3K: Fosfatidilinositol-3-c

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	7
<i>Cáncer</i>	7
<i>Cáncer de cérvix</i>	7
<i>VPH</i>	9
<i>Infección y entrada del VPH</i>	9
<i>Estructura del VPH; oncoproteínas E6 y E7</i>	10
<i>Muerte celular y VPH</i>	12
<i>Vía no canónica de CD95</i>	14
<i>Vía IL-2 / JAK-STAT y cáncer</i>	15
<i>Autofagia</i>	16
<i>Autofagia y VPH</i>	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i>	19
MATERIAL Y MÉTODO	20
<i>Líneas celulares</i>	20
<i>Ensayo de proliferación celular</i>	20
<i>Determinación de CD95 extracelular y CD95L intracelular por citometría de flujo</i>	20
<i>Determinación de CD95 extracelular y CD95L intracelular por microscopía confocal</i>	21
<i>Evaluación de muerte celular por anexina V/IP</i>	21
<i>Determinación de PARP escindida (cPARP) y pH2AX por citometría de flujo</i>	21
<i>Determinación de cPARP y LC3B por microscopía confocal</i>	22
<i>Análisis estadístico</i>	22
RESULTADOS.....	23
<i>El tratamiento con IL-2 promueve un aumento y una disminución de la proliferación de células SiHa y HeLa</i>	23
<i>Presencia de CD95 y CD95L en células SiHa y HeLa</i>	23
<i>Activación de la vía no canónica de CD95 en células SiHa y HeLa al ser tratadas con anticuerpos agonistas de CD95 (CH11 y DX2)</i>	25

<i>El tratamiento simultáneo de bajas dosis de IL-2 más el anticuerpo agonista CD95 (CH11) no induce una proliferación acumulativa. CD95 libera a las células tumorales del arresto inducido por 100 UI/mL de IL-2.....</i>	26
<i>El tratamiento con IL-2, anti-CD95 y tratamientos simultáneos no induce apoptosis en células SiHa y HeLa</i>	27
<i>Las líneas celulares SiHa y HeLa expresan la proteína autofágica LC3B.....</i>	30
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

Debido a que el cáncer de cérvix es un problema de salud pública en México y a que un alto porcentaje de estos cánceres son positivos para VPH 16 y VPH 18, decidimos evaluar si el tratamiento simultáneo de altas dosis de IL-2 más anti-CD95 favorecen la muerte celular por apoptosis o promueven autofagia en células SiHa y HeLa.

En este estudio encontramos que las células SiHa y HeLa responden de manera diferencial dependiendo de la dosis, al estímulo con IL-2. Observamos también que expresan un alto porcentaje del receptor CD95, así como de su ligando (CD95L), y que el tratamiento con anticuerpos agonistas de CD95 en bajas dosis, inducen un aumento en la proliferación celular. Además, el tratamiento simultáneo de altas dosis de IL-2 más el agonista CH11 de CD95 regula positivamente la acumulación de LC3B. No encontramos apoptosis aparente bajo ninguno de los tratamientos realizados.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cérvix es considerado el cuarto cáncer con mayor prevalencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial y es el segundo cáncer más prevalente y mortal en las mujeres mexicanas (GLOBOCAN, 2020). El desarrollo de cáncer cervical está asociado a la infección persistente por Virus de Papiloma Humano (VPH) oncogénicos, principalmente VPH 16⁺ y VPH 18⁺ (Tirado, 2005; Castellsagué, 2008). La activación de la muerte celular juega un papel importante para promover la eliminación de las células dañadas, infectadas y transformadas (Elmore, 2007; Yuan, 2012). Se ha reportado que, en células tumorales cervicales, hay una alta expresión del receptor de muerte CD95 (Gutiérrez, 2019; Aguilar 2001). Sin embargo, a pesar de la alta expresión, estas células positivas para VPH presentan una alta resistencia a la inducción de apoptosis (Filippova, 2004; Jiang, 2014). Además, se ha visto que la interacción CD95/CD95L puede activar la vía no canónica que favorece la resistencia a la eliminación celular, mayor motilidad e invasividad, proliferación y supervivencia (Barhnart, 2004; Chen, 2010). En tumores cervicales se ha visto la presencia de CD95L, que les permite inducir la muerte por apoptosis a linfocitos T citotóxicos, proceso que es revertido cuando se suministra IL-2 e IL-7, factores importantes de la inmunoterapia (Peter, 2015; Contreras, 2000).

Se conoce la importancia de la inmunoterapia en la activación del sistema inmune para mejorar diversas vías de muerte celular y promover la eliminación de las células tumorales. Una de las moléculas que está ampliamente implicada en la activación del sistema inmune es la Interleucina 2 (IL-2), la cual ha sido utilizada en el tratamiento de varios cánceres. En este contexto, nuestro grupo de trabajo demostró que células HeLa de cáncer de cérvix expresan el receptor para IL-2. El tratamiento con bajas dosis de IL-2 (10 UI/mL), induce el incremento de la proliferación. Por el contrario, altas dosis (100 UI/mL) promueven una disminución en la proliferación por una aparente detención en la fase G1 del ciclo celular (Lagunas, 2019). La IL-2 también

se ha visto implicada en la activación de la autofagia. En tejido hepático y fibroblastos embrionarios de ratón, la IL-2 promueve la conversión de LC3I a LC3II y por tanto, la formación de autofagosomas. En modelos de co-cultivos de células tumorales cervicales con linfocitos T o células NK y en presencia de IL-2 se produce un aumento pronunciado de focos fluorescentes de LC3II (Liang, 2012; Kang, 2013; Buchser, 2012). Algo similar se ha visto tras la activación de CD95, en células HeLa (Zhang, 2008).

MARCO TEÓRICO

Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células transformadas, que comúnmente conlleva a la formación de masas tumorales. Tiene la capacidad de extenderse a otras partes del cuerpo a través del proceso metastásico (OMS, 2020). A partir del estudio y el entendimiento de esta enfermedad se han descrito algunos “sellos distintivos” del cáncer. Es decir, los mecanismos característicos que las células adquieren para tener la capacidad de transformación maligna. Hasta el momento se enlistan diez sellos distintivos: 1) Mantenimiento de la señalización proliferativa, 2) Evasión de los supresores de crecimiento, 3) Resistencia a la muerte celular, 4) Inmortalidad replicativa, 5) Angiogénesis, 6) Metástasis, 7) Reprogramación del metabolismo celular, 8) Evasión de la respuesta inmunitaria, 9) Desbloqueo de la plasticidad fenotípica y 10) Reprogramación epigenética no mutacional, siendo estos dos últimos, agregados en el reciente año 2022. Además de cuatro características habilitadoras, 1) Inflamación promotora de tumores, 2) Inestabilidad y mutación del genoma, 3) Microbiomas polimórficos y 4) Células senescentes, que activan en conjunto a los diez sellos distintivos (Hanahan, 2022). En células cervicales tumorales se ha visto con mayor importancia las vías relacionadas con el mantenimiento de la señalización proliferativa y resistencia celular.

Este padecimiento está dentro de las principales causas de muerte alrededor del mundo. Aproximadamente 70% de las muertes por cáncer en el mundo se registran en países de ingresos medios y bajos. En algunos casos se ha visto que el desarrollo de cáncer se debe principalmente a infecciones oncogénicas, como es el caso del cáncer de cérvix por acción de algunos virus del papiloma humano (VPHs) (OMS, 2020).

Cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix es considerado el cuarto cáncer en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial (Figura 1). En México, este cáncer presentó una incidencia del 8.9% (Figura 2) y una mortalidad del 9.4%, llegando a ser el segundo cáncer más común y mortal. (Globocan, 2020). Es una enfermedad multifactorial, que afecta al

cuello uterino y que se desarrolla generalmente en la zona de transformación de la unión escamocolumnar, afectando a las células escamosas o a las células glandulares. Los dos tipos más comunes de cáncer de cuello uterino son el carcinoma de células escamosas que se desarrolla a partir de células en el exocérvix, se originan con mayor frecuencia en la zona de transformación (donde el exocérvix se une al endocérvix), seguido del adenocarcinoma que se origina en células glandulares productoras de mucosidad del endocérvix (American Cancer Society, 2020).

Estimated number of prevalent cases (5-year) in 2020, worldwide, females, all ages

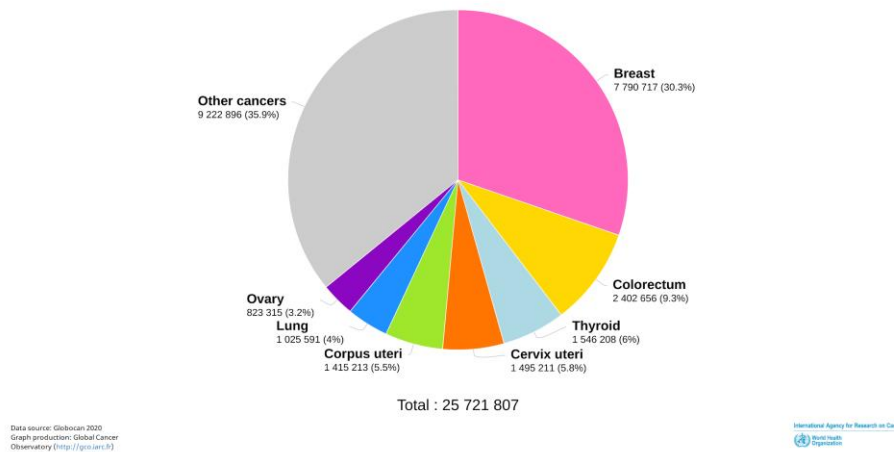


Figura 1. Prevalencia de diferentes tipos de cáncer en el mundo. El cáncer de cérvix es el cuarto más prevalente en mujeres alrededor de todo el mundo. Tomado de Globocan, 2020 <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v>

Estimated number of new cases in 2020, Mexico, females, all ages

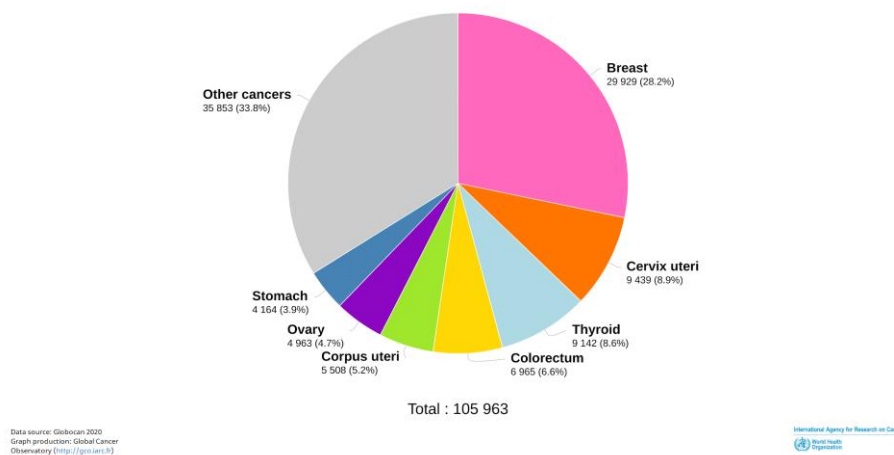


Figura 2. Incidencia de diferentes tipos de cáncer en mujeres de México. En México el cáncer de cérvix es el segundo cáncer con mayor incidencia. Tomado de Globocan, 2020 <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v>

VPH

El VPH es un virus de doble cadena de ADN de aproximadamente 8000 pb, se han identificado más de 200 serotipos. Estos se agrupan en VPH de alto o bajo riesgo oncogénico dependiendo de su capacidad de transformación. Entre los serotipos de alto riesgo se encuentran el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, destacando los dos primeros, pues están asociados al desarrollo de cáncer cervical, anal, vaginal, vulvar, peniano, orofaríngeo y lesiones precursoras asociadas; mientras que 6 y 11 se han clasificado como de bajo riesgo, teniendo la capacidad de originar condilomas acuminados y papilomatosis laríngea recurrente. También, se han descrito los serotipos 5, 8, 68, 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85 y 97 como posibles asociados a procesos carcinogénicos (Sendagorta, 2019).

Los virus con mayor capacidad de transformación del epitelio cervical son los denominados VPH de alto riesgo u oncogénicos, dentro de estos destacan los serotipos VPH 16⁺ y VPH 18⁺, son los más comunes y están asociados con el 70% de los cánceres cervicales en México y en el mundo (Flores, 2015; Castellsagué, 2008). Un estudio realizado por Salcedo y colaboradores en 2015 reportó una alta prevalencia del serotipo VPH 16⁺ (57% aproximadamente), este grupo reportó que, 2 de cada 3 pacientes mexicanas analizadas con cáncer cervicouterino fueron positivas para VPH 16⁺, encontrándose además en todos los grados de lesión intraepitelial. Por otra parte, el VPH 18⁺ se detectó en menos del 8% de los casos de cáncer de cérvix. Es bien sabido que la infección persistente de estos VPHs oncogénicos es la principal causa de desarrollo del cáncer cervical, pero existen también otros factores de riesgo asociados al desarrollo de este cáncer, tales como inicio de actividad sexual a edad temprana, múltiples parejas sexuales, multiparidad, tabaquismo y ciertas deficiencias en la dieta (Carrillo, 2015; Arévalo, 2017).

Infección y entrada del VPH

El virus del papiloma humano es capaz de ingresar a la capa de células normales basales del cérvix a través de lesiones o microabrasiones originadas por diversas causas, tanto físicas, químicas o biológicas. Cuando el VPH se encuentra en el epitelio basal infecta a las células a partir de la unión de sus proteínas L1 a los receptores integrina $\alpha 6$ o proteoglicanos heparán sulfato (PHS) presentes en la membrana celular, seguido, se internaliza por un mecanismo endocítico dependiente de clatrina. Es importante que el VPH infecte a las células basales, debido a que estas se encuentran en constante proliferación y diferenciación, y de esto depende en gran medida la subsistencia, la replicación y la acción neoplásica. Una vez concretada la infección, la diferenciación de las células epiteliales, permitirá la replicación de numerosas copias del VPH para inducir la expresión de los genes L1 y L2, lo que permite el ensamblaje de nuevos viriones que, al liberarse en la superficie epitelial, afectarán a las células adyacentes. Además, los VPH oncogénicos tienen la capacidad de integrar su genoma al de la célula huésped, generando una infección abortiva. Esta se caracteriza por la disrupción del gen E2 regulador transcripcional de

E6 y E7. La sobreexpresión de E6 y E7 se asocia con dianas implicadas en la regulación del ciclo celular y resistencia a la muerte programada, que lleva a una proliferación desmedida y finalmente un cáncer *in situ* o invasivo (Beltrán, 2014; Sendagorta, 2019; Gutiérrez, 2023). Figura 3.

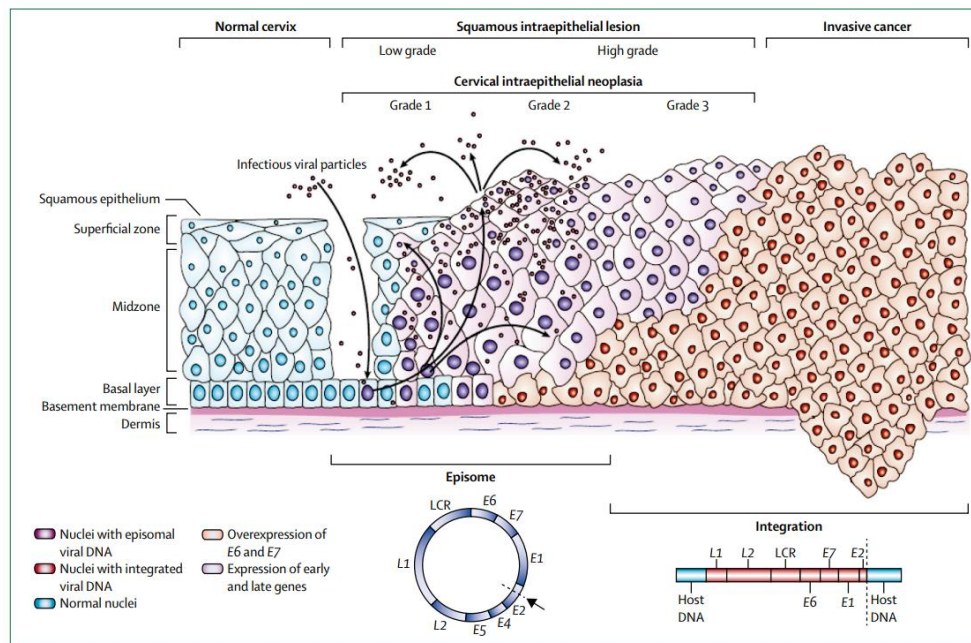


Figura 3. Infección e integración del genoma VPH. Tomada de Cohen P. A., (2019). Cervical cancer.

Estructura del VPH; oncoproteínas E6 y E7

El VPH es relativamente pequeño, mide entre 52 y 55 nm de diámetro, no contiene envoltura lipídica y presenta un genoma de ADN de doble cadena (Santos, 2015). Su genoma se divide en tres regiones: la región larga de control (LCR); una región temprana E (Early) que codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, importantes para la replicación del ADN viral, regulación de la transcripción e inmortalización viral; y por último la región tardía L (Late), que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 (Doorbar, 2007; McMurray, 2001) (Figura 4).

La transformación celular ocasionada por la infección de VPH de alto riesgo está asociada con la participación de las proteínas tempranas E6 y E7. Estas oncoproteínas juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer, debido a que se unen a diferentes reguladores celulares que participan en procesos de proliferación, apoptosis, estabilidad cromosómica, transcripción de genes, diferenciación celular, respuesta inmunológica, entre otros (Wang, 2018; Lizano, 2009). Tabla 1.

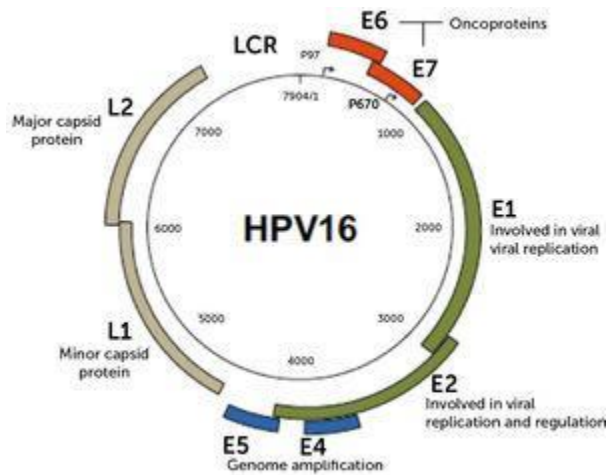


Figura 4. Genoma del virus de papiloma humano tipo 16. Tomado de Montero, P.H (2018)

Gen	Actividad
E5	Mejora las vías de señalización del Factor de crecimiento. Se une a los dominios de muerte del receptor CD95 e impide la formación del DISC.
E6	Inhibe p53, se pierde la regulación del ciclo celular. Inhibe FADD, Procaspasa 8, Bax, Bak, regula negativamente la muerte celular.
E7	Permite la progresión del ciclo celular tras la interacción con la proteína del retinoblastoma (pRb).

Tabla 1. Papel de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.

La oncoproteína E6 se expresa tempranamente durante la infección de los VPH de alto riesgo y una de sus proteínas blanco es p53 (importante regulador del ciclo celular), de manera que E6 se une a p53 e induce su degradación, por lo que inhibe la detención del ciclo celular y la apoptosis. Por otra parte, la oncoproteína E7 también tiene diferentes proteínas blanco que están implicadas en la regulación del crecimiento celular, especialmente la transición de la fase G1 a S (Álvarez, 2012; Werness, 1990; McMurray, 2001). El blanco mejor estudiado de E7 es pRB (proteína del retinoblastoma). E7 se une a la proteína pRb (proteína encargada de regular a la familia de factores de transcripción E2F), esta interacción promueve la liberación de los factores de transcripción E2F y permite el progreso a la fase S, seguido de la replicación del DNA (Álvarez, 2012; Flores, 2000). La alteración de las proteínas p53 y pRb confiere una mayor capacidad de transformación celular y, por tanto, un mal pronóstico (Fragoso, 2004). Además de lo anteriormente señalado, la oncoproteína E6 tiene una gran cantidad de moléculas blanco, por lo que la sobreexpresión de ésta

permite la acumulación de anomalías en las células intraepiteliales cervicales y con ello favorece alteraciones en la transducción de señales apoptóticas (Sheets, 1996; Aguilar, 2001). Tabla 1.

Reportes recientes indican que las oncoproteínas virales E6 y E7 también tienen influencia sobre la activación de diversas vías de señalización implicadas en procesos de supervivencia, proliferación, metástasis, metabolismo energético, resistencia a la muerte celular y a agentes quimioterapéuticos, entre otros. Una vía muy importante en la regulación de los procesos mencionados anteriormente es la vía JAK/STAT, específicamente las proteínas STAT3 y STAT5, a partir de su regulación positiva (Gutiérrez, 2020).

Muerte celular y VPH

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se activa como un proceso de regulación fisiológica durante el desarrollo y envejecimiento, actúa también como mecanismo de defensa, además es importante en la eliminación de células infectadas, dañadas o transformadas (Elmore, 2007). La apoptosis puede activarse de forma intrínseca o extrínseca. Esta última, mediada por la interacción de receptores de muerte con sus ligandos, tal es el caso de la interacción CD95/CD95L (FAS/FASL), TNF/TNFR y TRAIL/DR4/5 (Ashkenazi, 1998; Lowe, 2000). Dentro de estas formas de activación de muerte celular, la vía que tiene mayor estudio y relevancia es la vía CD95, la cual juega un papel importante en la activación del sistema inmune para promover la eliminación de las células infectadas por el virus del VPH y de células tumorales. Tras la interacción CD95/CD95L se inicia la transducción de la señal, uno de los primeros pasos es la trimerización del receptor y la exposición de dominios de muerte (DD) intracelulares, los cuales se unen a la molécula adaptadora que contiene un dominio de muerte asociado a FAS (FADD), FADD también posee un dominio efector de muerte (DED) el cual puede interactuar con las procaspasas 8 y 10, a este conjunto de interacciones se les conoce como, complejo de señalización inductor de muerte (DISC), el cual se forma de manera rápida (segundos) después de la interacción CD95/CD95L. Estas procaspasas se activan por proximidad y entrecruzamiento con otras procaspasas. Seguido de la activación de la procaspasa 8, ésta ejerce su actividad proteolítica sobre la procaspasa 3, la cual una vez activa ejerce su función proteolítica sobre las procaspasas 6 y 7 quienes junto con la caspasa 3 son moléculas efectoras de la apoptosis, figura 5 (Robles, 2009). Tienen como dianas algunas proteínas reparadoras del ADN como PARP y DNA-PK; la chaperona de la endonucleasa CAD (ICAD) y la proteína cinasa C (PKC) (Lagunas, 2010). El inicio de la apoptosis conduce a cambios físicos en la membrana celular. Uno de estos cambios es la pérdida de la simetría de la membrana que permite que la fosfatidilserina (FS) trasloque de la cara interna a la cara externa de la membrana celular. La presencia de FS puede ser detectada por el marcaje con Anexina V, una molécula altamente afín e incapaz de difundir en la membrana. En un estado tardío de la apoptosis, se pierde por completo la integridad de la membrana celular y se

permite el paso de moléculas grandes, este proceso puede ser detectado por el marcaje de intercalantes del ADN, como Yoduro de propidio (IP) o 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Otro evento característico de la apoptosis es la fragmentación del ADN, a este proceso se asocia la sobre expresión de poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), proteína reparadora de roturas del ADN, que al ser cortada por caspasa 3 pierde su actividad. La apoptosis inducida por cisplatino induce la presencia de la histona fosforilada H2AX (pH2AX o γ -H2AX), proteína variante de la histona H2AX encargada de la reparación de ruptura de doble cadena del ADN (Moreno, 2000; Mullen, 2004; Kim, 2023)

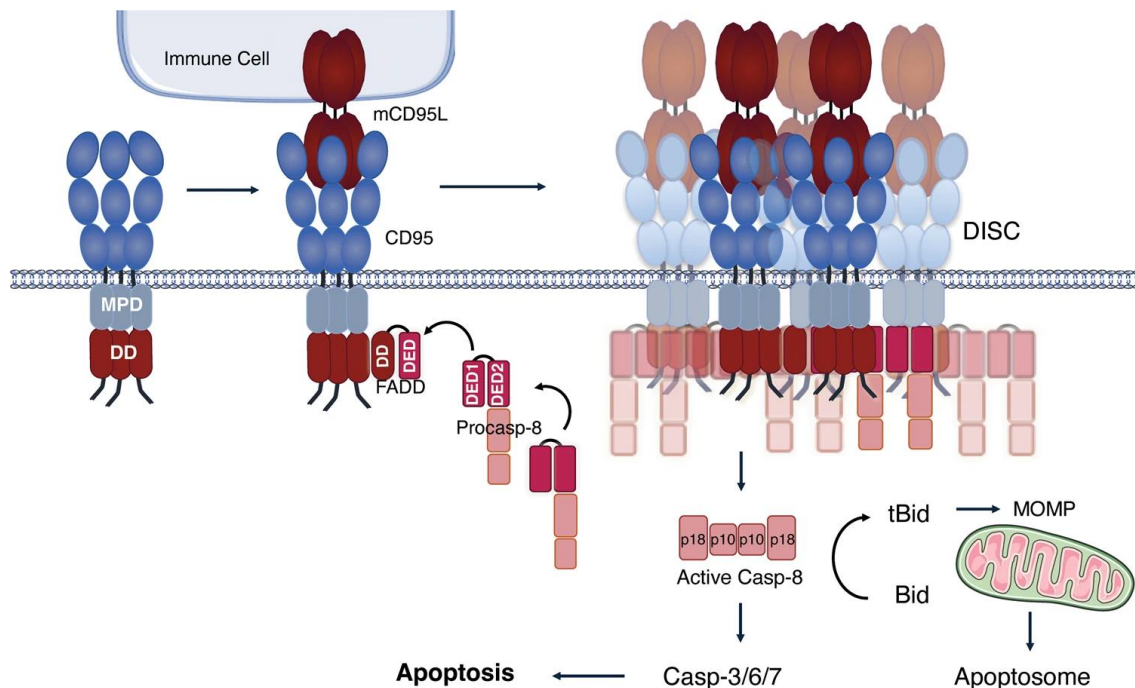


Figura 5. Apoptosis activada por la vía extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca es activada por estímulos del ligando, y desencadena una cascada de señalización de caspasas. Tomado de Riso, V. (2022).

El proceso de apoptosis está altamente regulado y es también un mecanismo muy efectivo. Curiosamente se ha observado y reportado por algunos grupos de investigación que en células tumorales cervicales hay una alta expresión de CD95, sin embargo, se ha observado una alta resistencia a la inducción de muerte celular por apoptosis (Gutiérrez, 2021; Aguilar 2001). Esta resistencia a la activación de la muerte celular se atribuye en parte a las oncoproteínas virales E5, E6 y E7 (Figura 6). Existen reportes que indican que E5 regula negativamente la expresión del receptor CD95, así como la formación del DISC. Por su parte, E6 puede inhibir la apoptosis mediada por la vía CD95/CD95L y TNF/TNFR, debido a su capacidad para unirse a la proteína adaptadora FADD, procaspasa 8, proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK e inducir su degradación o unirse a la fracción C-terminal del receptor TNF-R1 para bloquear la transducción de la señal apoptótica (Filippova, 2004; Jiang, 2014; James, 2006; Kabsch, 2004; Lagunas, 2010). Por otra parte, la oncoproteína E7 también contribuye en la regulación del proceso apoptótico, Yuan y colaboradores en 2005

observaron que los queratinocitos orales humanos immortalizados que expresan E6/E7 regulan la expresión de c-IAP2 e inhiben la muerte activada vía TNF/TNFR. Un proceso similar, es lo reportado por Thompson y colaboradores en 2001, donde observaron que fibroblastos transformados que expresan E7 tienen la capacidad de retrasar la apoptosis vía CD95/CD95L e inhiben la muerte mediada por TNF/TNRF, debido a que inhiben la activación de la caspasa 8. Es importante mencionar que a diferencia de E6, la oncoproteína E7 tiene un papel controversial debido a que se ha observado que su sobreexpresión en queratinocitos humanos primarios los sensibiliza a la muerte mediada por TNF (StoËppler, 1998).

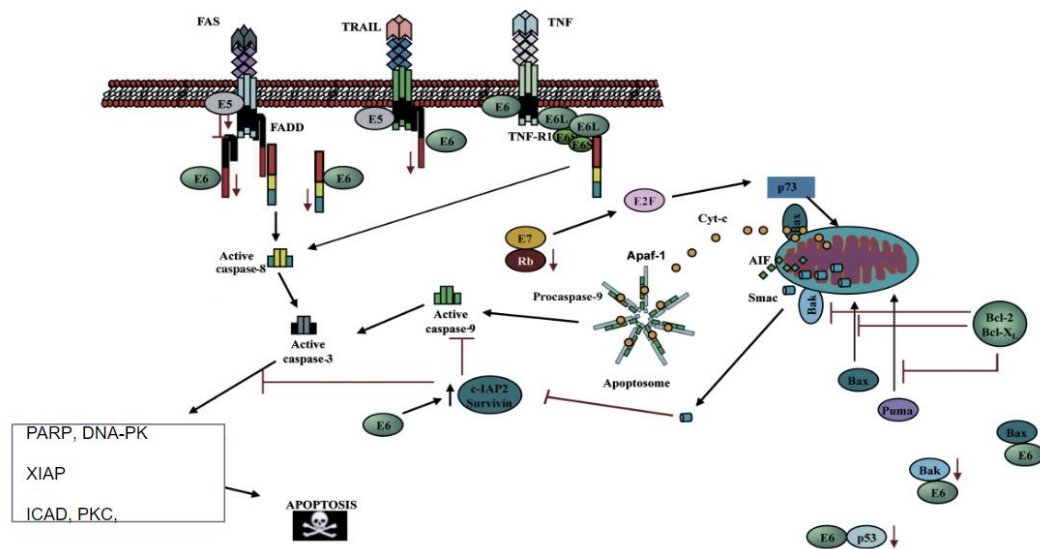


Figura 6. Actividad de las proteínas del VPV sobre la inhibición de las vías apoptóticas. Tomado y Modificado de Lagunas-Martínez, A. (2010).

Vía no canónica de CD95

Por otra parte, aunque de manera general la activación de la vía CD95/CD95L se asocia a la apoptosis, diversos estudios muestran que dicha interacción puede activar una vía no canónica, la cual, está asociada a la señalización por NF- κ B, Erk1/2, JNK y Jun; vías implicadas en la resistencia a la eliminación celular, mayor motilidad e invasividad, proliferación y supervivencia (Barhnart, 2004; Chen, 2010). En el contexto tumoral, la interacción CD95/CD95L se ha visto implicada en la supervivencia y en el mantenimiento celular. En líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado que al eliminar CD95L, las células son más susceptibles a la muerte, por el contrario, cuando se induce una sobreexpresión del ligando de CD95 se observa un aumento celular, así como de células troncales tumorales (Hadji, 2014; Ceppi 2014). CD95 posee dominios intracitoplasmáticos que pueden ser fosforilados (Y232, Y291) y se ha correlacionado su fosforilación con la activación de la vía no canónica, esto debido a que la fosforilación en este sitio bloquea la unión de FADD, lo que impide la formación de un DISC funcional y, por consiguiente, la activación de las caspasas. La fosforilación del residuo Y291 por las cinasas Yes-1 o Src, en células tumorales de colon permite la formación de un complejo con el receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR) activado por EGF, que favorece el reclutamiento de STAT3 y su consecuente fosforilación en el residuo Y705 por actividad de la cinasa Yes-1. Todo esto en la translocación a núcleo de EGFR fosforilado (pEGFR), pSTAT3 y un aumento en la expresión de la ciclina D1 que conlleva a la proliferación celular (Seyrek, 2019; Ta, 2018; Chakrabandhu, 2016) (Figura 7). En otro estudio realizado por Teodorczyk y colaboradores en 2015, en tumores de adenocarcinoma ductal pancreático, observaron una alta expresión de CD95 y tras su activación, encontraron un aumento en la proliferación celular, metástasis y características de transición epitelio mesénquima, todos esto tras el reclutamiento de Sck como molécula adaptadora de la activación de la vía PI3K/MAPK en el dominio de muerte del receptor CD95. Por otra parte, se han reportado otras vías de señalización implicadas en el proceso tumoral que pueden ser activadas de forma directa o indirecta después de la estimulación CD95/CD95L, tal es el caso la vía JAK/STAT (Qadir, 2017).

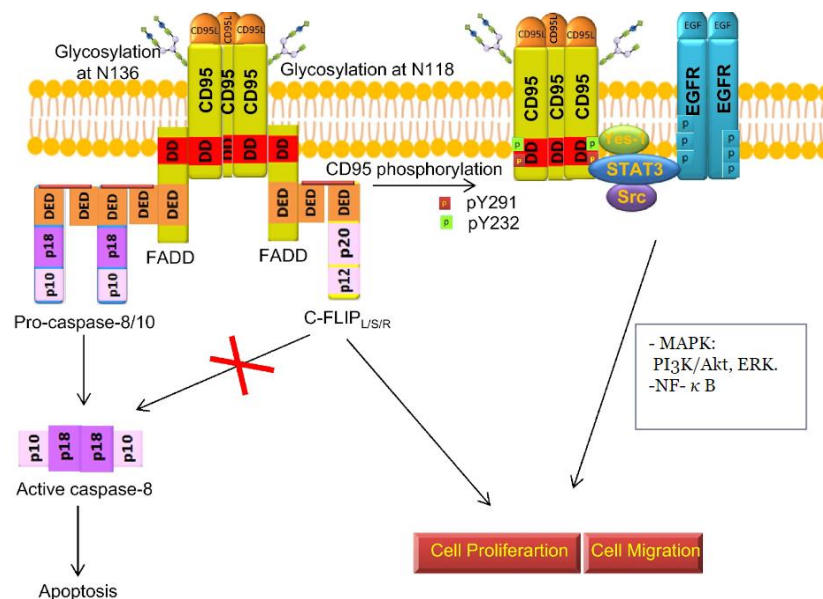


Figura 7. Activación de la vía no canónica de CD95. La fosforilación de los residuos Y291 e Y232 en el DD del receptor inhibe el acoplamiento de FADD y por lo tanto la apoptosis, esto conduce a la formación de un complejo con EGFR, Yes-1, Src y STAT3 que permite la activación de algunas vías de supervivencia como lo son las MAPK, NF-κ B. Tomado y modificado de Seyrek, K. (2019).

Vía IL-2 / JAK-STAT y cáncer

Además de CD95, la estimulación de diferentes moléculas expresadas por las células tumorales puede tener efectos pleiotrópicos, tal es el caso de la IL-2. La IL-2 es una citocina implicada en la activación del sistema inmune, es producida por linfocitos T activados y es necesaria para la proliferación y activación de células citotóxicas, linfocitos T y linfocitos B (NCI, 2019). En la inmunoterapia la IL-2 (600 000 a 720 000 IU/kg) ha sido utilizada contra diferentes tipos de cáncer como el melanoma, cáncer renal, cáncer intestinal, y cáncer de cabeza y cuello (Jiang, 2016; Rosenberg, 2014; Reinecker, 1995; Ciacci, 1993; Saito, 1991). Se ha observado, que las líneas celulares de cáncer de cérvix son capaces de secretar a dicha citocina, así como de señalizar,

esto debido que son capaces de expresar las tres subunidades que componen al receptor de la IL-2 (Rangel, 2010; Lagunas, 2019). Las células tumorales cervicales responden de manera diferencial al tratamiento con IL-2, a bajas dosis (10 UI/mL) se observa un incremento en la proliferación celular, mientras que a altas dosis (100 UI/mL) disminuye la proliferación celular debido a la detención en la fase G1 del ciclo celular. Esta detención aparentemente podría jugar un papel importante en la resistencia a la inducción de muerte celular, pues se observó que protegió a las células de la muerte inducida por cisplatino (Lagunas, 2019).

Estos datos podrían correlacionar con la vía JAK/STAT, nuestro grupo de trabajo reportó que a bajas dosis (10 UI/mL) se observa un incremento en la fosforilación de STAT3 y STAT5, por el contrario, altas dosis (100 UI/mL) disminuyen la fosforilación de STAT3 y STAT5. Es importante mencionar que la activación de los factores de transcripción STAT3 y STAT5 está asociada a la transcripción de genes nucleares implicados en la proliferación, metástasis, progresión del ciclo celular, resistencia a la apoptosis y a agentes quimioterapéuticos, metabolismo energético, entre otros genes ampliamente relacionados con la malignidad tumoral (Valle, 2014; Valle, 2020; Gutiérrez, 2020; Morgan, 2020).

Por otra parte, en un estudio realizado por Schmitz y colaboradores en 2003, se encontró que células T humanas primarias, son susceptibles a la apoptosis mediada por CD95 cuando se tratan previamente con IL-2. En células tumorales diversas, así como en tumores cervicales se ha visto la presencia de CD95L, que les permite inducir la muerte por apoptosis a linfocitos T citotóxicos, esto es revertido cuando se suministra IL-2 e IL-7, factores importantes de la inmunoterapia (Peter, 2015; Contreras, 2000). Estos datos en conjunto evidencian la capacidad de la IL-2 como sensibilizador potencial hacia una muerte mediada por CD95.

Autofagia

Existe evidencia en células tumorales que uno de los mecanismos para evadir la muerte celular es la activación de la vía autofágica (Wu, 2016; Fan, 2022, Xu, 2012). La autofagia es un proceso fisiológico normal por el cual se reciclan componentes celulares para la obtención de energía, manteniendo la homeostasis celular y tisular. La autofagia ocurre de forma basal, esto con el fin de eliminar organelos dañados, proteínas de larga vida y demás contenido citoplasmático, por lo tanto, se le considera un proceso citoprotector (Mukhopadhyay, 2014). El proceso autofágico principalmente se divide en iniciación, elongación y fusión. La iniciación comienza cuando la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) reconoce un estado de inanición celular y fosforila al complejo mTORC1 para inactivarlo y en seguida se desprende del complejo cinasa activadora de autofagia (ULK1, compuesto por su homónimo ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101), lo cual permite la activación de ULK1 que fosforila a ATG13 y FIP200, y la formación del fagóforo, una hoja curva que se desprende de la membrana que la formó. Por otro lado, la elongación inicia cuando el complejo PI3K

formado por VPS34, VPS15, ATG14L y Beclin1 permiten el crecimiento y expansión del fagóforo, aquí, un componente muy importante es LC3 lipidado (LC3 II) que se encuentra en ambos lados del autofagosoma (Figura 8). Regula la expansión y la maduración del autofagosoma, por tal razón es utilizado ampliamente como un marcador del flujo autofágico. Por último, el complejo PI3K de clase II activa a la Rab-7 e induce su actividad GTPasa que inicia la fusión del autofagosoma con lisosomas maduros para formar autofagolisosomas, que finalmente degradan el cargo por acción de las lisozimas. Sin embargo, este proceso está claramente desregulado en células neoplásicas. Durante la tumorigénesis en etapas tempranas funciona como supresor tumoral, por el contrario, en etapas tardías confiere una mayor capacidad de inmunoresistencia, y tiene un papel importante en la reprogramación del metabolismo celular, en la latencia de los tumores y en la invasión tumoral, por lo que juega un papel dual en este proceso (Lamb, 2013; Thuwajit, 2018; Mattosco, 2018).

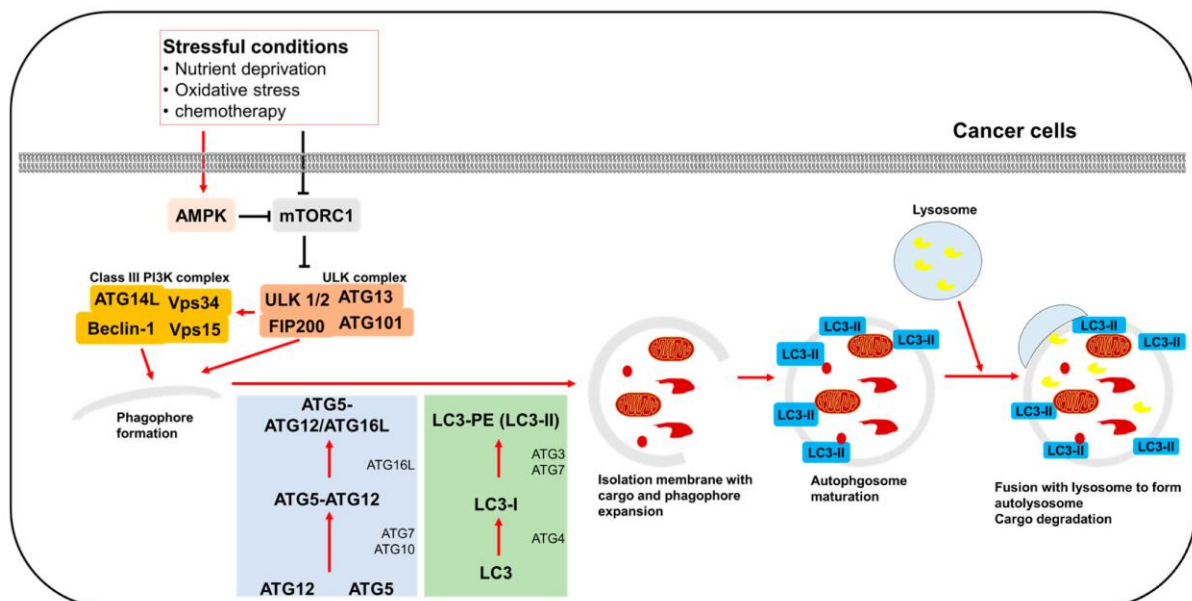


Figura 8. Regulación de la vía autofágica en células tumorales. Tomado de Yun, C. W. (2018).

Por otra parte, existe evidencia que muestra que la estimulación de la vía CD95, así como la vía de IL-2, están asociadas a la activación de la autofagia (Mukhopadhyay, 2014; Park, 2010). Según lo reportado por Zhang y colaboradores en 2008, así como por Cho y colaboradores en 2009, la activación de la autofagia por CD95 o TRAIL, suprime la apoptosis en células HeLa. Por tanto, la autofagia juega un papel protector contra la apoptosis. Por otra parte, la acción de IL-2 en tejido hepático en tratamientos con dosis altas (1.5×10^6 UI) induce un mayor flujo autofágico que lleva a la conversión de LC3I a LC3II y por tanto, la formación de autofagosomas. Algo similar se observó en fibroblastos embrionarios de ratón cuando se trataron con 6000-12000 UI de IL-2, sin embargo, el bloqueo de la autofagia indujo apoptosis. Curiosamente, también se ha observado que en modelos de co-cultivos de células tumorales con linfocitos T o células NK y en presencia de IL-2 (500 UI) se induce el aumento de focos

fluorescentes de LC3II, lo que indica la presencia de autofagosomas (Liang, 2012; Kang, 2013; Buchser, 2012).

Autofagia y VPH

Las oncoproteínas del VPH 16 juegan un papel dual sobre la autofagia en diferentes etapas del proceso. Por un lado, se sabe que la expresión ectópica de E5 de VPH 16 en queratinocitos inhiben la formación del fagóforo, esto tras regular a la baja LC3 II, lo que impide la degradación de p62, además regula a la baja los ARNm de LC3, Beclina 1, ATG5, ULK 1 y ATG 7, proteínas importantes en la formación del fagóforo. Por otro lado, se ha visto que E6 y E7 inducen un aumento de LC3 II y p62 lipidado, sin embargo, a pesar de la formación del autofagosoma, bloquean la fusión con el lisosoma maduro (Mattoscio, 2018). También, se ha reportado que, en células de cáncer cervicouterino, las oncoproteínas E6 y E7 de VPH 16 activan el proceso autofágico a través de la aceleración de formación y degradación de autofagosomas, todo esto regulado por ATG9 y LAMP 1 (Tingting, 2019). Adicionalmente, los resultados obtenidos por Salazar en 2019 muestran que células HeLa tratadas con el anticuerpo agonista DX2 de CD95 conducen a un incremento de los focos positivos para proteína LC3B (característicos en autofagia).

Por otra parte, se ha reportado que la proteína STAT3 regula el proceso de autofagia. STAT3 nuclear regula la transcripción de genes relacionados con la inducción y la inhibición de la autofagia. Sin embargo, STAT3 citoplásmico inhibe la autofagia al secuestrar a EIF2AK2, e interactuar con otras moléculas de señalización relacionadas con la autofagia, como FOXO1 y FOXO3. Además, la translocación mitocondrial de STAT3 suprime la autofagia inducida por el estrés oxidativo y puede evitar que las mitocondrias sean degradadas por la mitofagia. Sin embargo, algunos estudios muestran que la inhibición de STAT3 induce la activación del proceso autofágico (You, 2015).

En resumen, las vías CD95/CD95L e IL-2R/IL-2 juegan un papel importante en diferentes tipos de cáncer, en la regulación de la muerte celular y en la regulación de la autofagia. Estos antecedentes muestran el papel de la IL-2 sobre la activación del sistema inmune, pero de forma aún más interesante su efecto sobre las células tumorales. Por tal razón pensamos que su uso podría favorecer la sensibilidad de las células tumorales a la inducción de muerte celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las líneas celulares tumorales cervicales VPH⁺ expresan el receptor de muerte CD95. Sin embargo, se ha observado que son altamente resistentes a la inducción de apoptosis por dicha vía. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con altas dosis de IL-2 induce una disminución en la proliferación de las células tumorales cervicales por detención en la fase G1 del ciclo celular, proceso que podría favorecer la inducción de apoptosis o autofagia mediante la activación de la vía CD95, y esto podría depender del tipo de VPH presente. Por tal razón, es necesario evaluar si el

tratamiento de células tumorales cervicales SiHa (VPH16⁺) y HeLa (VPH18⁺) con IL-2 más agonistas de CD95 afectan la proliferación, la inducción de apoptosis y la activación de la autofagia.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública en México, ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad en la población femenina. Debido a que un alto porcentaje de cánceres de cuello uterino son positivos para VPH 16 y 18, y además, estos serotipos presentan mayor resistencia a la apoptosis, se decidió evaluar si el tratamiento simultáneo con altas dosis de IL-2 más anti-CD95 favorecen la muerte celular por apoptosis y el proceso autofágico.

HIPÓTESIS

El tratamiento con bajas dosis de IL-2 y anti-CD95 promueve la proliferación celular, mientras que el tratamiento con altas dosis de IL-2 más bajas dosis de anti-CD95 promueve la autofagia, pero no la apoptosis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del tratamiento simultáneo con altas dosis de IL-2 (100 UI/mL) y el anticuerpo agonista anti-CD95 en células SiHa y HeLa de cáncer de cérvix sobre la proliferación, apoptosis y la autofagia.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar proliferación en células SiHa y HeLa tratadas con 10 y 100 UI/mL de IL-2.
2. Determinar la presencia de CD95 y CD95L en células SiHa y HeLa
3. Determinar proliferación en células SiHa y HeLa tratadas con diferentes concentraciones de anti-CD95 (CH11 y DX2).
4. Determinar proliferación en células SiHa y HeLa bajo tratamientos simultáneos de IL-2 más anti-CD95 (CH11).
5. Determinar apoptosis en células SiHa y HeLa tratadas con 10 y 100 UI/mL de IL-2, con diferentes concentraciones de anti-CD95 (CH11 y DX2), así como tratamientos simultáneos de IL-2 más anti-CD95.
6. Determinar LC3B en células SiHa y HeLa tratadas con 10 y 100 UI/mL de IL-2, con diferentes concentraciones de anti-CD95 (CH11), así como tratamientos simultáneos de IL-2 más anti-CD95.

MATERIAL Y MÉTODO

Líneas celulares

Se cultivó la línea celular SiHa (ATCC) en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) a 37°C y con 5% de CO₂. La línea celular HeLa (ATCC) se cultivó en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) a 37 °C y con 5% de CO₂.

Ensayo de proliferación celular

Se colocaron 1.5×10^3 células por pozo en una placa de 96 pozos durante 24 horas a 37°C, para permitir su adherencia. Posteriormente se estimularon con 10 UI/mL de IL-2 o 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante (R&D Systems), pasadas 48 horas se volvieron a estimular con 10 UI/ml de IL-2 o 100 UI/mL de IL-2, además de diferentes concentraciones de anti-CD95 10, 20 y 25 ng/mL CH11 (Beckman Coulter) durante otras 48 h para los tratamientos en conjunto. Pasado el tiempo se retiró el medio y las células fueron fijadas con glutaraldehído (SIGMA-ALDRICH) al 1.1% durante 10 minutos. Después se realizó un lavado con agua destilada. Las células se tiñeron con cristal violeta (SIGMA-ALDRICH) al 0.1% durante 20 minutos. Para finalizar, se hizo un lavado con agua destilada y se añadió ácido acético al 10% durante 20 minutos. Se realizó la lectura en un lector Microplate Reader (Modelo 3550, BIO-RAD) a una absorbancia de 595 nm.

En el caso de la evaluación de la proliferación para la activación de la vía no canónica de CD95 tras el estímulo con diferentes concentraciones de anti-CD95 10, 20 y 25 ng/mL CH11 (Beckman Coulter) o 100, 200 y 400 ng/mL de la clona DX2 (Biolegend), se realizó todo lo anteriormente señalado, excepto por los estímulos con IL-2. Dentro de estas dos clonas, DX2 se ha caracterizado como la menos competitiva de unión al receptor CD95, por tanto, también presenta una menor eficacia o umbral de activación comparada con la clona CH11 (Chodorge, 2012).

Determinación de CD95 extracelular y CD95L intracelular por citometría de flujo

Para CD95L, se colocaron 1×10^6 células en tubos eppendorf de 1.5 mL. Se agregaron 200 µL de solución de fijación permeabilización (Cytofix/cytoperm BD Biosciences) y se incubó en oscuridad durante 20 min a 4°C. En el caso de CD95, una vez que se colocaron las células en tubos eppendorf se agregaron 200 µL de Buffer 1X perm wash (BD), se agitó y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante. Seguido, se resuspendió en 100 µL de perm wash 1X (BD), cada muestra con su respectivo control de auto-fluorescencia (CAF). Después, se agregaron 4 µL de anti-CD95/FITC (BD Pharmigen) o 1 µL de anti-CD95L/APC (Abcam), únicamente a los tubos marcados como “teñidos” y se incubaron protegidos de la luz durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Transcurrido el tiempo se agregaron 200 µL de perm wash 1X se agitó y se centrifugó a 3500 rpm durante 1

min. Se decantó el sobrenadante y finalmente se realizó el análisis de 10,000 eventos en el citómetro de flujo (FACS ARIA II, BD). Los resultados se analizaron con ayuda del software Kaluza.

Determinación de CD95 extracelular y CD95L intracelular por microscopía confocal

Se colocaron 10×10^3 células en cajas de fondo de vidrio (NEST Biotechnology, 15 mm), se incubaron por 24 horas. Se retiró el medio, se hicieron dos lavados con PBS, en seguida se agregaron 750 μ L de Cytotfix/Cytoperm, y se incubaron las muestras por una hora a 4°C en oscuridad. Se hicieron dos lavados con Perm wash 1X (750 μ L). Posteriormente, se agregaron 3 μ L anti-CD95 (BD Pharmigen) o 1.5 μ L anti-CD95L (Abcam) en 750 μ L de PBS, respectivamente, y se incubaron las muestras toda la noche a 4 °C protegidas de la luz. Se hicieron dos lavados con 750 μ L de perm wash al 1X, para posteriormente agregar DAPI (Nuc Blue, Thermo Fisher). Se incubaron las muestras por 1.30 h a 4 °C protegidas de la luz. Finalmente, se hizo un lavado con PBS. Se agregó medio de montaje y se visualizó en microscopio confocal Leica para adquirir las imágenes en un aumento 40X.

Evaluación de muerte celular por anexina V/PI

Se colocaron 250×10^3 células en cajas de Petri y se incubaron por 24 horas. Después de este tiempo las células se estimularon con 10 UI/ml de IL-2 o 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante (R&D Systems) durante 48 horas. Después, se volvieron a estimular con 10 o 100 UI/mL de IL-2 y 20 ng/mL de anti-CD95 CH11 (Beckman Coulter), en tratamientos simultáneos durante otras 48 h. Utilizamos 2 μ g/mL de Cisplatino (Pisa) como control positivo. Transcurridos los tiempos de incubación las células se despegaron con verseno y se recuperaron en tubos para citometría, se lavaron con 200 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 3500 rpm durante 1 min. Posteriormente, se resuspendieron en 100 μ L/mL de Buffer Anexina 1X (BD). La muestra control se separó y al resto de muestras se tiñeron con 2.5 μ L/mL de Anexina-V/FITC y 2.5 μ L/mL de yoduro de propidio (IP) (BD KIT II), inmediatamente se realizó la lectura por citometría de flujo al adquirir 10,000 eventos (FACS ARIA II, BD). Los resultados se analizaron en el software Kaluza.

Determinación de PARP escindida (cPARP) y pH2AX por citometría de flujo

Se colocaron 250×10^3 células en cajas de Petri y se incubaron por 24 horas. Después, las células se estimularon con 10 UI/ml de IL-2 o 100 UI/mL de IL-2 humana recombinante (R&D Systems) durante 48 horas, para volver a estimular con 10 o 100 UI/mL de IL-2 y 20 ng/mL de anti-CD95 CH11 (Beckman Coulter), en tratamientos simultáneos durante otras 48 h. Utilizamos 2 μ g/mL de Cisplatino como control positivo. Transcurridos los tiempos de incubación, las células se despegaron con verseno y se recuperaron en tubos para citometría, se lavaron con 200 μ L de PBS 1X y se centrifugaron a 3500 rpm durante 1 min. Se agregaron 200 μ L de solución de

fijación permeabilización (Cytotfix/cytoperm BD Biosciences) y se incubaron las muestras protegidas de la luz durante 40 min a 4°C; posteriormente se agregaron 200 µL Buffer 1X perm wash (BD), se agitó y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante. En seguida, se resuspendió en 100 µL de perm wash 1X (BD) cada muestra con su respectivo control de auto fluorescencia (CAF). Después, se agregaron 1.5 µL de anti-PARP/PE (BD Bioscience) y 1.5 µL de anti-pH2AX/APC (BD Bioscience), únicamente a los tubos marcados como “teñidos” y se incubaron protegidas de la luz durante 1 h a 4°C en agitación. Utilizamos 2 µg/mL de Cisplatino (Pisa) como control positivo. Transcurrido el tiempo se agregaron 200 µL de perm wash 1X, se agitó y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 200 µL de PBS y finalmente se realizó la lectura en el citómetro de flujo al adquirir 10,000 eventos. Los resultados se analizaron con el software Kaluza.

Determinación de cPARP y LC3B por microscopía confocal

Se colocaron 10,000 células en cajas de fondo de vidrio (NEST Biotechnology, 15 mm), se incubaron por 24 horas. Se estimularon con 10 UI/mL de IL-2 o 100 UI/mL de IL-2 durante 48 horas, para volver a estimular con 10 o 100 UI/mL de IL-2 más 20 ng/mL de anti-CD95 CH11 (Beckman Coulter) o 200 ng/mL de la clona DX2 (Biolegend), en tratamientos simultáneos. Se agregó Cisplatino (Pisa) como control positivo durante otras 48 h. Se retiró el medio, se hicieron dos lavados con PBS, se agregaron 750 µL de Cytotfix/Cytoperm y se incubaron las muestras protegidas de la luz por 1 h a 4° C. Posteriormente, se hicieron dos lavados con Perm wash 1X (750 µL). Después, se agregaron 2.5 µL de anti-cPARP/PE (BD Bioscience) o 3.75 µL anti-LC3B (Santa Cruz Biotechnology) en 750 µL de PBS y se incubaron las muestras protegidas de la luz toda la noche a 4 °C. En el caso de LC3B, posteriormente se agregó 1.5 µL de anti mouse-FITC (Sigma) y se incubaron las muestras protegidas de la luz por 2 h a 4° C. Después, se hicieron dos lavados con 750 µL de Perm wash al 1X, para posteriormente agregar DAPI e incubar por 1.30 h a 4 °C en oscuridad. Se hicieron dos lavados con PBS, seguido se agregó medio de montaje. Finalmente, se analizaron las células en el microscopio confocal Leica para adquirir las imágenes en un aumento 40X.

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados se expresan como la media ± DE. Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Bonferroni para corregir las comparaciones múltiples y los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El tratamiento con IL-2 promueve un aumento y una disminución de la proliferación de células SiHa y HeLa

Las células SiHa y HeLa se trataron con 10 y 100 UI/mL de IL-2 por 96 h con re-estímulo a las 48 h y se determinó su proliferación. En la figura 9 a) se observa que las células SiHa incrementan su proliferación en un 38% cuando son tratadas con 10 UI/mL de IL-2 con respecto a las células sin estímulo de IL-2 (SE) mientras que cuando son tratadas con 100 UI/mL disminuyen su proliferación en un 35% con respecto a las células SE. En el caso de las células HeLa, figura 9 b), el tratamiento con 10 UI/mL de IL-2 induce un aumento del 42% en la proliferación con respecto a las células no tratadas con IL-2 por el contrario, con el tratamiento de 100 UI/mL se observa una disminución del 32% respecto a su control. Encontramos un comportamiento similar en ambas líneas celulares.

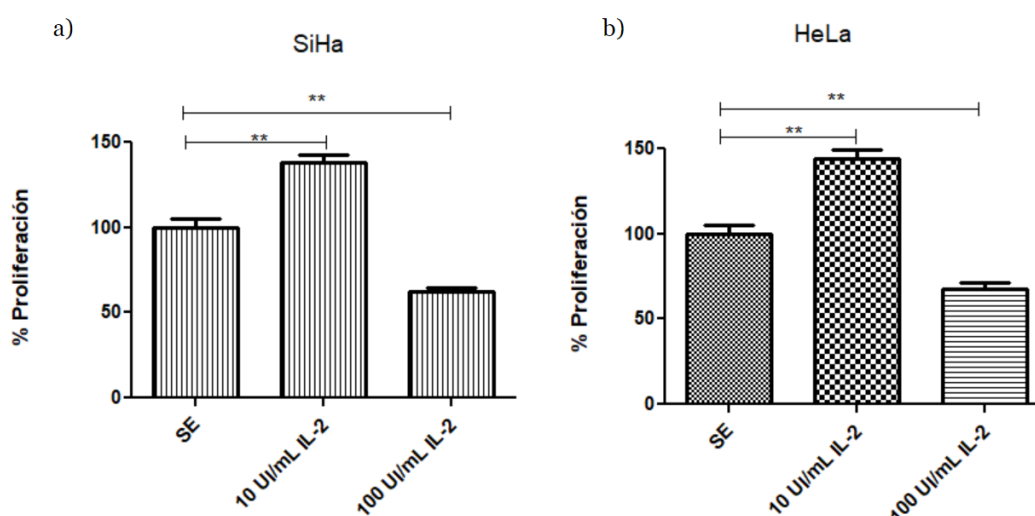


Figura 9. Proliferación en células cervicales tumorales tratadas con IL-2. Las dos líneas celulares SiHa a) y HeLa b) fueron tratadas por 96 horas con IL-2, con un re-estímulo a las 48 horas. Se observa un aumento o una disminución en su proliferación, dependiendo de la dosis con las que se trataron con respecto a las células sin estímulo (SE). Los resultados se expresan como la media \pm DE, n=5, **P < 0.001.

Presencia de CD95 y CD95L en células SiHa y HeLa

Se evaluó la presencia del receptor CD95 y su ligando CD95L de forma basal (no se les dio ningún tratamiento) por citometría de flujo. Se hicieron tinciones extracelulares para detectar CD95 y tinciones intracelulares para la detección de CD95L con anticuerpos específicos. En la figura 10 a) y b), correspondiente a células SiHa, se encontró que CD95 se expresa en un 61.83% de las células y el ligando se expresa hasta en un 96.83% de las células. En la figura 10 c) y d) que corresponde a la línea celular HeLa, también se encontró CD95, se expresa en un 73.99% de las células, en el caso del ligando hay una expresión del 97.89%. Para confirmar estos resultados y determinar la localización celular, decidimos evaluar la presencia por medio de

microscopía confocal, donde también pudimos observar el receptor y el ligando de CD95, así como una posible interacción de ambas moléculas tras hacer el merge, figura 11 a) y b).

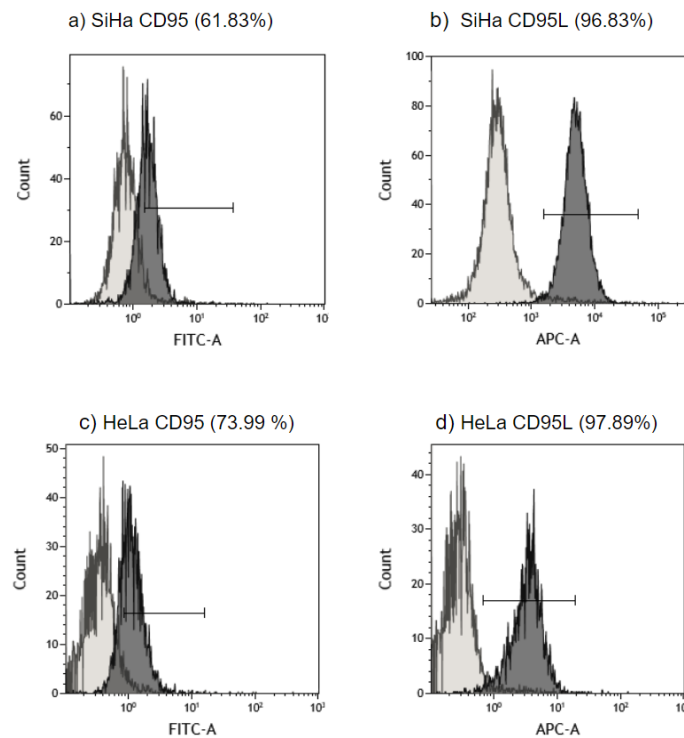
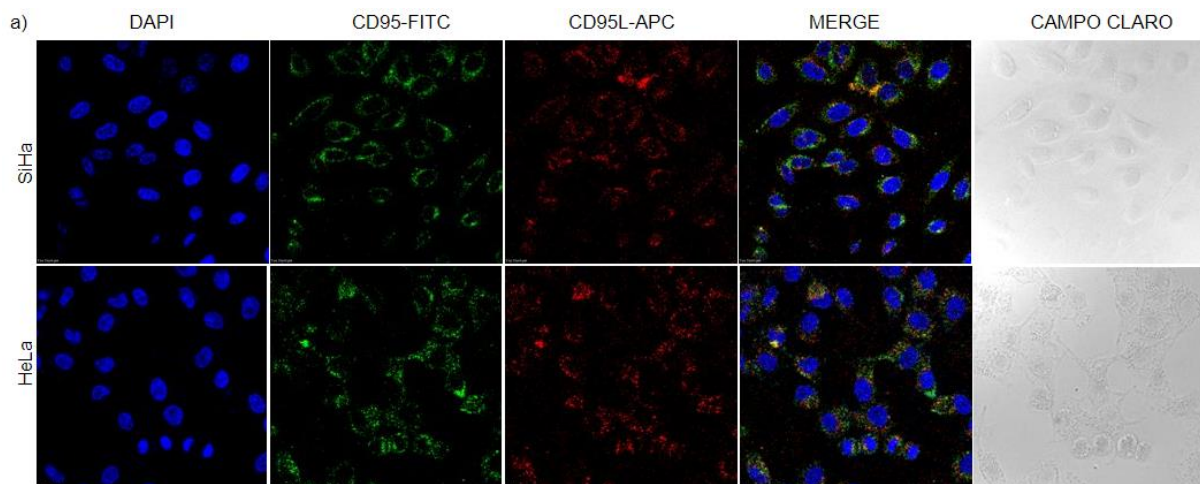


Figura 10. Presencia de CD95 y CD95L de forma basal. Las células SiHa a) y b); HeLa c) y d) se tiñeron de forma extracelular con 4 μ l de anti-CD95 acoplado a FITC y con 1 μ l de anti-CD95 L acoplado a APC.



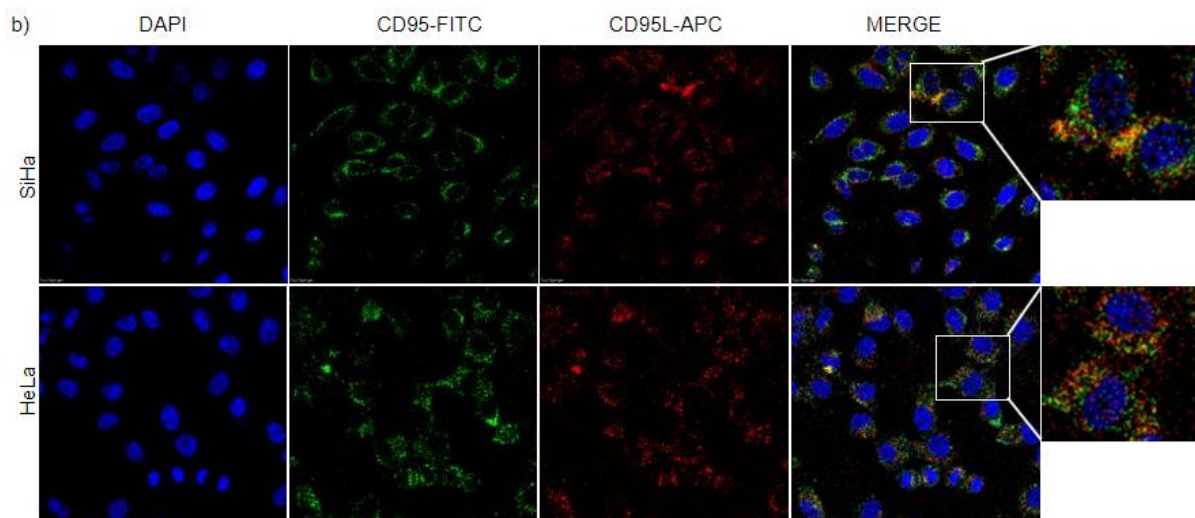


Figura 11. Localización celular y co localización de CD95 y CD95L de forma basal en células SiHa y HeLa. a) Las células SiHa y HeLa se tiñeron con DAPI para núcleo, 4 μ l anti-CD95-FITC y 1 μ l de anti-CD95L-APC. Así mismo, se realizó una combinación (merge) de las fluorescencias. Aumento 40X. b) Aumento de las posibles interacciones de CD95 y CD95L en células SiHa y HeLa.

Activación de la vía no canónica de CD95 en células SiHa y HeLa al ser tratadas con anticuerpos agonistas de CD95 (CH11 y DX2).

Las células SiHa y HeLa fueron tratadas con anticuerpos agonistas para CD95, esto con el fin de evaluar su efecto sobre la proliferación. Se trataron únicamente con las clonas CH11 (10, 20 y 25 ng/mL) y DX2 (100, 200 y 400 ng/mL) a las 48 horas del cultivo, para finalmente evaluar la proliferación a las 96 horas. En las células SiHa se observó un aumento en la proliferación tras ser estimuladas con las diferentes concentraciones de las dos clonas, excepto para la concentración 400 ng/mL de DX2, donde no se observa variación alguna con respecto a las células sin estímulo (SE), figura 12 a) y b). Un comportamiento similar se encontró en células HeLa, las tres concentraciones de la clona CH11 inducen el aumento en la proliferación celular, así como las concentraciones de la clona DX2, figura 12 c) y d). Estos resultados indican que bajas dosis de las clonas usadas activan la vía no canónica de CD95 e inducen un aumento en la proliferación de estas células tumorales. Debido a que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones usadas, se decidió usar 20 ng/mL de CH11 o 200 ng/mL de DX2 en los ensayos subsecuentes.

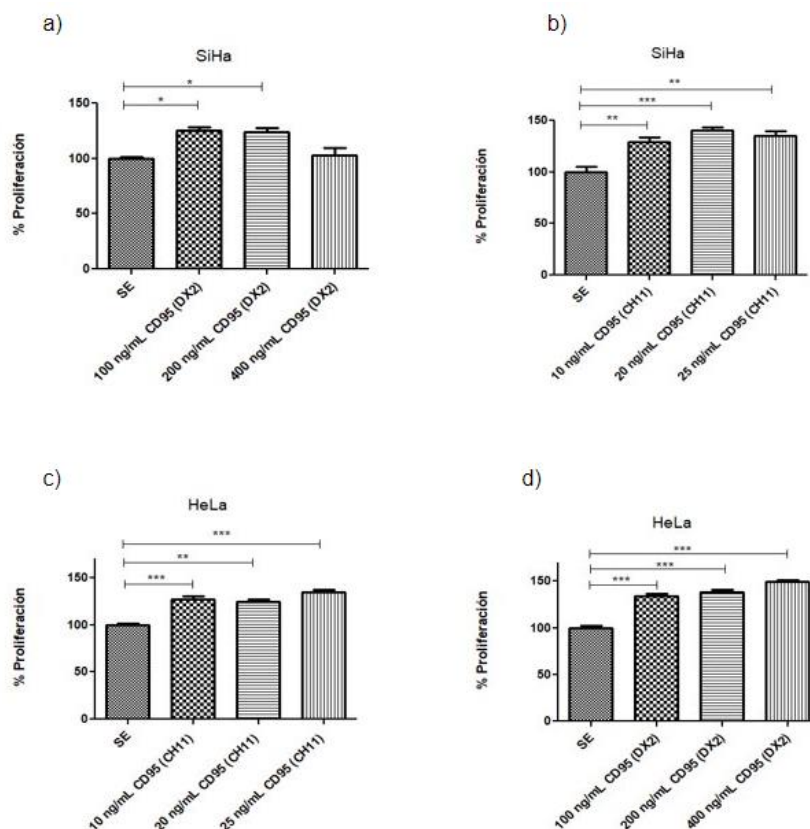


Figura 12. Activación de la vía no canónica de CD95 en células VPH⁺. Células tratadas con concentraciones de 10, 20 y 25 ng/mL para CH11 y 100, 200 y 400 ng/mL para DX2. Se observa un aumento de la proliferación celular bajo todas las condiciones en tratamientos a 48 horas. SiHa a) y b); HeLa c) y d). Los resultados se expresan como la media \pm DE, n=5, *P<0.01, **P<0.001 y ***P<0.0001

El tratamiento simultáneo de bajas dosis de IL-2 más el anticuerpo agonista CD95 (CH11) no induce una proliferación acumulativa. CD95 libera a las células tumorales del arresto inducido por 100 UI/mL de IL-2.

Las células SiHa y HeLa se trataron, o no, previamente con IL-2; después, se agregó el anticuerpo agonista de CD95 (CH11) en concentraciones de 10, 20 y 25 ng/mL. Se observó, tal y como se muestra en la figura 13 a) y c) que en ambas líneas hay un aumento en la proliferación celular cuando se tratan con 10 UI/mL de IL-2 más 10, 20 o 25 ng/mL de CD95. Sin embargo, este aumento no es acumulativo con respecto al tratamiento de las condiciones de manera individual. Por otro lado, cuando las células se trataron previamente con 100 UI/mL de IL-2 más las diferentes concentraciones de CD95 hubo una recuperación de la proliferación con respecto a las células tratadas únicamente con 100 UI/mL de IL-2, pero fue menor en comparación a las células tratadas solo con el agonista de CD95. Esto nos sugiere que, bajo este tratamiento, CD95 libera del arresto a estas células. Figura 13 b) y d).

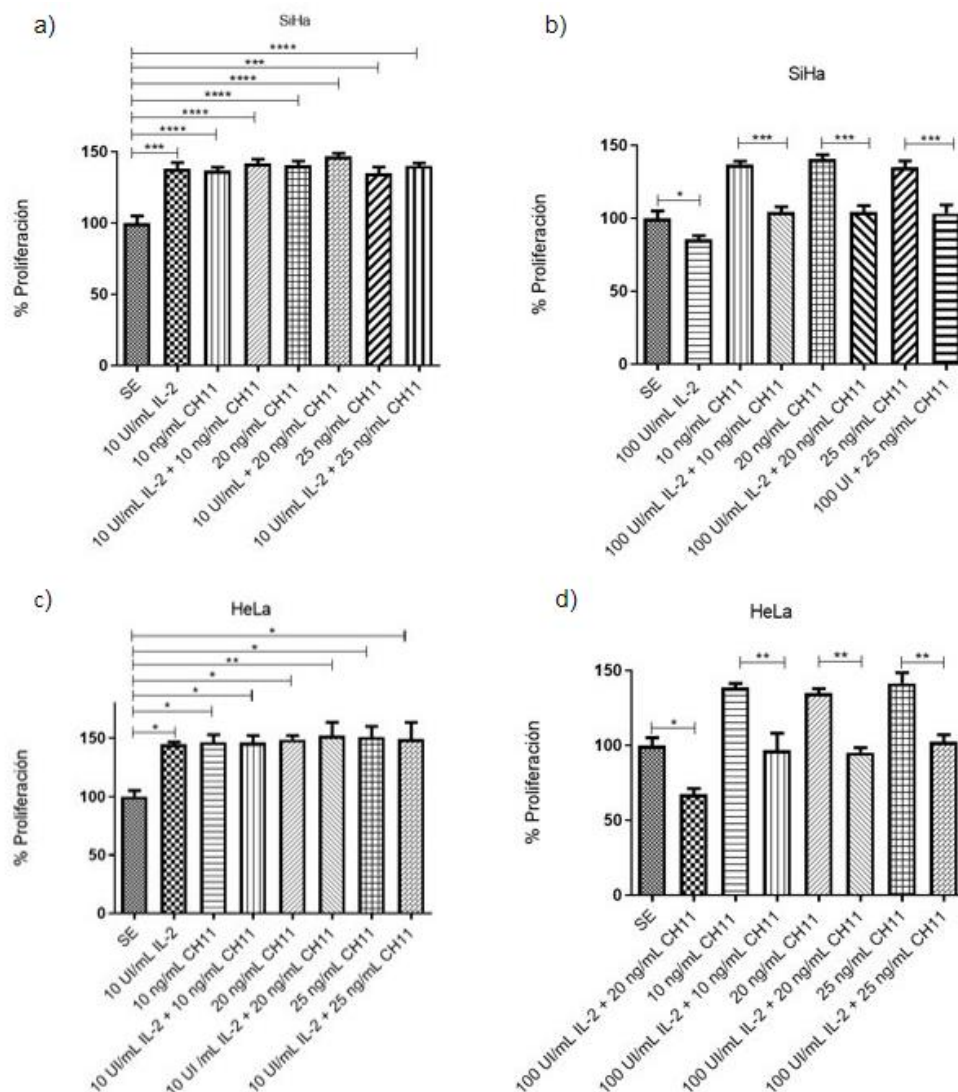


Figura 13. Tratamientos simultáneos de IL-2 más CD95. Las células se trataron previamente, o no, con 10 y 100 UI/mL de IL-2 durante 48 horas, seguido de una re-estimulación con 10 o 100 UI/mL de IL-2 más diferentes concentraciones de CD95 por otras 48 horas. SiHa a) y b); HeLa c) y d). Los resultados se expresan como la media \pm DE, n=5, *P<0.01, **P<0.001 y ***P<0.0001

El tratamiento con IL-2, anti-CD95 y tratamientos simultáneos no induce apoptosis en células SiHa y HeLa

Las células HeLa se trataron con 10 y 100 UI/mL de IL-2 y se observó que no hay una muerte celular por apoptosis en comparación con el tratamiento con cisplatino, que se usó como control positivo. También, el tratamiento se hizo con la clona DX2 (200 ng/mL) y tratamientos simultáneos con IL-2 en donde no se observó muerte celular significativa (Figura 14). Se obtuvieron resultados con una tendencia similar en células SiHa, sin embargo, no se muestran debido a que se presentaron algunos problemas técnicos durante la adquisición. Entonces, para dilucidar el efecto de los tratamientos sobre éstas células, decidimos evaluar la presencia de PARP escindida (cPARP) por medio de microscopía confocal. Los resultados muestran que cPARP no aumentó

significativamente cuando las células se trataron con las diferentes condiciones de IL-2 y CD95 con respecto a las células no tratadas (Figura 15).

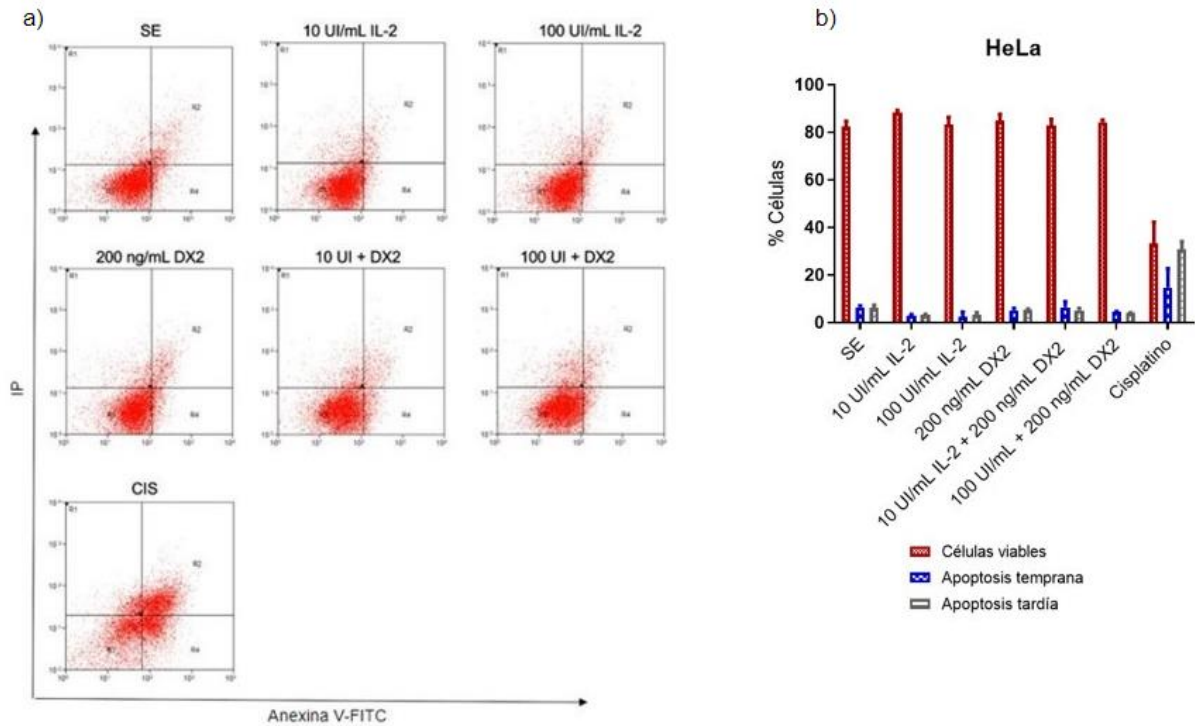
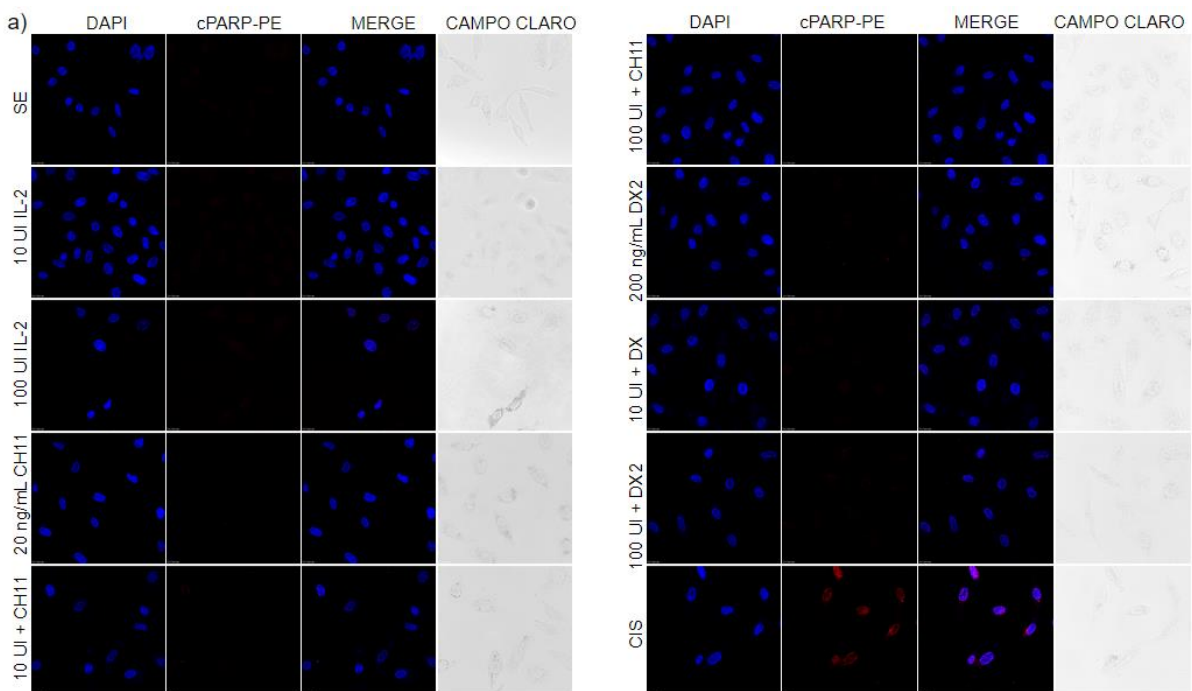


Figura 14. Determinación de muerte celular por Annexina V/IP. a) Tras el estímulo con IL-2 por 48 horas, seguido de tratamientos simultáneos de IL-2 más CD95 por otras 48 horas se midió la apoptosis temprana y tardía a través de citometría de flujo. Los Dot Plots son representativos de 2 experimentos independientes bajo los mismos tratamientos en donde se obtuvieron resultados similares. Como control positivo se utilizó una IC50 de Cisplatino, 2 μ g/mL. b) La gráfica expresa los resultados de los dot plots como la media \pm DE, n=2.



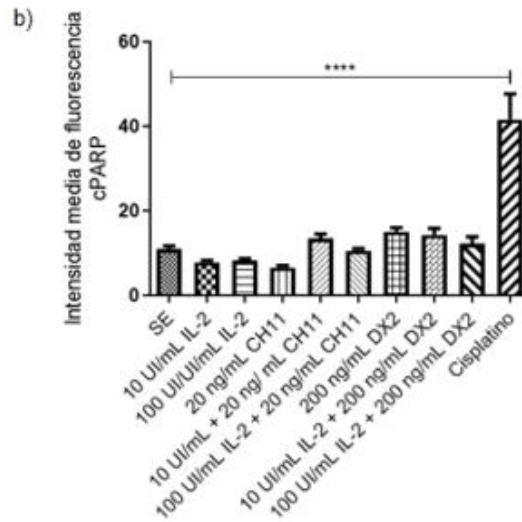


Figura 15. Presencia de PARP escindida (cPARP) en células SiHa mediante microscopía confocal. Las células se trataron previamente con IL-2 durante 48 horas, seguido de un re-estímulo más las dos clonas anti-CD95 CH11 y DX2 por otras 48 horas. Se hizo una tinción con DAPI para núcleos, 1.5 μ L de cPARP-PE, así como un merge de las fluorescencias a); gráfica de la intensidad media de fluorescencia de cPARP b). Como control positivo se utilizó una IC50 de Cisplatino, 2 μ g/mL. Los datos se expresan como la media \pm DE, n=5, ***P<0.0001.

Además, se evaluó nuevamente la presencia de cPARP y p $\text{H}2\text{AX}$, una histona relacionada con la reparación de rotura de doble cadena del ADN, por tanto, un indicador de apoptosis, mediante citometría de flujo; en este caso tampoco se observó promoción de la apoptosis de las células tratadas con las condiciones indicadas (Figura 16).

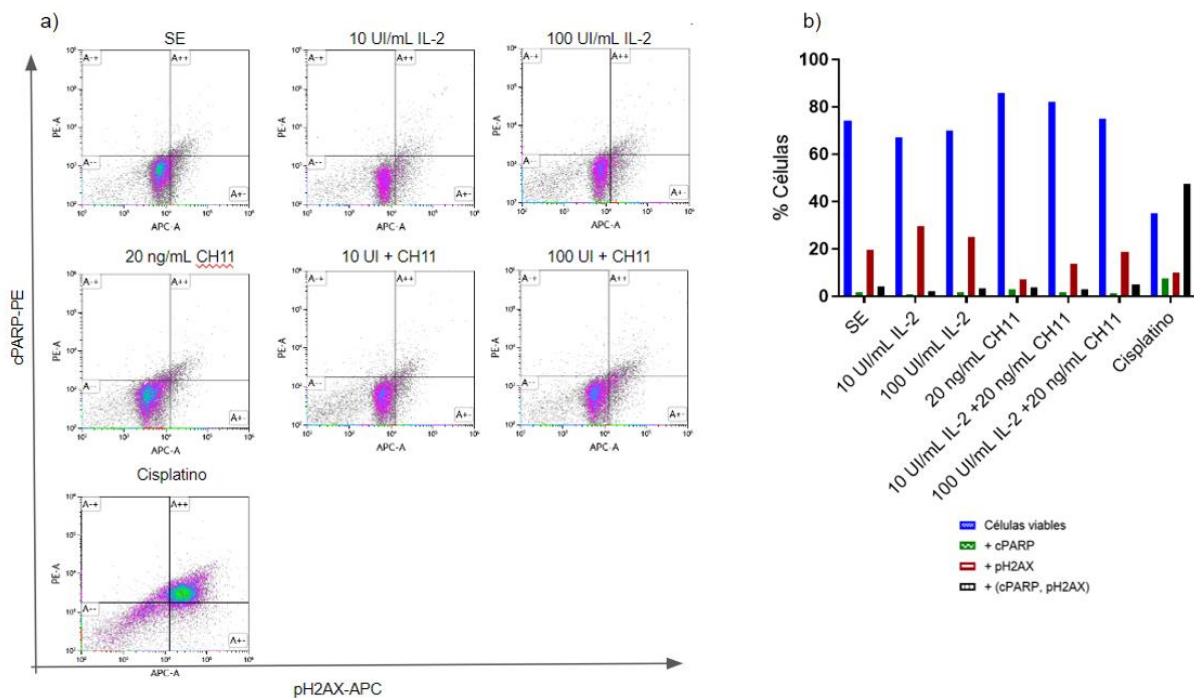


Figura 16. Evaluación de PARP escindida (cPARP) y pH2AX en células SiHa mediante citometría de flujo. Las células se trataron previamente con IL-2 durante 48 horas, seguido de un re-estímulo más la clona CH11 por otras 48 horas. a) Por cada Dot Plot el cuadrante inferior izquierdo representa células vivas negativas para pH2AX y cPARP, el cuadrante inferior derecho células positivas para pH2AX, el cuadrante superior izquierdo células positivas para cPARP y el cuadrante superior derecho a células dobles positivas para pH2AX y cPARP, es decir células apoptóticas. b) Gráfica del porcentaje total de células. Como control positivo se utilizó una IC50 de Cisplatino 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los datos se expresan como la media \pm DE.

Las líneas celulares SiHa y HeLa expresan la proteína autofágica LC3B

Anteriormente se observó que tratamientos con IL-2, y concentraciones de un anticuerpo agonista anti-CD95 promueven un aumento en la proliferación celular de las líneas celulares VPH⁺, por lo tanto, se decidió buscar si estas células tienen activa alguna vía de supervivencia como la autofagia, por lo que se hizo una tinción específica para determinar la expresión de la proteína LC3B, marcador muy utilizado para evaluar el flujo autofágico. Se encontró que cuando las células se trataron solo con 10 o 100/mL UI de IL-2, hubo una regulación a la baja de la proteína. Sin embargo, cuando se trataron previamente con 10 o 100 UI/mL de IL-2 a las 48 horas, seguido con el anticuerpo agonista CH11 de CD95 por otras 48 horas, la expresión de la proteína LC3B aumentó significativamente en comparación a las células no tratadas (Figuras 17 y 18).

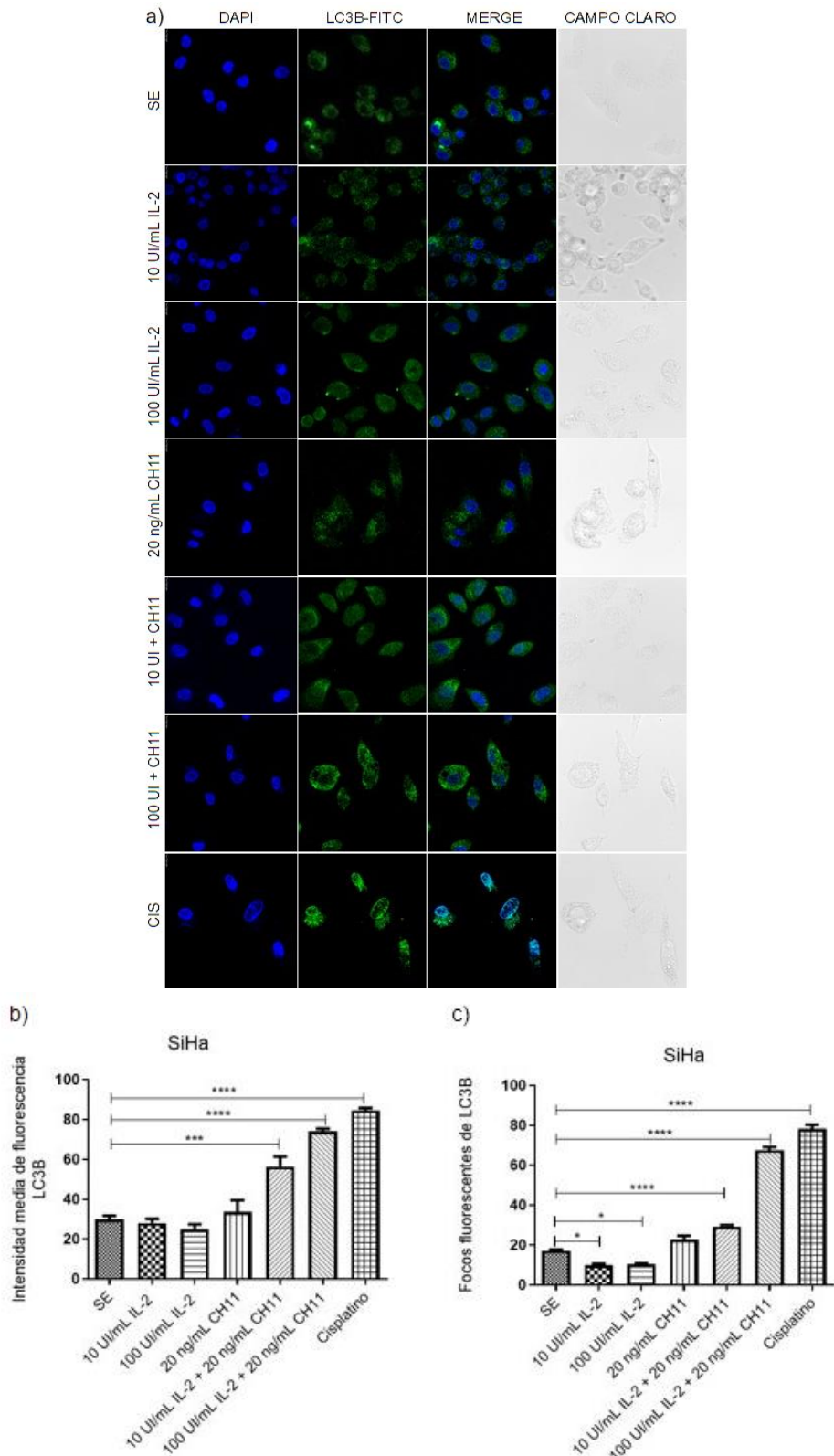


Figura 17. Determinación de LC3B por microscopía confocal en células SiHa. Las células se trataron previamente con IL-2 durante 48 horas, seguido de un re-estímulo más la clona CH11 por otras 48 horas. a) Se realizó una tinción con DAPI para núcleos, 3.75 μ L de anti-LC3B para autofagosomas, así como un merge de las fluorescencias. b) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de LC3B, medida con ayuda del software Fiji. c) Gráfica de focos fluorescentes positivos para LC3B. Como control positivo se utilizó una IC50 de Cisplatino, 2 μ g/mL. Los datos se expresan como la media \pm DE, n=5, **P<0.001 y ***P<0.0001

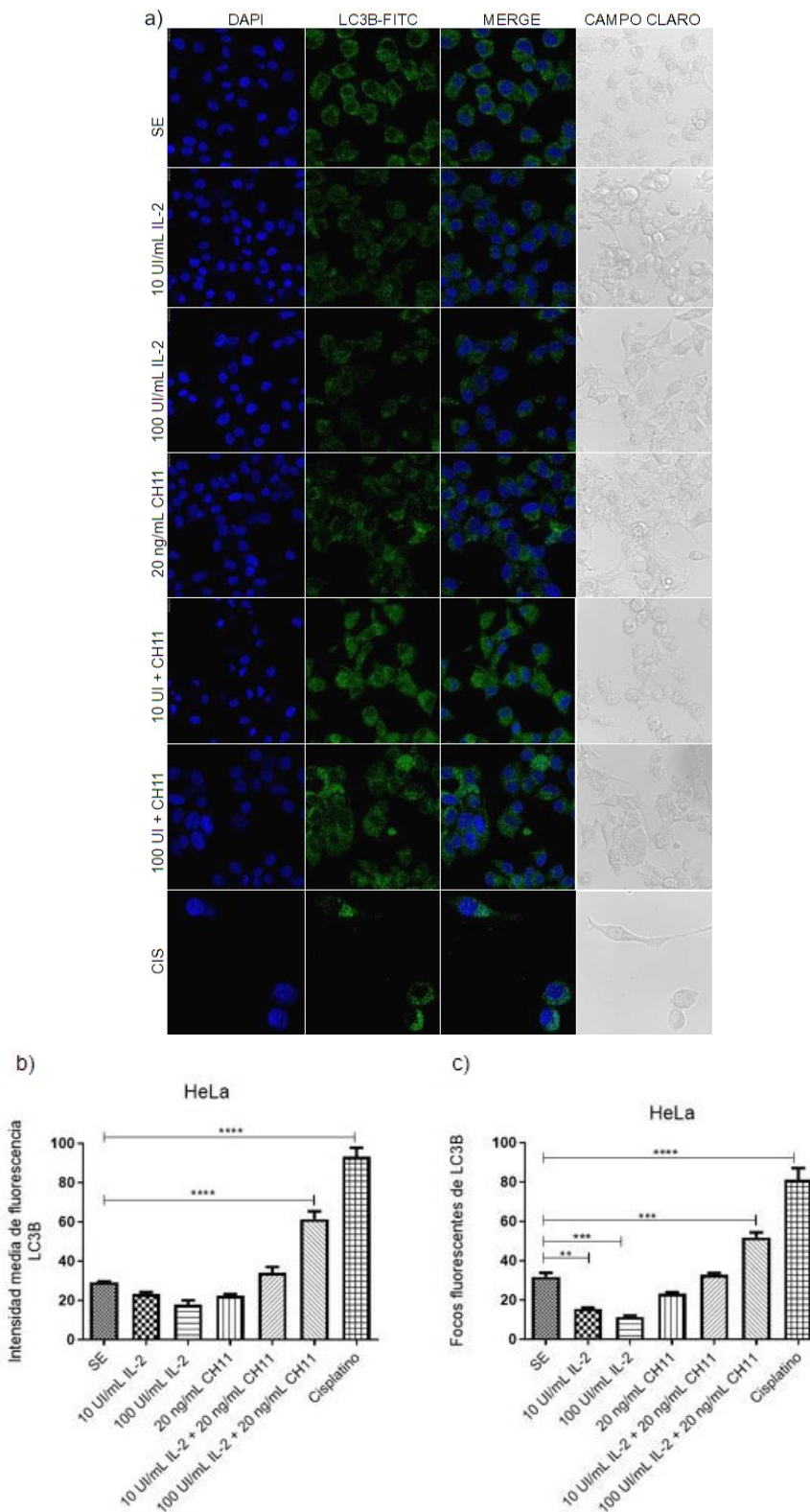


Figura 18. Determinación de LC3B por microscopía confocal en células HeLa. Las células se trataron previamente con IL-2 durante 48 horas, seguido de un re-estímulo más la clona CH11 por otras 48 horas. a) Se realizó una tinción con DAPI para núcleos, 3.75 μ L de anti-LC3B, así como un merge de las fluorescencias. b) Gráfica que representa la intensidad media de fluorescencia de LC3B, medida con ayuda del software Fiji. c) Gráfica de focos fluorescentes positivos para LC3B. Como control positivo se utilizó una IC50 de Cisplatino, 2 μ g/mL. Los datos se expresan como la media \pm DE, n=5, **P<0.001 y ***P<0.0001

DISCUSIÓN

El cáncer de cérvix tiene una alta prevalencia y mortalidad a nivel mundial, así como también en México. Se ha reportado que las células tumorales cervicales son altamente resistentes a la inducción de muerte celular debido a diversos mecanismos de evasión, a pesar de que se ha reportado que estas células expresan en alto porcentaje el receptor CD95. Bajo este contexto, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que altas dosis de IL-2 inducen una disminución en la proliferación en líneas celulares tumorales cervicales debido a una detención en la fase G1 del ciclo celular, pero no debida a la inducción de apoptosis. Sin embargo, no conocemos si esta detención en el ciclo celular favorece la sensibilidad de estas células para activar muerte celular por algún otro estímulo externo. En nuestro trabajo, analizamos si el tratamiento previo con altas dosis de IL-2 favorece la inducción de apoptosis o la activación de autofagia.

En este estudio mostramos que las células de cáncer de cérvix, SiHa y HeLa, responden al tratamiento con IL-2. Con 10 UI/mL se observó un aumento de la proliferación en un 30% con respecto al control. En contraste, 100 UI/mL indujeron una disminución de la proliferación de ambas líneas celulares, en aproximadamente el 30% tal como se observa en la figura 9. Estos datos concuerdan con lo reportado por Lagunas y colaboradores en 2019, donde muestran que las células HeLa presentan el receptor para la IL-2 y que al ser tratadas con 10 UI/mL aumentan la proliferación y por el contrario 100 UI/mL la disminuyen debido a un arresto en la fase G1 del ciclo celular. Aquí reportamos que las células SiHa también responden a bajas y altas dosis de IL-2 de manera similar, con 10 UI/mL aumentan la proliferación y con 100 UI/mL disminuyen la proliferación. Suponemos que la disminución en la proliferación celular observada en SiHa es debida a la detención del ciclo celular. Por lo tanto, debido a que las células SiHa responden a los tratamientos con IL-2, es probable que también expresan el receptor de la IL-2, lo cual concuerda con resultados no publicados del grupo de investigación, que demuestran la presencia del receptor en estas células. También, se ha demostrado la expresión de las cadenas del receptor de IL-2 (α , β , γ) en líneas celulares de cáncer de cérvix, como CaLo e INBL, ambas VPH 18⁺. La interacción de la IL-2 con su receptor activan funciones pleiotrópicas, en este caso juega un papel dual al inducir o inhibir la proliferación celular, como se determinó en otras líneas celulares tumorales cervicales (Rangel, 2010; Valle, 2014).

El papel de la IL-2 y su efecto diferencial observado en las células SiHa y HeLa, nos llevó a preguntarnos sobre el efecto que tendrían estos tratamientos más el estímulo de alguna vía involucrada en muerte celular. Estudios previos muestran que las líneas celulares cervicales expresan el receptor de muerte CD95 (Gutiérrez, 2019). Sin embargo, se ha observado que en células tumorales la activación del receptor CD95 puede desencadenar la activación de la vía canónica y, más frecuentemente, la vía no canónica; la primera desencadena muerte celular por apoptosis y la segunda

conduce a una respuesta totalmente contraria, como la proliferación, metástasis y diferentes mecanismos de supervivencia (Legembre, 2004; Teodorczyk, 2015; Ta, 2018). CD95 es integrante de la familia de receptores de muerte, dentro de esta familia se encuentran otros receptores como TRAIL-R4, el cual está presente en la línea cervical tumoral HeLa y su estimulación desencadena la activación de la vía no canónica (Lalaoui, 2011). Estos antecedentes nos llevaron a evaluar si las células tumorales cervicales SiHa (VPH16+) y HeLa (VPH18+) podrían activar la vía no canónica posterior a la activación de CD95, para ello, determinamos la expresión del receptor CD95 y encontramos que las células SiHa expresan de manera extracelular un 61% de CD95, mientras que las células HeLa expresan un 73%, tal como se muestra en la figura 10 a) y b). Estos datos concuerdan con lo reportado por Gutiérrez y colaboradores en 2019 y por Aguilar y colaboradores en 2001, donde muestran que las células HeLa y SiHa expresan de manera extracelular al receptor CD95. Sin embargo, a pesar de la alta expresión de CD95 en estas líneas celulares tumorales, Aguilar y colaboradores en 2001, así como Filippova y colaboradores en 2004, muestran que estas células son altamente resistentes a la inducción de apoptosis cuando se estimulan vía receptores de muerte, incluyendo el receptor CD95. Por otra parte, existen reportes que muestran que células cervicales tumorales HeLa, así como células de cáncer de colon, cáncer de mama y melanoma son capaces de expresar al ligando de CD95 (Woo, 2004; Ryan, 2005; Müschen, 2000; Hahne, 1996). Por lo que en este estudio decidimos determinar la presencia del ligando de CD95 por citometría de flujo y microscopía confocal. Mediante citometría de flujo encontramos que ambas líneas celulares expresan en gran cantidad CD95L, encontramos 96% en SiHa y 97% en HeLa, figura 10 c) y d). Cuando realizamos el análisis de las imágenes de microscopía, observamos la presencia de las dos moléculas (CD95, CD95L), así como una posible interacción entre ambas, figura 11 a) y b).

Se ha visto que la interacción entre CD95L y su receptor involucra un mecanismo de proliferación, resistencia a la muerte celular, evasión del sistema inmunológico, carcinogénesis, motilidad e invasividad, y troncalidad y que se asocia a un mal pronóstico, además, es importante en el mantenimiento tumoral (Contreras, 2000; Munakata, 2005; Barnhart, 2004; Irwanto, 2016; Chen, 2010; Balta, 2019; Qadir, 2020). Debido al resultado que nos indica una probable interacción entre CD95 y CD95L, y a los antecedentes previamente mencionados de células tumorales que muestran la autoactivación de la vía CD95, nos dimos a la tarea de analizar si la activación de la vía CD95 con anticuerpos agonistas podría activar la vía no canónica. Para ello tratamos a las células SiHa y HeLa con diferentes concentraciones de dos anticuerpos agonistas anti-CD95 (CH11 y DX2) y medimos proliferación, como se muestra en la figura 12 a), b), c) y d) las concentraciones 10, 20 y 25 ng/mL de la clona CH11 y 100, 200 y 400 ng/mL de la clona DX2 inducen proliferación en las células SiHa y HeLa por encima del 30 % con respecto a las células sin estímulo. La inducción de proliferación en respuesta al estímulo vía CD95 no ha sido reportado para células de cáncer de cérvix, pero sí en células de adenocarcinoma ductal pancreático y cáncer colorrectal (Teodorczyk, 2015; Ta, 2018). Es importante

remarcar que las concentraciones con las cuales observamos proliferación son concentraciones mucho menores a la reportadas por otros grupos de investigación donde utilizan 200 - 500 ng/mL de la clona CH11 y de 1 - 5 µg/mL de la clona DX2 con las cuales buscan la inducción de apoptosis (Hougardy, 2005; Zhang, 2008; Raszewski, 2015; Salazar, 2019). Estos resultados sugieren que la inducción de proliferación vía CD95 en células tumorales cervicales podría deberse a la activación de vías de señalización como NFκB, PI3K/MAPK y probablemente la vía JAK/STAT. Otro hallazgo interesante fue observar que la inducción de proliferación en SiHa y HeLa ocurre a la misma concentración de CD95, pues un estudio elaborado por Filippova en 2004 muestra que la oncoproteína viral E6 de los VPH 16 pueden unirse a FADD y de esta manera propiciar la inhibición de la apoptosis, razón por lo que esperábamos que las células SiHa proliferaran a menor concentración del anticuerpo agonista de CD95. Sin embargo, esto no sucedió, nuestros datos muestran un comportamiento similar en las células SiHa y HeLa.

Los resultados obtenidos muestran que la estimulación de CD95, una vía comúnmente implicada en muerte celular también puede promover proliferación en células tumorales cervicales. Entonces, con base en estos resultados decidimos evaluar nuevamente la proliferación de las células SiHa y HeLa, pero en esta ocasión con tratamientos simultáneos de 10 UI/mL de IL-2 más 20 ng/mL del anticuerpo agonista CH11 (esto debido a que no encontramos diferencia significativa en la inducción de la proliferación de las dosis usadas de los agonistas CH11 y DX2, por lo que decidimos usar la concentración de 20 ng/mL y/o 200 ng/mL, respectivamente, para los posteriores ensayos). Observamos en ambas líneas un aumento similar de la proliferación al de las células tratadas por condición individual, por lo que determinamos que el tratamiento simultáneo no conduce a una proliferación acumulativa, figura 13 a) y c). Con el tratamiento combinado esperábamos encontrar un aumento de la proliferación aún más pronunciado, sin embargo, esto no sucedió. Una de las probables explicaciones es el hecho de que la activación de las dos vías activa río abajo las mismas moléculas, esto debido a que, en un estudio realizado por Valle y colaboradores en 2014, se demostró que 10 UI/mL de IL-2 induce un aumento en la fosforilación de STAT3 (pSTAT3). Por otra parte, en un estudio realizado por Ta y colaboradores en 2018, encontraron que la activación de la vía no canónica de CD95 por la fosforilación de los residuos Y291 e Y232 del dominio de muerte de CD95, promueve la formación de un complejo con EGFR y las cinasas Yes-1 y Src que conduce al reclutamiento de STAT3 y su consiguiente fosforilación. Tomando en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados, es probable la convergencia de las vías de IL-2 y CD95 sobre la activación de STAT3. Por otra parte, previamente reportamos que 100 UI/mL de IL-2 induce una disminución en la proliferación celular, esto debido a una detención en la fase G1 del ciclo celular, según lo reportado por Lagunas y colaboradores en 2019, por lo que pensamos que dicha detención podría favorecer la susceptibilidad a la activación de muerte celular. Por tal razón, los siguientes experimentos se centraron en el tratamiento de células SiHa y HeLa con altas dosis de IL-2 para promover la detención en la fase G1 y posteriormente tratarlas

con las concentraciones de CD95 ya usadas que inducen proliferación; observamos que cuando las células SiHa y HeLa se trataron previamente con 100 UI de IL-2 y después con el agonista CH11, recuperaron la proliferación, llegando a niveles similares de las células control, tal como lo observamos en la figura 13 b) y d). Valle y colaboradores en 2014 mostraron que el tratamiento de células tumorales cervicales con altas dosis de IL-2 disminuye la activación de la vía JAK/STAT, específicamente disminución en la fosforilación de STAT5 y STAT3, lo que correlaciona con la disminución de la proliferación celular. Sin embargo, antecedentes previos muestran que la activación de la vía no canónica de CD95 induce un incremento en la fosforilación de STAT3, razón por la cual suponemos que la recuperación de la proliferación en células previamente arrestadas con 100 UI de IL-2 y posteriormente tratadas con anti CD95 es debida a la activación de la vía de no canónica de CD95, la cual incrementa la activación de STAT3 y otras moléculas transductoras de señal como NFkB, PI3K, MAPK (Barnhart, 2004; Teodorczyk, 2015; Ta, 2018), por lo que la vía CD95 está involucrada en mecanismos de sobrevivencia en las células tumorales cervicales.

Debido a que la activación de la vía CD95 está asociada a la inducción de muerte y a que existen reportes en donde se describe que en células tumorales cervicales el uso de altas dosis de IL-2 (100 UI/mL) promueven la disminución de la proliferación celular debido a la activación de la apoptosis (Torres, 2016), nos dimos a la tarea de determinar apoptosis bajo todos los mismos tratamientos realizados en este trabajo. Para ello, la apoptosis se determinó por citometría de flujo usando el kit IP/Anexina V, determinamos también PARP escindida (cPARP) y pH2AX por citometría de flujo, así como por microscopía confocal. Los resultados que obtuvimos sugieren que el tratamiento de células SiHa y HeLa con bajas y altas dosis de IL-2, el tratamiento con las clonas anti CD95 (20 ng/mL de CH11 o 200 ng/mL de DX2) por individual, así como los tratamientos simultáneos de IL-2 más los anticuerpos agonistas anti CD95 (figuras 14, 15 y 16) no inducen apoptosis. Por lo que confirmamos que los resultados donde observamos que 100 UI de IL-2 en células HeLa inducen disminución en la proliferación no se deben a la activación de apoptosis. Esto concuerda con lo publicado por Lagunas y colaboradores en 2019, y ahora nosotros reportamos que en células SiHa el comportamiento con respecto a los tratamientos es similar.

Por último, otro aspecto que nos interesó evaluar fue la activación de la vía autofágica, debido a que existen reportes que muestran que una forma de evasión de la muerte celular en tumores es la activación de la autofagia. Además, según reportes de Kang y colaboradores en 2013 muestran que el tratamiento de fibroblastos embrionarios de ratón con 6000 UI de IL-2 inducen autofagia, de la misma manera, el grupo de Zhang y colaboradores en 2008 muestran que el tratamiento de células HeLa con 200 ng/mL de CH11 inducen autofagia. Por tal razón, buscamos si pudiera existir la activación de dicha vía en nuestros tratamientos independientes o simultáneos, para ello determinamos la presencia de LC3B por citometría de flujo y por microscopía confocal, en esta última se hizo el análisis de focos de fluorescencia ya que éstos

corresponden a autofagosomas maduros formados por la acumulación de LC3B (LC3II) en la membrana. Procedimos a evaluar el efecto de los tratamientos de la IL-2 sobre el proceso autofágico en las células SiHa y HeLa, encontrando que las dosis usadas de IL-2 (10 y 100 UI/mL) conducen a una disminución de la concentración de focos fluorescentes en ambas líneas con respecto a las células no tratadas (Figura 16 y 17). Por otra parte, ya que existe evidencia de que la activación de CD95 puede inducir autofagia en células tumorales (Mukhopadhyay, 2014), decidimos evaluar la concentración de focos fluorescentes con tratamientos de CD95, así como tratamientos simultáneos de IL-2 más CD95. Cuando tratamos a las células con 20 ng/mL CH11, observamos que no hay diferencia significativa, pues no hay una tendencia clara en cuanto a la concentración de los focos fluorescentes de LC3B, figuras 16 b) y c); 17 b) y c). Curiosamente, encontramos que cuando las células se trataron previamente con 10 y sobre todo con 100 UI/mL y seguido con CH11, se da un aumento bastante marcado de los focos fluorescentes de LC3B, es decir, la presencia de autofagosomas, indicador preciso del flujo autofágico. La activación de receptores con actividad tirosin cinasa implica vías que regulan la autofagia (JAK/STAT, NFκB, MAPK, mTOR, JNK y PKC) (Zhu, 2017; Ravichandran, 2022), así mismo se ha encontrado que la vía no canónica de CD95 regula vías similares que implican a PI3K, STAT, NFκB, MAPK (Barnhart, 2004; Teodorczyk, 2015; Ta, 2018), hecho que nos hace pensar que en conjunto estas vías podrían estar regulando la autofagia. Es importante mencionar que en células tumorales de cáncer de mama (sobre todo en cáncer de mama triple negativo) y melanoma, el alto porcentaje de puntos o focos fluorescentes de LC3B se correlacionó positivamente con un aumento de la proliferación, invasión y metástasis, así como de un mal pronóstico (Lazova, 2012; Lefort, 2014). Algo similar se encontró en modelos de carcinoma hepatocelular y cáncer gástrico, donde la regulación positiva de LC3B a través de BMP4 o MALAT 1, respectivamente da como resultado el aumento de la proliferación celular (Shao, 2020; Deng, 2018). Estos antecedentes concuerdan con nuestros resultados, pues encontramos que los tratamientos simultáneos de IL-2 más CD95 que promueven la acumulación y el aumento de LC3B, se relacionan con el aumento de la proliferación en ambas líneas celulares.

También, es importante mencionar que algunos estudios en células HeLa, han descrito que la activación de la autofagia inducida por CD95 o TRAIL inhibe la muerte celular o que la apoptosis inducida por cisplatino es revertida con la inducción de la autofagia (Zhang, 2008; Cho, 2009; Xu, 2012). Por otra parte, se ha visto que en células HeLa el tratamiento con 100 UI de IL-2 las protege de la apoptosis inducida por Cisplatino (Lagunas, 2019). Además, en algunos estudios realizados en células SiHa y HeLa se observó que la autofagia disminuye el efecto citotóxico del fármaco CPX (Ciclopirox olamina) y de THP (pirarrubicina), efecto que se revirtió cuando las células se trataron con cloroquina un inhibidor de la autofagia (Wu, 2016; Fan, 2022). Tomando en cuenta estos antecedentes, es evidente que la autofagia en células tumorales cervicales puede jugar un papel citoprotector, permitiendo a las células continuar con sus procesos de supervivencia. Hechos que también podrían explicar el aumento marcado de focos fluorescentes positivos para LC3B cuando se hicieron los

tratamientos simultáneos. El aumento de la autofagia como probable regulador de la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la supervivencia. Sin embargo, a pesar de estos resultados referentes a la acumulación de focos fluorescentes en nuestros tratamientos, es necesario realizar otros experimentos que nos permitan dilucidar la activación de la autofagia.

CONCLUSIONES

En este trabajo observamos que moléculas como CD95 e IL-2 tienen un efecto diferencial sobre células tumorales de cáncer de cérvix el cual es dependiente de la concentración. Demostramos que las células tumorales cervicales SiHa y HeLa (VPH 16⁺ y 18⁺ respectivamente) expresan al receptor CD95 y a su ligando (CD95L) y que la estimulación de la vía CD95 activa muerte celular. Sin embargo, cuando las tratamos con bajas dosis de anticuerpos agonistas contra CD95 se observa aumento de la proliferación celular de manera independiente al tipo de VPH presente. Con la IL-2 también observamos un comportamiento similar, bajas dosis (10 UI/mL) promueven el aumento de la proliferación, mientras que, altas dosis (100 UI/mL) inducen la disminución de la proliferación. Posteriormente analizamos el efecto de tratamientos simultáneos de IL-2 y anti-CD95 a concentraciones que inducen proliferación, de manera interesante observamos que el efecto no es acumulativo. Finalmente evaluamos si el tratamiento previo con altas dosis de IL-2 afectaba la señalización de la vía CD95, y los resultados muestran que la estimulación con el anticuerpo agonista anti-CD95 no activa apoptosis, al contrario, incrementa la proliferación e incrementa la intensidad media de fluorescencia (IMF) y la cantidad de focos de fluorescencia para LC3B, lo que sugiere la probable activación de un mecanismo citoprotector. Todo lo anterior indica que las células cervicales tumorales independientemente del tipo de VPH presente pueden activar la vía no canónica de CD95 para promover su proliferación.

BIBLIOGRAFÍA

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. Álvarez Aldana, A., Sepúlveda Arias, J. C., & Siller López, F. (2012). Carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones Andina*, 14(24), 438-456.
3. American cancer society (2020). ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)?
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
4. Arévalo, A. R., Arévalo Salazar, D. E., & Villarroel Subieta, C. J. (2017). El cáncer de cuello uterino. *Revista Médica La Paz*, 23(2), 45-56.
5. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *science*, 281(5381), 1305-1308.
6. Balta, G. S. G., Monzel, C., Kleber, S., Beaudouin, J., Balta, E., Kaindl, T., & Martin-Villalba, A. (2019). 3D cellular architecture modulates tyrosine kinase activity, thereby switching CD95-mediated apoptosis to survival. *Cell reports*, 29(8), 2295-2306.
7. 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.
8. Belleudi, F., Nanni, M., Raffa, S., & Torrisi, M. R. (2015). HPV16 E5 deregulates the autophagic process in human keratinocytes. *Oncotarget*, 6(11), 9370.
9. Beltrán-Lissabet, J. F. (2014). Panorámica de los receptores celulares del virus del papiloma humano y su repercusión en la purificación de partículas semejantes a virus. *Vacunas*, 15(1-2), 29-36.
10. Buchser, W. J., Laskow, T. C., Pavlik, P. J., Lin, H. M., & Lotze, M. T. (2012). Cell-Mediated Autophagy Promotes Cancer Cell Survival. *Cancer research*, 72(12), 2970-2979.
11. Carrillo, F. J. O., de Regil, D. B. G., & Jiménez, M. T. V. (2015). Infección por virus del papiloma humano en mujeres y su prevención. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(3), 157-163.
12. Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*, 110(3), S4-S7.
13. Ceppi, P., Hadji, A., Kohlhapp, F. J., Pattanayak, A., Hau, A., Liu, X., & Peter, M. E. (2014). CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. *Nature communications*, 5(1), 5238.
14. Chakrabandhu, K., & Hueber, A. O. (2016). Fas versatile signaling and beyond: pivotal role of tyrosine phosphorylation in context-dependent signaling and diseases. *Frontiers in Immunology*, 7, 429.

15. 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), 492-496.
16. Cho, D. H., Jo, Y. K., Hwang, J. J., Lee, Y. M., Roh, S. A., & Kim, J. C. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer letters*, *274*(1), 95-100.
17. Chodorge, M., Züger, S., Stirnimann, C. A., Briand, C., Jermutus, L., Grütter, M. G., & Minter, R. R. (2012). A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency. *Cell Death & Differentiation*, *19*(7), 1187-1195.
18. Ciacci, C., Mahida, Y. R., Dignass, A., Koizumi, M., & Podolsky, D. K. (1993). Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, *92*(1), 527-532.
19. Cohen, P. A., Jhingran, A., Oaknin, A., & Denny, L. (2019). Cervical cancer. *The Lancet*, *393*(10167), 169-182.
20. Contreras, D. N., Krammer, P. H., Potkul, R. K., Bu, P., Rossi, J. L., Kaufmann, A. M., & Qiao, L. (2000). Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*, *23*(1), 67-74.
21. Dasari, S., Bakthavachalam, V., Chinnapaka, S., Venkatesan, R., Samy, A. L., & Munirathinam, G. (2020). Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo targets HeLa and SiHa cervical cancer cells via pro-oxidant anticancer mechanism. *Phytotherapy Research*, *34*(9), 2366-2384.
22. Deng, G., Zeng, S., Qu, Y., Luo, Q., Guo, C., Yin, L., & Shen, H. (2018). BMP4 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by autophagy activation through JNK1-mediated Bcl-2 phosphorylation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *37*(1), 1-13.
23. Doorbar, J. (2007). Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. *Disease markers*, *23*(4), 297-313.
24. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495-516.
25. Fan, H., He, Y., Xiang, J., Zhou, J., Wan, X., You, J., & Lei, Y. (2022). ROS generation attenuates the anti-cancer effect of CPX on cervical cancer cells by inducing autophagy and inhibiting glycolysis. *Redox Biology*, *53*, 102339.
26. 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.
27. Flores-Miramontes, M. G., Torres-Reyes, L. A., Aguilar-Lemarroy, A., Vallejo-Ruiz, V., Piña-Sánchez, P., Cortés-Gutiérrez, E., & Jave-Suárez, L. F. (2015). Prevalencia de genotipos de VPH en México y en el mundo detectados mediante Linear Array. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, *53*(2), S122-S130.
28. Flores, E. R., Allen-Hoffmann, B. L., Lee, D., & Lambert, P. F. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *Journal of virology*, *74*(14), 6622-6631.

29. Fragoso, L. R., Baltasar, E. H., & Esparza, J. A. R. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología aplicada*, 21(2), 60-69.
30. Globocan. (2020). International Agency for Research on Cancer. <http://gco.iarc.fr/>
31. 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.
32. Gutiérrez-Hoya, A., & Soto-Cruz, I. (2020). Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. *Cells*, 9(10), 2297.
33. Gutiérrez-Hoya, A., Soto-Cruz I., Valle-Mendiola A. (2023). Immunotherapy for cervical cancer. En Nima Rezaei (Ed.), Handbook of Cancer and Immunology. Springer Cham. DOI <https://doi.org/10.1007/978-3-030-80962-1>
34. Hadji, A., Ceppi, P., Murmann, A. E., Brockway, S., Pattanayak, A., Bhinder, B., & Peter, M. E. (2014). Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination. *Cell reports*, 7(1), 208-222.
35. Hahne, M., Rimoldi, D., Schröter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., & Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274(5291), 1363-1366.
36. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46.
37. Hougardy, B. M., van der Zee, A. G., van den Heuvel, F. A., Timmer, T., de Vries, E. G., & de Jong, S. (2005). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. *Gynecologic oncology*, 97(2), 353-364.
38. Irwanto, Y. (2016). Expression of Fas ligand is higher in early stage cervical cancer with lymph nodes metastasis. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology (INAJOG)*.
39. James, M. A., Lee, J. H., & Klingelhutz, A. J. (2006). Human papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *Journal of virology*, 80(11), 5301-5307.
40. Jiang, T., Zhou, C., & Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 5(6), e1163462.
41. Jiang, P., & Yue, Y. (2014). Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis. *Experimental and therapeutic medicine*, 7(1), 3-7.
42. Kabsch, K., Mossadegh, N., Kohl, A., Komposch, G., Schenkel, J., Alonso, A., & Tomakidi, P. (2004). The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL-and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology*, 47(1), 48-56.

43. Kang, R., Tang, D., Lotze, M. T., & Zeh III, H. J. (2013). Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth. *Experimental cell research*, 319(4), 556-565.
44. Kim, J. H., Kim, H. R., & Patel, R. (2023). Inactivation of Mad2B Enhances Apoptosis in Human Cervical Cancer Cell Line upon Cisplatin-Induced DNA Damage. *Biomolecules & therapeutics*.
45. Lagunas-Cruz, M. D. C., Valle-Mendiola, A., Trejo-Huerta, J., Rocha-Zavaleta, L., Mora-García, M. D. L., Gutiérrez-Hoya, A., & Soto-Cruz, I. (2019). IL-2 induces transient arrest in the G1 phase to protect cervical cancer cells from entering apoptosis. *Journal of oncology*, 2019.
46. Lagunas-Martinez, A., Madrid-Marina, V., & Gariglio, P. (2010). Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 6-16.
47. Lalaoui, N., Morlé, A., Mérino, D., Jacquemin, G., Iessi, E., Morizot, A., & Micheau, O. (2011). TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PloS one*, 6(5), e19679.
48. Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(12), 759-774.
49. Lazova, R., Camp, R. L., Klump, V., Siddiqui, S. F., Amaravadi, R. K., & Pawelek, J. M. (2012). Punctate LC3B Expression Is a Common Feature of Solid Tumors and Associated with Proliferation, Metastasis, and Poor Outcome Autophagy in Solid Malignancies. *Clinical cancer research*, 18(2), 370-379.
50. Lefort, S., Joffre, C., Kieffer, Y., Givel, A. M., Bourachot, B., Zago, G., & Mehta-Grigoriou, F. (2014). Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*, 10(12), 2122-2142.
51. Legembre, P., Schickel, R., Barnhart, B. C., & Peter, M. E. (2004). Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF- κ B-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46742-46747.
52. Liang, X., De Vera, M. E., Buchser, W. J., de Vivar Chavez, A. R., Loughran, P., Stolz, D. B., & Lotze, M. T. (2012). Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer research*, 72(11), 2791-2801.
53. 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.
54. Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
55. Mattoscio, D., Medda, A., & Chiocca, S. (2018). Human papilloma virus and autophagy. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1775.

56. McMurray, H. R., Nguyen, D., Westbrook, T. F., & McAnce, D. J. (2001). Biology of human papillomaviruses. *International journal of experimental pathology*, 82(1), 15-33.
57. Montero, P. H. (2018). Cáncer de Cabeza y Cuello asociado a Virus Papiloma Humano: Prevención, diagnóstico y tratamiento. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(4), 419-426.
58. Moreno, E. A., Cuéllar, C. G., & González, A. D. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*, 46(4), 275-80.
59. Morgan, E. L., & Macdonald, A. (2020). Manipulation of JAK/STAT signalling by high-risk HPVs: potential therapeutic targets for HPV-associated malignancies. *Viruses*, 12(9), 977.
60. Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., & Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis*, 19, 555-566.
61. Mullen, P. (2004). PARP cleavage as a means of assessing apoptosis. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 171-181.
62. Munakata, S., Watanabe, O., Ohashi, K., & Morino, H. (2005). Expression of Fas ligand and bcl-2 in cervical carcinoma and their prognostic significance. *American journal of clinical pathology*, 123(6), 879-885.
63. Müschen, M., Moers, C., Warskulat, U., Even, J., Niederacher, D., & Beckmann, M. W. (2000). CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology*, 99(1), 69-77.
64. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *cell*, 88(3), 355-365.
65. NCI (National Cancer Institute). (2019). IL-2; Diccionarios del NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/il-2>
66. Park, J. Y., Choi, P., Kim, H. K., Kang, K. S., & Ham, J. (2016). Increase in apoptotic effect of Panax ginseng by microwave processing in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo studies. *Journal of ginseng research*, 40(1), 62-67
67. Park, M. A., Reinehr, R., Häussinger, D., Voelkel-Johnson, C., Ogretmen, B., Yacoub, A., & Dent, P. (2010). Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, 9(8), 2220-2231.
68. 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 & differentiation*, 22(4), 549-559.
69. Qadir, A. S., Ceppi, P., Brockway, S., Law, C., Mu, L., Khodarev, N. N., & Peter, M. E. (2017). CD95/Fas increases stemness in cancer cells by inducing a STAT1-dependent type I interferon response. *Cell reports*, 18(10), 2373-2386.
70. Qadir, A. S., Stults, A. M., Murmann, A. E., & Peter, M. E. (2020). The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Scientific reports*, 10(1), 1310.

71. Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C. F., & Weiss-Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, 50(3), 273-277.
72. Raszewski, G., Lemieszek, M. K., Łukawski, K., Juszcak, M., & Rzeski, W. (2015). Chlorpyrifos and cypermethrin induce apoptosis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 116(2), 158-167.
73. Ravichandran, R., Priya Dharshini, L. C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2022). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 166400.
74. Reinecker, H. C., & Podolsky, D. K. (1995). Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8353-8357.
75. Risso, V., Lafont, E., & Le Gallo, M. (2022). Therapeutic approaches targeting CD95L/CD95 signaling in cancer and autoimmune diseases. *Cell Death & Disease*, 13(3), 248.
76. Robles, R. G., Ramírez, P. A., & Vega, N. A. (2009). Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(1), 83-94.
77. Rosenberg, S. A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *The Journal of Immunology*, 192(12), 5451-5458.
78. Ryan, A. E., Shanahan, F., O'Connell, J., & Houston, A. M. (2005). Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer research*, 65(21), 9817-9823.
79. Saito, T., Yoda, J., & Tabata, T. (1991). Local administration trials of interleukin-2 for head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx*, 18(2), 169-178.
80. Salazar Valencia, I. G., & Soto Cruz, I. (2019). Altas dosis de IL-2 inhiben la proliferación inducida por la activación de la vía CD95 en células HeLa. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3537861>
81. Salcedo, M., Pina-Sanchez, P., Vallejo-Ruiz, V., Monroy-Garcia, A., Aguilar-Lemarroy, A., Cortes-Gutierrez, E. I., & Grijalva, I. (2015). Human papillomavirus genotypes among females in Mexico: a study from the Mexican institute for social security. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(23), 10061-10066.
82. Sanabria Negrín, J. G., Fernández Montequín, Z. C., Hernández, C., de la Caridad, I., Pérez, L. O., & Llanuch Lara, M. (2011). El cáncer cervicouterino y las lesiones precursoras: revisión bibliográfica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 15(4), 295-319.

83. Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V. (2015). Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(S2), 166-171.
84. Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J., & Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 37(5), 324-334.
85. Seyrek, K., & Lavrik, I. N. (2019). Modulation of CD95-mediated signaling by post-translational modifications: towards understanding CD95 signaling networks. *Apoptosis*, 24(5), 385-394.
86. Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2003). An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *The Journal of Immunology*, 171(6), 2930-2936.
87. Shao, G., Zhao, Z., Zhao, W., Hu, G., Zhang, L., Li, W., & Zhang, X. (2020). Long non-coding RNA MALAT1 activates autophagy and promotes cell proliferation by downregulating microRNA-204 expression in gastric cancer. *Oncology letters*, 19(1), 805-812.
88. Sheets, E. E., Crum, C. P., & Yeh, J. (1996). Association between Cervical Neoplasia and Apoptosis as Detected by in Situ Nuclear Labeling. *Gynecologic oncology*, 63(1), 94-100.
89. StoËppler, H., StoËppler, M. C., Johnson, E., Simbulan-Rosenthal, C. M., Smulson, M. E., Iyer, S., & Schlegel, R. (1998). The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *Oncogene*, 17(10), 1207-1214.
90. Su, X., Zhang, L., Kang, H., Zhang, B., Bao, G., & Wang, J. (2019). Mechanical, nanomorphological and biological reconstruction of early-stage apoptosis in HeLa cells induced by cytochalasin B. *Oncology Reports*, 41(2), 928-938.
91. Surviladze, Z., Sterk, R. T., DeHaro, S. A., & Ozbun, M. A. (2013). Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *Journal of virology*, 87(5), 2508-2517.
92. Ta, N. L., Chakrabandhu, K., Huault, S., & Hueber, A. O. (2018). The tyrosine phosphorylated pro-survival form of Fas intensifies the EGF-induced signal in colorectal cancer cells through the nuclear EGFR/STAT3-mediated pathway. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
93. Teodorczyk, M., Kleber, S., Wollny, D., Sefrin, J. P., Aykut, B., Mateos, A., & Martin-Villalba, A. (2015). CD95 promotes metastatic spread via Sck in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Death & Differentiation*, 22(7), 1192-1202.
94. Thompson, D. A., Zacny, V., Belinsky, G. S., Classon, M., Jones, D. L., Schlegel, R., & MuÈnger, K. (2001). The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene*, 20(28), 3629-3640.

95. Thuwajit, C., Ferraresi, A., Titone, R., Thuwajit, P., & Isidoro, C. (2018). The metabolic cross-talk between epithelial cancer cells and stromal fibroblasts in ovarian cancer progression: Autophagy plays a role. *Medicinal research reviews*, 38(4), 1235-1254.
96. Tingting, C., Shizhou, Y., Songfa, Z., Junfen, X., Weiguo, L., Xiaodong, C., & Xing, X. (2019). Human papillomavirus 16E6/E7 activates autophagy via Atg9B and LAMP1 in cervical cancer cells. *Cancer Medicine*, 8(9), 4404-4416.
97. Tirado-Gómez, L. L., Mohar-Betancourt, A., López-Cervantes, M., García-Carrancá, A., Franco-Marina, F., & Borges, G. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud pública de México*, 47(5), 342-350.
98. Torres-Corioriles, El, del Río-Ortiz, I., Weiss-Steider, B., Barrios-Maya, MA, Trujillo-Cirilo, L., Corona-Ortega, T., & Rangel-Corona, R. (2016). IL- 2 induce la apoptosis, aumenta la producción y expresión de citocromo-C e inhibe la COX IV en las células de cáncer de cuello uterino. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3451949>
99. 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.
100. Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. (2020). Energy metabolism in cancer: The roles of STAT3 and STAT5 in the regulation of metabolism-related genes. *Cancers*, 12(1), 124.
101. Wang, X., Huang, X., & Zhang, Y. (2018). Involvement of human papillomaviruses in cervical cancer. *Frontiers in microbiology*, 9, 2896.
102. Werness, B. A., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248(4951), 76-79.
103. Woo, S. H., Park, I. C., Park, M. J., An, S., Lee, H. C., Jin, H. O., & Rhee, C. H. (2004). Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NF-κB activation. *International journal of cancer*, 112(4), 596-606.
104. Wu, Y., Ni, Z., Yan, X., Dai, X., Hu, C., Zheng, Y., & Lian, J. (2016). Targeting the MIR34C-5p-ATG4B-autophagy axis enhances the sensitivity of cervical cancer cells to pirarubicin. *Autophagy*, 12(7), 1105-1117.
105. Xu, Y., Yu, H., Qin, H., Kang, J., Yu, C., Zhong, J., & Sun, L. (2012). Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer letters*, 314(2), 232-243.
106. Yan, Y., Chen, X., Wang, X., Zhao, Z., Hu, W., Zeng, S., & Xu, Z. (2019). The effects and the mechanisms of autophagy on the cancer-associated

- fibroblasts in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-12.
107. You, L., Wang, Z., Li, H., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., & Han, W. (2015). The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*, 11(5), 729-739.
108. Yuan, C. H., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2012). Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 4(12), 3831-3850.
109. Yuan, H., Fu, F., Zhuo, J., Wang, W., Nishitani, J., An, D. S., & Liu, X. (2005). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*, 24(32), 5069-5078.
110. Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The roles of autophagy in cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3466.
111. 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.
112. Zhu, X., Huang, L., Gong, J., Shi, C., Wang, Z., Ye, B., & Leng, S. (2017). NF- κ B pathway link with ER stress-induced autophagy and apoptosis in cervical tumor cells. *Cell death discovery*, 3(1), 1-8.