

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Análisis del efecto quimiosensibilizador del resveratrol,  
mediante la inhibición de la vía de reparación del ADN por  
recombinación homóloga (RH), en líneas celulares de cáncer  
cérvico-uterino”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA

Biól. Exp. **Antonia Sánchez Vizcarra**

Ciudad de México a enero del 2020.

## **COMITÉ TUTORAL**

**Dr. José de la Luz Díaz Chávez**  
**Codirector externo**  
Instituto Nacional de Cancerología

**Dr. Pablo G. Damían Matzumura**  
**Codirector Interno**  
Universidad Autónoma Metropolitana

**Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez**  
**Asesora**  
Instituto Nacional de Cancerología

## MIEMBROS DEL JURADO

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez  
Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, México.  
[dguadalupeisabel@yahoo.com.mx](mailto:dguadalupeisabel@yahoo.com.mx).

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos  
Departamento de Biología de la Reproducción, Unidad Iztapalapa, UAM.  
[mrtc@xanum.uam.mx](mailto:mrtc@xanum.uam.mx)

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar  
Departamento de Embriología y Genética, Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM  
[bioquimicajejs@hotmail.com](mailto:bioquimicajejs@hotmail.com)

Dr. Carlo César Cortés González.  
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. Subdirección de Investigación  
Básica, Instituto Nacional de Cancerología, México.  
[ccortes@biomedicas.unam.mx](mailto:ccortes@biomedicas.unam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

El Programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT con número 003797.

Este proyecto contó con el apoyo proporcionado por el CONACYT mediante la beca N.- 638446.

Además, con el financiamiento de CONACYT (proyectos no. 168896 de Ciencia básica y 261875 de FOSISS) y del Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer por el apoyo estancia/congreso nacional.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Maximina y Antonio, mis hermanos; Diana, Máximo, Ana y mi sobrina Isabella por creer en mí, por todo el amor y apoyo incondicional durante todos estos años.*

*A Jorge Armando por el amor incondicional en cada paso en esta etapa de mi vida.*

*Al laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología y las maravillosas personas que contribuyen a nuestra formación académica, mis compañeros de laboratorio e investigadores asociados, al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por permitir mi estancia en el laboratorio.*

*A Tzizi por su compañía, consejos y apoyo, a Laura por brindarme su apoyo y ser mi cómplice en nuestras travesuras, Yair por sus consejos, regaños y risas, a Ivonne, al Dr. Marco Alonso que siempre me ha apoyado incondicionalmente desde la licenciatura por sus consejos, regaños, a Marco Armando, Fernando, Rodrigo Cáceres, a Clemen por sus sabios consejos, los llevo en un lugar muy especial de mi corazón y a todos los que también son parte del laboratorio.*

*A quienes contribuyeron a la estructuración, desarrollo, y tiempo brindado; a la Dra. Lupita con su apoyo, risas y consejos, el Dr. Pablo por siempre ayudarme a resolver dudas, por sus recomendaciones, por la disposición de estar al pendiente de lo que necesitará y al Dr. José por creer en mí, apoyarme, animarme e impulsarme a seguir en este camino de la ciencia, sin ustedes mi formación no hubiese sido posible.*

*A mis sinodales por leerme y por su disposición a sumar a este momento importante de mi vida.*

*A María, Armando, Alonso, Carol por siempre estar al pendiente de mí, por regalarme una sonrisa y su compañía.*

*Gracias, cada uno de ustedes forma una hoja del árbol de vida que me hace ser quien soy.*

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Análisis del efecto quimiosensibilizador del resveratrol, mediante la inhibición de la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga (RH), en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, con fecha a 31 de enero de 2020.



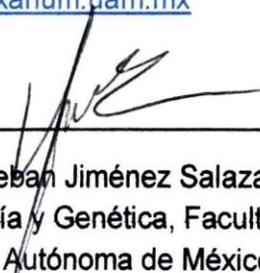
---

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez  
Subdirección de Investigación Clínica, Instituto Nacional de Cancerología, México.  
[dguadalupeisabel@yahoo.com.mx](mailto:dguadalupeisabel@yahoo.com.mx)



---

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos  
Departamento de Biología de la Reproducción, Unidad Iztapalapa, UAM.  
[mrtc@xanum.uam.mx](mailto:mrtc@xanum.uam.mx)



---

Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar  
Departamento de Embriología y Genética, Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM  
[bioquimicajejs@hotmail.com](mailto:bioquimicajejs@hotmail.com)



---

Dr. Carlo César Cortés González.  
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer. Subdirección de Investigación  
Básica, Instituto Nacional de Cancerología, México.  
[ccortes@biomedicas.unam.mx](mailto:ccortes@biomedicas.unam.mx)

# INDICE

COMITÉ TUTORAL.....	II
MIEMBROS DEL JURADO .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IIV
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
“OMNIS CELLULA E CELLULA “ .....	XI
INTRODUCCIÓN .....	- 2 -
EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) ASOCIADO AL DESARROLLO DEL CACU.....	- 4 -
TRATAMIENTOS UTILIZADOS CONTRA CACU .....	- 5 -
QUIMIOTERAPIA: EL CISPLATINO CONTRA EL CACU .....	- 6 -
RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIAS POR REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN.....	- 9 -
REPARACIÓN DE ADN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (RH).....	- 10 -
RESVERATROL COMO QUIMIOSENSIBILIZADOR.....	- 12 -
MECANISMO DE ACCIÓN DEL RESVERATROL .....	- 14 -
RESVERATROL COMO FITOESTRÓGENO CON ACTIVIDAD HORMONAL: AGONISTA Y ANTAGONISTA DE LOS ESTRÓGENOS.....	- 14 -
ANTECEDENTES.....	- 17 -
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	- 19 -
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	- 20 -
HIPÓTESIS.....	- 20 -
OBJETIVO GENERAL .....	- 20 -
OBJETIVOS PARTICULARES.....	- 21 -
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	- 22 -
MATERIAL Y MÉTODOS .....	- 23 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	- 28 -
RESULTADOS .....	- 29 -
DISCUSIÓN.....	- 49 -
CONCLUSIÓN.....	- 53 -
REFERENCIAS .....	- 54 -
PÁGINAS WEB .....	- 60 -
ANEXO.....	- 61 -

## RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es un grave problema de salud pública, siendo la segunda causa de mortalidad en mujeres por cáncer en México. Uno de los principales fármacos utilizados en la quimioterapia contra el CaCu es el cisplatino; sin embargo, tiene como desventajas una alta toxicidad en pacientes y en algunos casos suelen generar quimioresistencia. Por otro lado, el resveratrol, un compuesto natural con propiedades antineoplásicas también ha demostrado que puede aumentar la eficacia del cisplatino en varios tipos de cáncer. Interesantemente, un trabajo reciente en células de cáncer de mama demostró que el resveratrol puede, inhibir la expresión de los genes y de las proteínas RAD51, NBS1 y MRE11; las cuales participan en la reparación de daño al ADN por recombinación homóloga (RH). Con base en estos antecedentes, el objetivo de este trabajo es analizar el efecto del resveratrol como quimiosensibilizador al tratamiento con cisplatino a través de la inhibición de la vía de reparación del ADN por RH, en líneas celulares de CaCu. Se analizó el efecto del resveratrol, cisplatino y la combinación en células C33A, HeLa y SiHa, mediante ensayos de viabilidad celular. Las concentraciones inhibitorias (IC) se determinaron mediante el programa Sigma Plot y el tipo de interacción mediante el programa Calcsyn. Finalmente se analizó el efecto del resveratrol sobre las proteínas RAD51 y ATM mediante western blot, con el programa Image J. Encontramos mayor sensibilidad al tratamiento con resveratrol en células C33A y HeLa. Mientras que el tratamiento con cisplatino demostró un menor efecto en células HeLa. Por otro lado, las células C33A fueron sensibles a ambos tratamientos. Con base en los valores obtenidos de los índices de combinación con las IC<sub>40</sub> e IC<sub>50</sub> de resveratrol y cisplatino se determinó un efecto sinérgico en la línea celular C33A, mientras que en las células HeLa se observó un efecto sinérgico con todas las combinaciones de IC's. En células SiHa el tratamiento combinado demostró un efecto sinérgico únicamente con la IC<sub>10</sub>. Finalmente se observó que el resveratrol disminuye la abundancia de las proteínas ATM y RAD51 en las tres líneas celulares de CaCu. Nuestros resultados sugieren que el resveratrol tiene un efecto sinérgico como quimiosensibilizador a cisplatino en células de CaCu mediante la inhibición de ATM y RAD51, importantes reguladores de reparación de daño al ADN por recombinación homóloga. Por lo que podría ser considerado el tratamiento con resveratrol como un posible quimiosensibilizador en pacientes con CaCu.

## ABSTRACT

Cervical cancer (CaCu) is a serious public health problem, being the second cause of death in women from cancer in Mexico. One of the main drugs used in chemotherapy against CaCu is cisplatin; however, it has the disadvantages of high toxicity in patients and some cases it usually generates chemoresistance. On the other hand, resveratrol, a natural compound with antineoplastic properties, has also shown that it can increase the effectiveness of cisplatin in several types of cancer. Interestingly, recent work in breast cancer cells showed that resveratrol can inhibit the expression of genes and the proteins RAD51, NBS1 and MRE11, which are involved in the repair of DNA damage by recombinant homologous (RH). Based on this background, the objective of this work is to analyze the effect of resveratrol as a chemosensitizer to cisplatin treatment through the inhibition of the DNA repair pathway by RH, in CaCu cell lines. The effect of resveratrol, cisplatin and the combination on C33A, HeLa and SiHa cells was analyzed by means of cell viability tests. Inhibitory concentrations (IC) were determined by means of the Sigma Plot program and the type of interaction by means of the Calcsyn program. Finally, the effect of resveratrol on RAD51 and ATM proteins was analyzed by means of western blot, with the Image J program. We found increased sensitivity to resveratrol treatment in C33A and HeLa cells. While cisplatin treatment showed a lesser effect on HeLa cells. On the other hand, C33A cells were sensitive to both treatments. Based on the values obtained from the combination rates with IC40 and IC50 of resveratrol and cisplatin, a synergistic effect was determined in the C33A cell line, while a synergistic effect was observed in HeLa cells with all combinations of ICs. In SiHa cells the combination therapy showed a synergistic effect with IC10 only. Finally, resveratrol was observed to decrease the abundance of ATM and RAD51 proteins in all three CaCu cell lines. Our results suggest that resveratrol has a synergistic effect as a cisplatin chemosensitizer in CaCu cells by inhibiting ATM and RAD51, important regulators of DNA repair by homologous recombination. Therefore, resveratrol treatment could be considered as a possible chemosensitizer in patients with CaCu.

“Furtiva, como un pirata escapando de una cueva, la célula cancerosa corta las amarras que la atan al tejido circundante. Despacio, se extiende una, dos, tres, varias sondas de exploración en forma de dedos y empieza a deslizarse. Después detecta la presencia pulsátil de un capilar próximo y se precipita entre las células que forman la pared del vaso sanguíneo. Se zambulle en el rojo río que discurre entre los pulmones y el hígado, la mama y el cerebro. Una hora más tarde, emerge en alguna orilla tranquila, se asienta y, a expensas de sus desventurados vecinos, comienza a prosperar. Gradualmente, la célula cancerosa invade el campo ocupado por sus colegas habituales, aniquilando a la que encuentra en su camino. Altera las células vecinas para que formen vasos sanguíneos que las nutran y las obliga a producir grandes cantidades de sustancias químicas estimulantes del crecimiento. Para protegerse de la patrulla de las células inmunes, la célula cancerosa crea un arma dura espinosa, como un erizo. Y para expulsar a los agentes enviados a acabar con ella, la célula cancerosa despliega una batería de pequeñas bombas a lo largo de su membrana.

¿Hay forma de combatir semejante enemigo? Hasta el momento la medicina ha intentado vencer a la célula cancerosa con la fuerza bruta, rebanándola con cirugía, disparándole con radiación o envenenándola con quimioterapia. Pero demasiado a menudo, unas pocas células se las arreglan para sobrevivir al ataque y germinan, a veces años después, tumores insensibles al tratamiento. Esto es evidente una guerra. Por ello nos debe parecer extraño que los investigadores empleen en su terminología palabras soldados, espías, balas de plata, proyectiles dirigidos o incluso bombas biológicas. Durante los últimos 20 años una serie de descubrimientos que podríamos calificar como asombrosos, ha abierto la caja negra que gobierna el comportamiento de la célula cancerosa y ha revelado una parte de sus secretos más íntimos. Hoy podemos decir que el cáncer, que no es una enfermedad moderna, ya que algunos homínidos la padecieron sin duda, y también la sufrieron los dinosaurios, decía que el cáncer, es una enfermedad del ADN, la molécula maestra, que encerraba en el núcleo de la célula, codifica el manuscrito genético de la vida. Uno de los papeles más importantes del ADN es gobernar la división celular por el cual una célula alisa una copia de sí misma y se divide en dos. Generalmente, la división celular está regulada de forma estricta pero la célula cancerosa se divide de manera incontrolada, empujando a los tejidos circundantes. La conclusión general, hoy, es que las células se vuelven cancerosas porque su maquinaria genética normal se estropea (virus, radiaciones, venenos ambientales, genes defectuosos heredados, etc.).”

*(Muñoz, 1993).*

**"omnis cellula e cellula "**

<<Toda célula proviene a partir de otra célula>>

**Rudolf Ludwig Karl Virchow**

## INTRODUCCIÓN

El cáncer ha existido desde hace miles de años, la crónica de una antigua enfermedad sigue siendo un grave problema de salud hasta nuestros días, donde la célula tumoral es una individualista desesperada: “un inconformista, en todos los sentidos posibles”, según escribió el cirujano y autor Sherwin Nuland (Mukherjee, 2016).

Es descrito como una enfermedad de hiperplasia patológica en la que las células adquieren características que le confieren ventajas para su proliferación como división celular descontrolada y aberrante, sin embargo, el concepto ha cambiado a lo largo del tiempo. Hanahan y Weinberg han propuesto las principales características de una célula tumoral, como señales de proliferación sostenida, la evasión de muerte programada (apoptosis), inducción de angiogénesis y migración a tejidos sanos, son procesos clave para la comprensión y el estudio de esta enfermedad (Mukherjee, 2016; Hanahan y Weinberg, 2011).

Por otro lado, uno de los tipos de cáncer más frecuentes y con alta incidencia en nuestro país es el cáncer cérvico-uterino (CaCu). Este tipo de cáncer ocupa la cuarta causa de muerte en el mundo y la segunda causa de muerte en mujeres mexicanas, después del cáncer de mama, ver imagen 1, (Globocan, 2018).

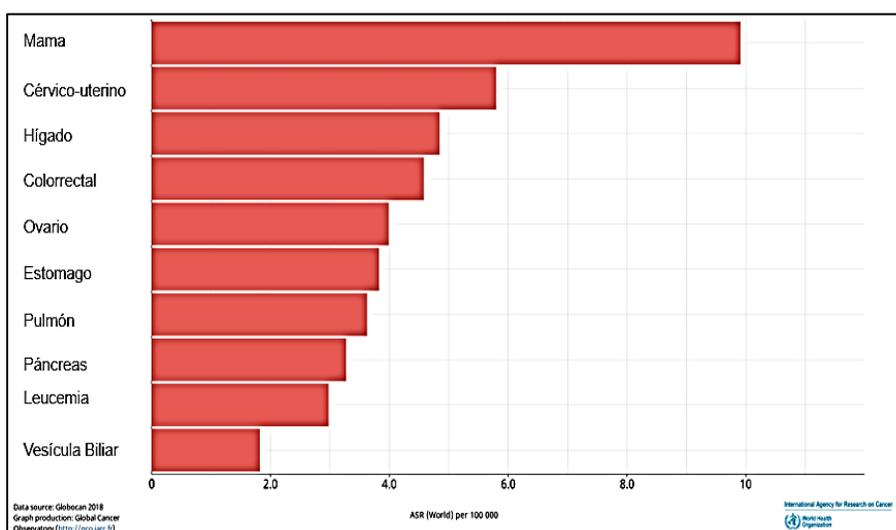


Imagen 1. Estimación de la tasa de mortalidad en mujeres mexicanas. Tomado de Globocan, 2018.

El cuello uterino o cérvix es la porción inferior del útero que lo protege, y conecta al cuerpo del útero con la vagina, así como la salida de la sangre del endometrio durante la menstruación, mide aproximadamente entre 3 y 4 cm de largo. Se caracteriza de células secretoras de moco cervical que son las encargadas de sintetizar, glucoproteínas, sales inorgánicas, enzimas y lípidos, cumpliendo así una función de protección contra agentes bacterianos, ver imagen 2 (Blaskewicz *et al.*, 2011; Canadian Cancer Society, 2019; Tortora y Derrickson, 2006.)

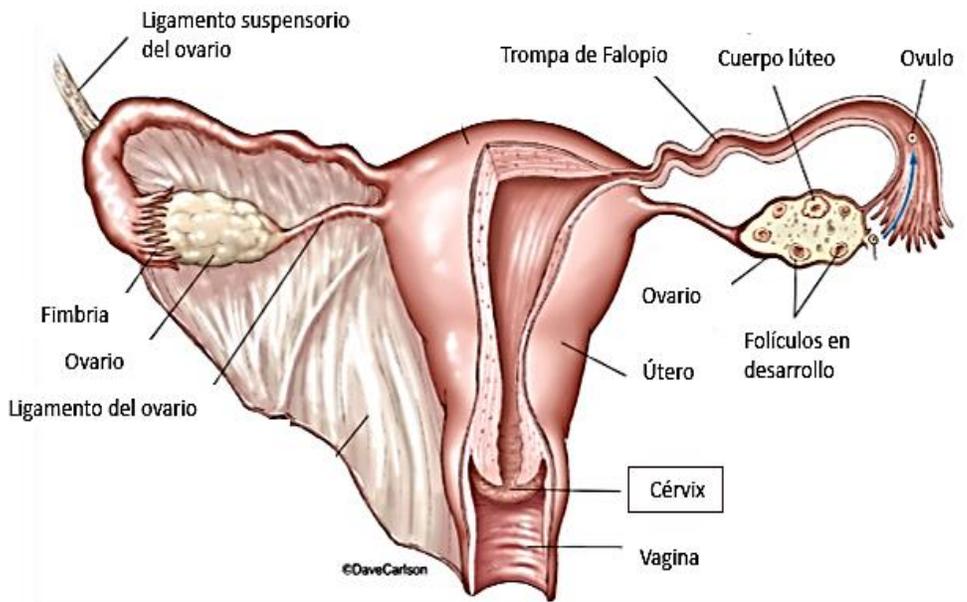


Imagen 2.- Esquema representativo de la anatomía del sistema reproductor femenino. Obtenida y modificada de Dave Carlson. © Copyright.

Al igual que diversos tipos de epitelio, el cuello uterino es propenso a desarrollar lesiones neoplásicas que pueden culminar con el desarrollo de carcinoma *in situ* e invasor. Generalmente dichas lesiones suelen ser de progresión lenta y continua, (IMSS, 2013).

## **El Virus del Papiloma Humano (VPH) asociado al desarrollo del CaCu**

Harold zur Hausen y Lutz Gissman reportaron las primeras evidencias que mostraban una clara asociación entre el VPH y las neoplasias genitales, específicamente cervicales (zur Hausen, 1999a; zur Hausen, 1999b).

En la actualidad se han identificado más de 200 subtipos de VPH los cuales se diferencian de acuerdo con su variabilidad genética, aunque no todos se asocian a la carcinogénesis. Dentro de la amplia gama de variantes de VPH, los tipos 16 y 18 se han reportado como los más agresivos y causan lesiones neoplásicas precursoras e invasoras (Yeo- Teh *et al.*, 2018).

La transmisión de la infección por VPH es por vía sexual. Tanto hombres como mujeres juegan un papel como portadores asintomáticos y transmisores por infección de VPH. Las mujeres sexualmente activas sin protección, presentan alto riesgo de infectarse con VPH oncogénicos (Lizano *et al.*, 2014).

En gran parte, las infecciones por VPH son asintomáticas debido a que son controladas por el sistema inmune y la eliminación de la carga viral puede demorar entre 13 y 18 meses después de la infección; sin embargo, diversos estudios epidemiológicos y moleculares han identificado que la infección persistente con el VPH es la causa principal para promover el desarrollo de lesiones precancerosas, por lo que el desarrollo de la enfermedad puede prolongarse desde 1 a 10 años (Manzo *et al.*, 2014; Lizano *et al.*, 2014).

Desde un enfoque celular, el CaCu se presenta en dos formas principales: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El primero es el tipo más común de CaCu y está íntimamente relacionado con la infección por VPH16; el segundo tipo son los adenocarcinomas, asociados principalmente a la infección con los VPH18 y 45. La gran mayoría de tipos de VPH pueden generar lesiones en el epitelio del cérvix, pero no todos se relacionan con el desarrollo de cáncer (Lizano *et al.*, 2014).

Aunque la infección por virus del VPH es la principal causa y una de las más importantes, no es el único factor de riesgo para el desarrollo de CaCu, pues se ha descrito que el uso de anticonceptivos hormonales por tiempos prolongados, así

como la multiparidad son factores de riesgo que se han asociado al desarrollo de cáncer cérvico-uterino. Otros factores que también se han asociado son la edad temprana en que se tiene la primera relación sexual, el número de parejas sexuales (indicadores de probable exposición al VPH), inmunodepresión, obesidad, factores nutricionales y tabaquismo están implicados en la alta incidencia del desarrollo de CaCu (Momenimovahed y Salehiniya, 2017).

### **Tratamientos utilizados contra CaCu**

El tratamiento contra al CaCu depende de diversas variables, como la etapa clínica, tamaño del tumor, edad de las pacientes, entre otros factores (American Cancer Society, 2017).

Los principales tratamientos contra CaCu son con agentes quimioterapéuticos, sin embargo, suelen tener efectos secundarios muy evidentes como nefrotoxicidad muy alta, la cual limita el uso de estos agentes en muchos pacientes con cáncer, por lo que uno de los principales objetivos en la actualidad es buscar terapias personalizadas, con mayor especificidad, eficacia y que tengan menor daño colateral posible (IMSS, 2013).

Los principales tratamientos contra el CaCu son los siguientes:

- **Cirugía:** es una técnica efectiva en cual se extirpa el tejido maligno.
- **Radioterapia:** se refiere al uso de altas dosis de radiación X con el fin de destruir células tumorales y reducir el tamaño de tumores.
- **Quimioterapia:** consiste en la administración de fármacos para eliminar las células cancerosas (por ejemplo, topotecan, gemcitabina, paclitaxel, y cisplatino).

Cabe señalar que la quimioterapia es uno de los tipos de tratamiento más utilizados, ya que la actividad de la mayoría de los medicamentos, principalmente se utilizan fármacos que inducen daño al ADN, aunque es una estrategia inespecífica, se supone que afectaría preferentemente a las células tumorales que tienen una proliferación muy activa.

## Quimioterapia: El cisplatino contra el CaCu

Inicialmente el cisplatino fue propuesto como agente bacteriano, sin embargo, en 1964, Barnett Rosenberg demostró accidentalmente que podía actuar como un agente antineoplásico (Kostova, 2006).

Los compuestos de platino son ampliamente usados en la quimioterapia, principalmente el cisplatino (*Diamino dicloro-Platino II*). Los fármacos de platino son particularmente activos contra tumores de células germinales, cáncer de ovario seroso y gran variedad de tumores como cabeza y cuello, riñón, vejiga, testicular y cervical (Bouwman y Jonkers, 2012; Dasari y Tchounwou, 2014).

Se ha reportado que los compuestos de platino con conformación *cis* bloquean el crecimiento celular y tienen actividad antitumoral, a diferencia de los compuestos *trans*, que no muestran esta propiedad sobre los tumores (Kostova, 2006).

El cisplatino se caracteriza por ser una molécula de tamaño pequeño, con conformación *cis*, sin carga neta y se ha descrito que ingresa mediante difusión pasiva a las células tumorales, así como su transporte a través de una proteína conocida como Ctr1 (copper transporters) que contribuye directamente a su internalización y por tanto el efecto de este compuesto en el ADN (Imagen 3), (Martinho *et al.*, 2019)

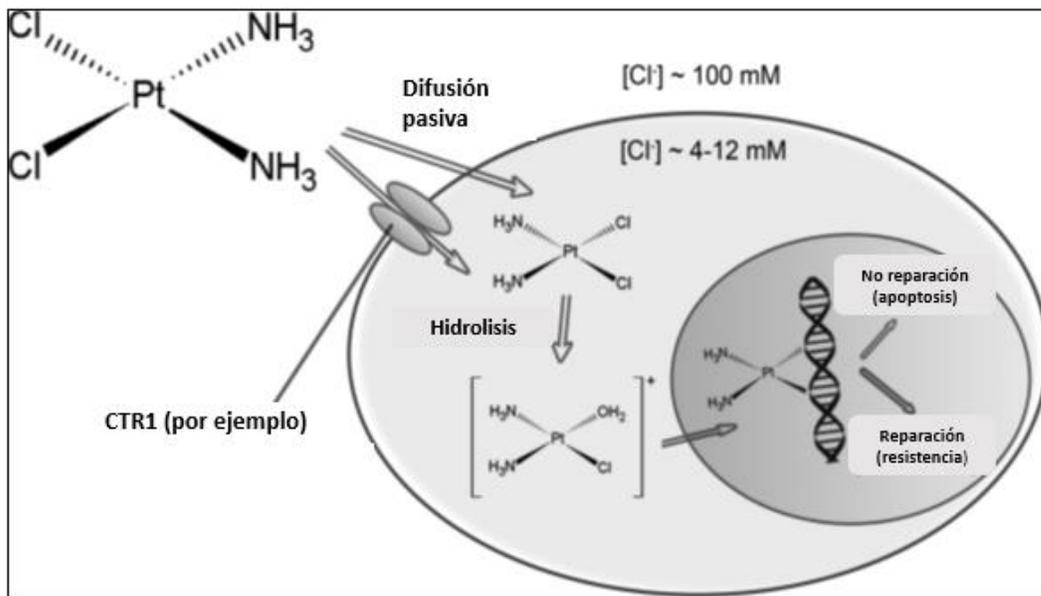


Imagen 3.- Estructura del cisplatino y mecanismo de acción. Este compuesto se internaliza en las células de forma pasiva o por medio de transportadores (como Ctr1), el compuesto se hidroliza y ejerce sus efectos indirectos en el ADN de la célula. Obtenida y modificada de Browning *et al.*, 2017.

Una vez dentro de la célula, el cisplatino se hidroliza y pierde dos iones de cloro y los sustituye por dos moléculas de agua, lo cual le confiere la propiedad de ser más polar y, por ende, reactivo para moléculas blanco como proteínas y ADN. Los compuestos de platino forman entrecruzamientos intracatenarios en el N7 (Nitrógeno 7) de la molécula de la Guanina en el ADN, formando aductos ya sea proteína/ADN o ADN/ADN mediante enlaces covalentes. Esto genera que la estructura del ADN adopte una propiedad rígida y menos flexible, lo cual impide que la helicasa gire la doble hebra en dirección opuesta al superenrollamiento cuando se lleva a cabo la replicación del ADN, ocasionando rupturas de cadena sencilla y doble (Tallarida, 2010). El daño al ADN es reconocido por los sistemas de reparación que se activan y pueden inducir la detención del ciclo celular o la apoptosis, según la severidad del daño al ADN. Las lesiones inducidas por el cisplatino generan distorsiones en el ADN que son reconocidos por múltiples mecanismos de reparación de daño al ADN (Galluzi *et al.*, 2012). Este daño al ADN inducido por el cisplatino, cuando no es reparado de manera exitosa puede llevar a la célula a apoptosis, logrando así detener la proliferación celular (Tallarida, 2010).

Sin embargo, existen dos grandes desventajas del cisplatino como quimioterapéutico, pues presenta una alta toxicidad principalmente: nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad y la resistencia intrínseca o adquirida de las células cancerosas a dicha terapia mediante diferentes mecanismos favoreciendo la supervivencia de las células cancerosas (Browing *et al.*, 2017). Es por eso, que el cisplatino frecuentemente se usa en combinación con otros fármacos, ya que el porcentaje de respuesta obtenida es mayor que el observado en los estudios con un agente único. Los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer del cuello uterino en etapas avanzadas incluyen: cisplatino, carboplatino, en combinación con otros fármacos como Paclitaxel (Taxol®), topotecán y Gemcitabina (Gemzar®), (American Cancer Society, 2017).

Dentro de los principales mecanismos de resistencia tumoral a cisplatino están descritos los siguientes: 1) Reducción de la acumulación intracelular de los componentes de cisplatino; 2) Incremento en la reparación del daño al ADN; 3) Inactivación de apoptosis; 4) Activación de transición epitelio-mesénquima (TEM); 5) Incremento en el secuestro de cisplatino por GSH (Glutación reducido), debido a la participación de proteínas que tienen grupos tiol, que contiene un tri-peptido tiol (Glu- Cys- Gly), las cuales juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia tumoral ya que pueden neutralizar la reactividad del cisplatino, metalotioneinas y otras proteínas; 6) Alteración en la metilación del ADN; 7) Expresión de chaperonas en respuesta al estrés (Galluzi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2016).

La resistencia tumoral aumenta en relación directa al estado de progresión del tumor, siendo esperado que el tumor adquiriera alteraciones genéticas adicionales a medida que progresa y esto, directa o indirectamente, proporciona protección del efecto citotóxico de los tratamientos empleados (Bouwman y Jonkers, 2012).

## **Resistencia a quimioterapias por reparación del daño al ADN**

Uno de los problemas más frecuentes de la quimioterapia en pacientes con CaCu es la resistencia, lo que ocasiona que los tumores se vuelvan recurrentes (Eskander *et al.*, 2014). La capacidad de las células tumorales para reparar los daños al ADN, inducidos por agentes quimioterapéuticos, genera el desarrollo de resistencia y tumores más agresivos (Wieringa *et al.*, 2016).

A lo largo de nuestra vida el genoma está expuesto a constantes cambios, que incluyen: la modificación de las bases, enlaces cruzados intra- e intercatenarios, entrecruzamientos de ADN y proteínas, dímeros de pirimidina, fotoproductos y rupturas de cadena sencilla o doble, los cuales pueden ser causadas por los cambios espontáneos en la estructura química del ADN o por agentes endógenos y exógenos que dañan a esta molécula. Para proteger la estabilidad del genoma, las células cuentan con varios mecanismos o vías de señalización de reparación del daño al ADN dependiendo del tipo de daño (Ghosal y Chen, 2013).

Existen diferentes tipos de daño al ADN que pueden causar rupturas de cadena sencilla, así como también rupturas de cadena doble. Las primeras son reparadas por las vías de reparación por escisión de nucleótidos (REN) y de bases (REB). Por otro lado, la reparación de rupturas de doble cadena puede llevarse a cabo principalmente por las vías de reparación de extremos no homólogos (por sus siglas en inglés, NHEJ) y de recombinación homóloga (RH) (Díaz y Domínguez, 2010).

Con el fin de eliminar específica y eficazmente las células tumorales mediante terapias que inducen daño en el ADN, es importante tomar ventaja de defectos en alguna vía de reparación de daño al ADN en células tumorales. Estas propiedades de las células tumorales pueden proporcionar biomarcadores o blancos para la sensibilización. La inhibición de proteínas específicas de alguna vía de reparación de daño al ADN, puede ser compensada por el aumento de la actividad de otras proteínas o vías, permitiendo a la célula cancerosa desarrollar mecanismos de resistencia (Díaz y Domínguez, 2010).

Esto presenta nuevos retos y mejores oportunidades para el tratamiento del cáncer, por lo que utilizar inhibidores de estas vías de reparación podría tener el potencial

de sensibilizar a las células a la quimioterapia (en este caso el cisplatino) cuyo mecanismo de acción es dañar el ADN (Ghosal y Chen, 2013).

### **Reparación de ADN por Recombinación Homóloga (RH)**

La vía de reparación por recombinación homóloga se activa cuando la célula detecta una ruptura de cadena doble, en la fase S tardía y en la fase G2 del ciclo celular; utiliza la cromátida hermana no dañada como un templete para la reparación del daño. En general, muchos agentes quimioterapéuticos bloquean la replicación del ADN, que conduce a la detención y/o el colapso de las horquillas de replicación y la generación de lesiones que se reparan mediante recombinación homóloga (Ghosal y Chen, 2013).

La recombinación homóloga inicia por la resección nucleofílica en dirección 5´-3´ por el complejo MRN; MRE11 (proteína reparadora de doble cadena), las proteínas RAD50 y NBS1 (proteína del síndrome Nijmegen), que recluta y activa a ATM (Ataxia telangiectasia mutada). Se genera un extremo 3´ de cadena sencilla que será recubierto por RPA (Proteína de replicación A), para evitar la degradación y enviar una señal de activación a ATR. La activación de esta proteína, lleva a la fosforilación de proteínas efectoras como CHK2, BRCA2, P53, H2AX que participan en la detención del ciclo celular, apoptosis y reparación del daño al ADN (Marechal y Zou, 2013).

El extremo de la cadena sencilla 3' es cubierto por RPA (proteína de replicación A), para prevenir su degradación y para proporcionar la señal de activación a la cinasa ATR. A continuación, RAD51 es reclutado y se asocia a un filamento de nucleoproteína, desplazando a RPA. El reclutamiento y ensamblaje de los filamentos de la nucleoproteína RAD51 es facilitado por cinco diferentes proteínas paralogas (Rad51B, C, y D; XRCC2 Y XRCC3).; después, RAD51 forma filamentos de nucleoproteína, que invaden la cromátida hermana homóloga adyacente, dando la formación de una estructura en forma de asa. La extensión del asa, permite la captura del otro extremo del ADN, dando como resultado una estructura de cadenas entrecruzadas conocido como intermediario de "Holliday" La resolución de la unión

tipo “Holliday” se realiza por medio de una resolvasa, como Gen1, completando la reparación, y generando dos cromátidas hermanas idénticas, (Imagen 4) (Rassool y Tomkinson, 2010; Jasin y Rothstein, 2013).

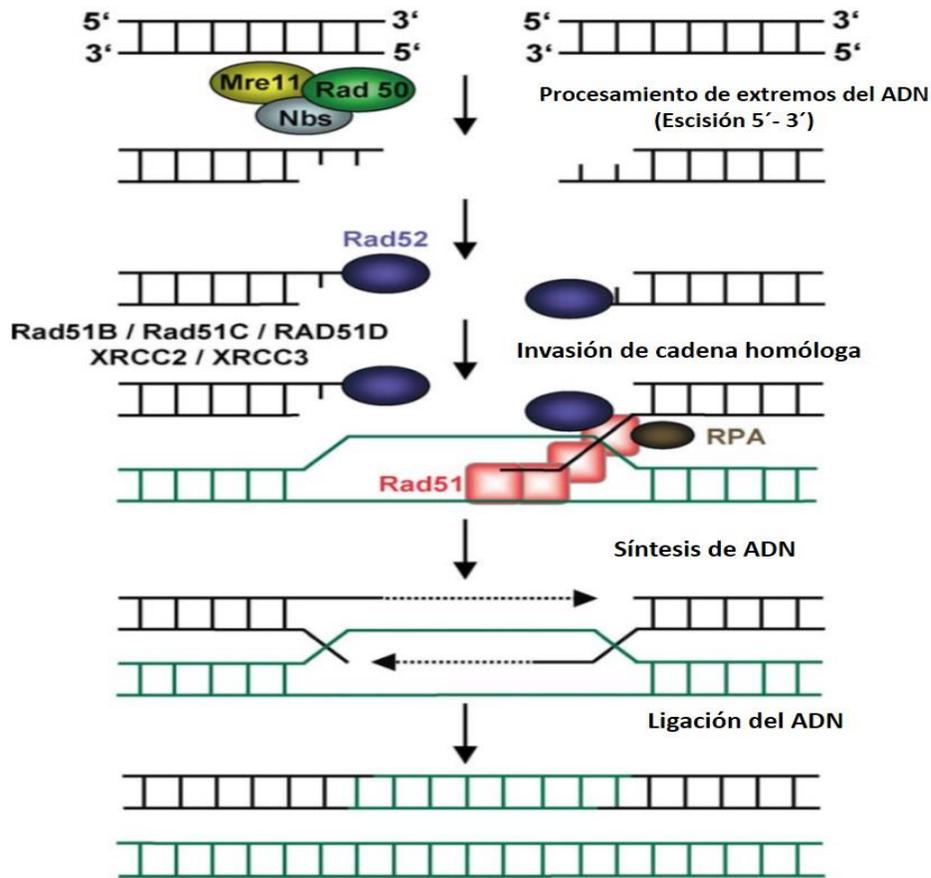


Imagen 4.- Reparación del daño al ADN por recombinación homóloga. Obtenida y modificada de Christmann *et al.*, 2003.

En el CaCu, RAD51 está sobre expresada y se ha asociado con un pobre pronóstico para las pacientes con este diagnóstico (Chen Q., *et al.*, 2017).

La activación de la RH es crucial para el mantenimiento de la estabilidad genómica, y la función de toda la vía puede verse comprometida por la mutación en uno o más de sus genes. En diversas líneas celulares de cáncer se ha observado que esta vía de reparación se encuentra sobre-activada en comparación con células que no son tumorales (Chernikova *et al.*, 2012).

## Resveratrol como quimiosensibilizador

El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol y fitoalexina natural, sintetizado en condiciones de estrés, ampliamente consumido en la dieta mediterránea en forma de cacahuate, uvas, vino, entre muchos otros frutos, verduras y legumbres. El resveratrol se caracteriza por tener una amplia gama de actividades biológicas entre las cuales se encuentra su efecto: antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector, cardioprotector, quimiopreventivo, antitumoral y quimiosensibilizador (Cottar *et al.*, 2014; Subash *et al.*, 2011).



Imagen 5.- Actividades biológicas del resveratrol en múltiples procesos celulares.

Durante los últimos años, estos efectos han colocado al resveratrol en el punto de interés de la investigación.

En 1977, las investigaciones de Jang y colaboradores propusieron al resveratrol como un potencial agente quimiopreventivo del cáncer (Jang *et al.*, 1997). Varios estudios, han sugerido los posibles mecanismos anticancerígenos para el

resveratrol como inhibición de la proliferación celular, así como la inducción de apoptosis por la vía de PI3K/Akt/mTOR, a través de la inhibición de la fosforilación de Akt en células de cáncer de mama, ovario, útero, próstata y células de mieloma múltiple (Legg, 2012; Kundu y Surh, 2008).

La biodisponibilidad de este compuesto natural dependerá de su estructura química y las reacciones metabólicas durante la ingesta (Scalbert and Williamson, 2000). La glicosilación en el caso del resveratrol lo hace más soluble y lo protege de ser degradado (D'Archivio *et al.*, 2007).

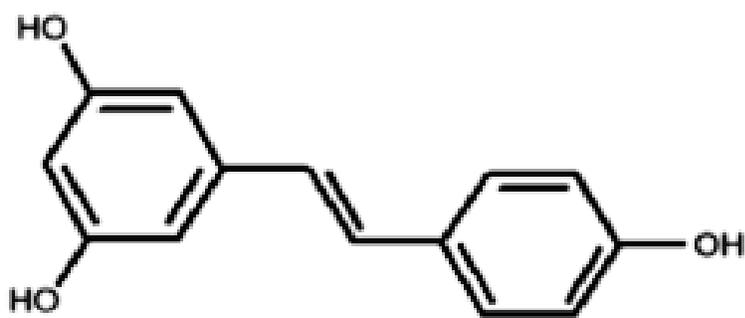


Imagen 6.- Forma activa (trans-resveratrol). Obtenida de Gambini *et al.*, 2013.

## **Mecanismo de acción del Resveratrol**

Los múltiples efectos del resveratrol dependerán de la naturaleza de las células, la fase de ciclo celular y las variables experimentales (Beaudeau *et al.*, 2010).

En estudios *in vitro* se encontraron diferentes blancos intracelulares del resveratrol que tienen efecto en cascadas de señalización como en el crecimiento celular, inflamación, inducción de apoptosis, angiogénesis, invasión celular y la metástasis. Estos incluyen los supresores de tumores p53 y Rb; reguladores del ciclo celular, ciclinas, CDKs, p21WAF1, p27KIP y INK, las cinasas ATM/ATR; factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1, c-Jun, y c-Fos; factores angiogénicos y metastáticos, VEGF y metaloproteinasas de matriz 2 y 9; ciclooxygenasas involucradas en inflamación; y reguladores apoptóticos y de supervivencia como Bax, Bak, PUMA, Noxa, TRAIL, APAF, survivina, Akt y Bcl-2 (Athar *et al.*, 2009).

## **Resveratrol como fitoestrógeno con actividad hormonal: agonista y antagonista de los estrógenos.**

La actividad estrogénica del resveratrol ha sido reportada, debido a la capacidad de actuar como agonista o antagonista del estradiol ( $E_2$ ), el cual actúa mediante la regulación de transcripción de genes, a través de la unión y actividad con dos principales receptores intracelulares (ERs), el Receptor de Estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y su isoforma beta ( $ER\beta$ ), los cuales se unen a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs), ubicados en regiones regulatorias de los genes blanco. Participan en el mantenimiento de la función reproductiva, así como en el desarrollo de cáncer de mama, ovario y cérvico-uterino (Goswami y Das, 2009; Varoni *et al.*, 2016; Azios y Dharmawardhane, 2005).

Los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , a pesar de tener una estructura similar, se diferencian en la localización cromosómica, secuencia de aminoácidos, localización en tejido y función fisiológica. El  $ER\alpha$  tiene un papel principal en la fisiología de estrógenos, se sabe que la exposición prolongada a estrógeno y su activación puede aumentar el riesgo de cáncer de mama y endometrio. Se expresa en adipocitos, circulación

sanguínea y sistema inmune. Por otro lado, el ER $\beta$  regula la expresión de genes, modulando la respuesta inmune y regulación de apoptosis. Su expresión se localiza en diferentes tejidos como próstata, ovario, testículo, vejiga, uretra y sistema vascular. Los niveles de ER $\alpha$  se encuentran aumentados en cáncer de ovario, próstata y cérvico-uterino (Bronowicka-Klys *et al.*, 2016).

La estructura química del resveratrol es parecida al estrógeno sintético dietilestilbestrol (4, 4'-dihidroxi-trans-dietil-estilbeno) y, por ende, al estradiol (Signorelli y Ghidoni 2004).

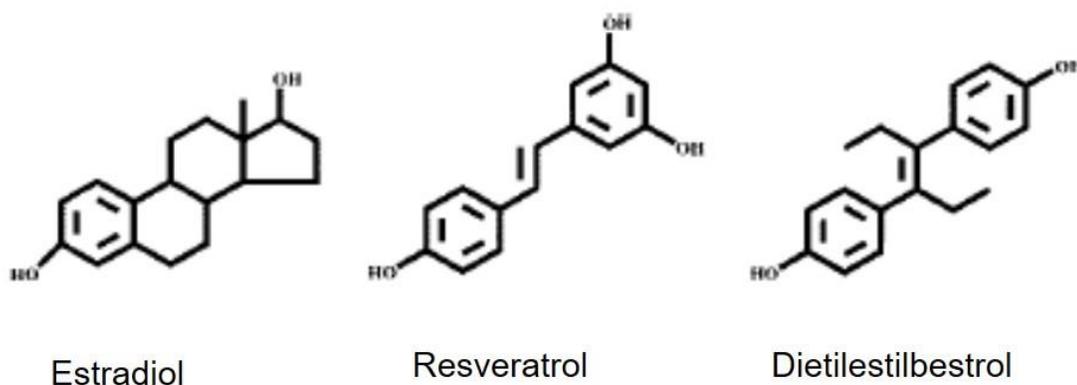


Imagen 7.- Estructura química de estradiol, resveratrol y dietilestilbestrol. Obtenido y modificado de Levenson *et al.*, 2003.

Se ha reportado que el resveratrol antagoniza funciones como reducir la cantidad del colesterol en suero y la inducción de proliferación en células de cáncer de mama MCF-7 (positivas al receptor de estrógenos alfa) (Goswami y Das, 2009).

En células MCF-7, el resveratrol actúa como un super agonista, es decir produce una respuesta transcripcional máxima mayor que el estradiol, al activar la transcripción de genes regulados mediante estrógenos, pero menor activación en células de carcinoma de ovario, por lo que se sugiere que el efecto del resveratrol puede variar según la distribución del tipo de receptor intracelular de estrógeno, además de la regulación de co-activadores y co-represores transcripcionales (Gehm *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que el resveratrol actúa como agonista en líneas celulares de cáncer de mama transfectadas de manera estable con ER  $\alpha$ . Existen estudios donde se sugiere que a concentraciones bajas de resveratrol promueve el crecimiento mediante el ER en líneas celulares de cáncer de mama positivas a ER, pero en altas concentraciones tiene un efecto contrario independientemente de ER, por lo que estos hallazgos siguen siendo desconcertantes. Levenson *et al.*, (2003). Estas aportaciones sugieren que las actividades agonistas o antagonistas dependerán de la dosis utilizada.

Existen reportes de que varios fitoestrógenos se unen al ER $\beta$  con mayor afinidad que ER $\alpha$ . Sin embargo, en un estudio observaron que en células de CHO-K1 (células de ovario de hámster chino), el resveratrol se une con afinidad de unión comparable con ambos receptores. Además, reportan que la unión del resveratrol al ER $\beta$ , tiene un efecto transcripcional mayor que la unión del estradiol al ER $\beta$  en un elemento de respuesta palindrómica, por lo tanto, sugieren que aquellos tejidos que únicamente expresan ER $\beta$  o mayor cantidad podrían ser sensibles a la actividad agonista de estrógenos del resveratrol. Así, la actividad agonista del resveratrol dependerá del tipo de secuencia del elemento de respuesta al que se une, actuando como un modulador alostérico en la actividad del tipo del receptor de estrógenos expresado. Así, los ER $\alpha$  y  $\beta$  ocupados por el resveratrol se unen al elemento de respuesta, sin embargo, el resveratrol inhibe la unión del receptor de estrógenos al elemento de respuesta de manera dependiente de la concentración utilizada. En ese mismo estudio, en la línea celular MCF7 el resveratrol muestra un efecto de tipo agonista y antagonista de receptores de estrógenos regulando la proliferación celular, los autores señalan, que esto dependerá de la concentración utilizada (Bowers *et al.*, 2000).

## ANTECEDENTES

Se ha reportado que el resveratrol tiene efecto como inductor de muerte celular mediante dos mecanismos: apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (C33A, HeLa y SiHa). El principal mecanismo de muerte celular en células HeLa y SiHa fue a través de apoptosis, sin embargo, también observaron autofagia en las células C33A. La disminución en el porcentaje de la proliferación celular fue dependiente de la dosis:  $IC_{50}=194.6 \mu M$ ,  $IC_{50}=137.1 \mu M$ ,  $IC_{50}=198.5 \mu M$  respectivamente (García *et al.*, 2013).

Interesantemente se ha demostrado que el resveratrol y otros agentes como la curcumina, pterostilbeno y el galato de epicatequina tiene un efecto sobre la regulación de proteínas virales del HPV en la línea celular HeLa (HPV16), a través de la inhibición de la expresión de E6 eficazmente, también, demostraron que estos compuestos reducen la expresión de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción importante para un microambiente inflamatorio, VEGF, una de las citocinas que participan en la inducción de angiogénesis y PCNA, una proteína marcadora de proliferación (Mukherjee *et al.*, 2017).

Otro estudio demostró un efecto sinérgico del cisplatino y del resveratrol a través de la disminución de la proliferación celular en una línea celular de cáncer de ovario (A278), con la combinación de resveratrol (0-60  $\mu M$ ) y cisplatino (10  $\mu M$ , durante 24 h) (Baribeau *et al.*, 2014).

Un estudio más reciente sugiere que este efecto sinérgico del resveratrol con el cisplatino disminuye la viabilidad celular, debido a la inducción de apoptosis con el aumento en la expresión de proteínas pro apoptóticas como Bcl-2 y Bax en líneas celulares de cáncer de pulmón (H838 y H520) con el uso combinado de cisplatino (5  $\mu g/ml$ ) y resveratrol (40  $\mu g/ml$ ) durante 24 h (Ma L, *et al.*, 2015).

En otro estudio evaluaron los cambios en un perfil de expresión génica global en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) con dos concentraciones de resveratrol (150 y 250  $\mu mol/l$ ) para definir posibles vías de señalización que están involucradas en las respuestas biológicas al tratamiento de este compuesto natural y observaron

que el resveratrol inhibe la expresión de genes asociados a vías de reparación del DNA en particular la vía recombinación homóloga (León-Galicia *et al.*, 2012).

Los tumores con defectos en la vía de reparación de daño a ADN por recombinación homóloga (RH) son altamente sensibles a los quimioterapéuticos derivados del platino (cisplatino y carboplatino). La alta frecuencia de errores en la vía de RH presente en tumores puede ser la base de la eficacia de la terapia citotóxica y proporcionar un fundamento para el uso de inhibidores de HR para sensibilizar a los tumores con la quimioterapia convencional (Curtin, 2012).

Por otro lado, se ha reportado que la proteína RAD51 de RH se sobreexpresa en varios tipos de cáncer como mama, melanoma, glioblastoma, ovario, páncreas, pulmón de células no pequeñas y cáncer cervical y la expresión elevada de RAD51 se correlaciona con un mal pronóstico (Chen Q. *et al.*, 2017).

Previamente, Hine y colaboradores estudiaron la sobreexpresión de Rad51 en células de cáncer para diseñar una terapia contra el cáncer, encontrando que la actividad del promotor de RAD51 está aumentada en promedio 840 veces y hasta más de 12,500 veces en células cancerosas en comparación a las no cancerosas. Sobre esta diferencia significativa en la actividad del promotor de las células tumorales, diseñaron una estrategia terapéutica en la que el promotor RAD51 se fusionó a una secuencia que codifica la toxina de la difteria A (DTA), y el plásmido resultante se transfectó en varios tipos de células de cáncer incluyendo fibrosarcoma, mama, cervicouterino, células epiteliales de mama no cancerosas y fibroblastos. Cabe destacar, que las células de cáncer murieron y las normales no, pero no murieron por efecto del plásmido, sino probablemente a consecuencia de una mayor expresión de la DTA, es decir debido a que las células cancerosas activan con mayor efectividad el promotor de RAD51 que las células normales, por el efecto de la toxina DTA que se encuentra bajo el control del gen RAD51 (Hine *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que las terapias dirigidas inhibiendo RAD51 o tomando ventaja de la sobre-expresión de esta proteína en células cancerosas como en el trabajo anteriormente mencionado podrían ser altamente específicas para el tumor con éstas características (Rassool y Tomkinson, 2010).

Por otro lado, se ha encontrado sobreexpresada a ATM, proteína sensora del daño, en la línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) resistente a cisplatino. Además, se informa que ATM no solo contribuye a la resistencia a cisplatino, sino que tiene un papel importante en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la metástasis. Shen y colaboradores, reportaron que la inhibición de ATM es capaz de revertir la TEM, con la reducción del metastásico de NSCLC mediante la regulación de la vía JAK-STAT-PD-L1 (Shen *et al.*, 2019).

Se sugiere que el uso de agentes inhibidores de ATM (por ejemplo, análogos de nucleósidos como la sapacitabina) o bien aberraciones pueden sensibilizar cánceres resistentes a los medicamentos de platino (Choi *et al.*, 2016).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CaCu representa todavía un enorme problema de Salud Pública, siendo la segunda causa de mortalidad en mujeres jóvenes por cáncer en México. La población de mujeres menores de 40 años de edad que son diagnosticadas con CaCu se encuentra en plenitud de la edad fértil o habitualmente iniciando una familia. El deseo de mantener el potencial reproductivo de la paciente joven plantea desafíos sobre cómo llevar a cabo el tratamiento adecuado.

Los tratamientos que se han desarrollado han sido prometedores para ganar la batalla contra el cáncer; sin embargo, las desventajas después de recibir el tratamiento son la pérdida de la fertilidad y en el mejor de los casos la necesidad de recurrir a técnicas de reproducción para asegurar la concepción en el caso de las mujeres jóvenes que tienen el deseo de tener hijos.

La quimioterapia en el CaCu es uno de los tratamientos que se utilizan a menudo y se ha usado desde hace varios años en sus diversas modalidades; sin embargo, su papel y su utilidad potencial aún se encuentran en estudio. A pesar de los resultados positivos en respuestas biológicas y clínicas se ha observado un incremento de la toxicidad aguda con la combinación del tratamiento además de la quimio resistencia de las células cancerosas siendo así los principales obstáculos en el tratamiento y manejo contra el cáncer.

Uno de los principales mecanismos de quimiorresistencia de las células tumorales es la activación de vías de reparación del ADN, por lo que los inhibidores de estas vías podrían aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos que inducen lesiones en el DNA, así como revertir la resistencia terapéutica asociada con la reparación del DNA.

Por lo que es de nuestro interés demostrar si el resveratrol funciona como un agente quimiosensibilizador en líneas celulares de CaCu y si este efecto es dependiente de la inhibición de proteínas involucradas en la vía de reparación por HR. Este estudio es importante porque nos permitiría proponer al resveratrol como un agente quimiosensibilizador en la terapia basada a cisplatino, permitiendo reducir la toxicidad inducida por este fármaco en pacientes con cáncer cérvico-uterino.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál será el efecto del resveratrol sobre la vía de reparación de daño al ADN por recombinación homóloga en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino tratadas con cisplatino?

## **HIPÓTESIS**

El resveratrol funciona como un agente quimiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino tratadas con cisplatino debido a que inhibe la vía de reparación por RH.

## **OBJETIVO GENERAL**

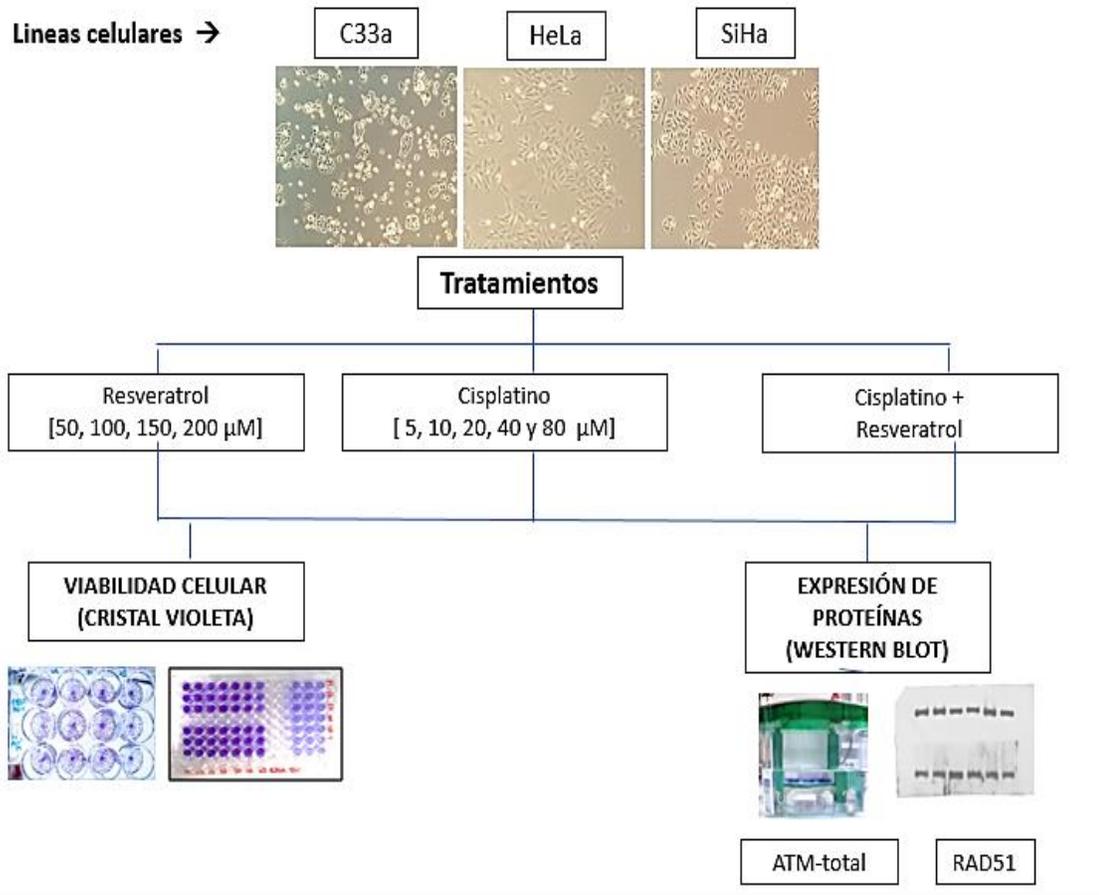
Analizar el efecto del resveratrol como quimiosensibilizador al tratamiento con cisplatino y la vía de reparación de daño al ADN por RH, en líneas celulares de CaCu.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Estudiar el efecto del resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad celular en tres líneas celulares de CaCu con diferentes características en la presencia de HPV y p53.
- II. Analizar el efecto del resveratrol, en combinación con cisplatino, sobre la viabilidad de las tres líneas celulares de CaCu.
- III. Evaluar el efecto del resveratrol sobre la cantidad relativa de las proteínas ATM y RAD51, como marcadores de actividad de la vía de RH, en las tres líneas tumorales de CaCu.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente esquema muestra la estrategia que se utilizó a lo largo del desarrollo del proyecto.



Esquema 1.- Estrategia experimental general para las diferentes técnicas que se desarrollaron a lo largo del proyecto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares de CaCu

**Células C33A:** Línea celular humana proveniente de un carcinoma de cérvix, con morfología epitelial. Es una línea celular negativa a VPH, p53 con mutación en el residuo R273C (sustitución de arginina por cisteína) y p-RB mutado.

**Células HeLa:** Esta línea celular es proveniente de un adenocarcinoma de cuello uterino. Tiene integrado el genoma del virus de papiloma humana 18 (VPH-18).

**Células SiHa.** Línea celular humana que se aisló de un carcinoma de células escamosas de cérvix. Se ha reportado que tiene integrado de 1 a 2 copias por célula del virus de papiloma humano 16 (VPH-16).

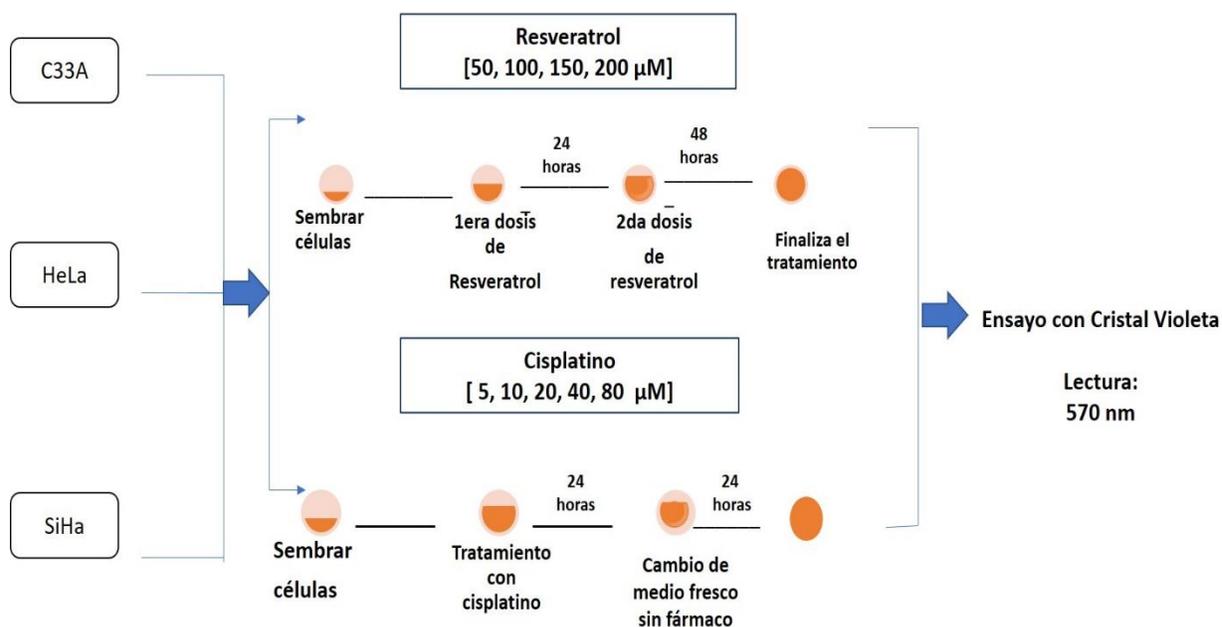
Las líneas celulares fueron adquiridas de la compañía ATCC (American Type Culture Collection) y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero de feto bovino, sin antibiótico y se mantuvieron en incubación a 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera de humedad a 37°C.

## TRATAMIENTO CON RESVERATROL Y CISPLATINO

Las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa fueron cultivadas en placas de 12 pozos a una densidad de  $40 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$  y  $40 \times 10^3$  respectivamente, en ausencia o presencia de resveratrol (Sigma –Aldrich) por 48 h con diferentes concentraciones (50-200)  $\mu\text{M}$ . Se utilizó como control negativo, etanol al 1.3 % que equivale a la concentración utilizada en la dosis más alta.

Para el tratamiento con cisplatino (Sigma Aldrich 479306-5G) se utilizaron diferentes concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 80  $\mu\text{M}$  por 24 horas. El vehículo para disolver el cisplatino fue solución salina (cloruro de sodio 0.9%) que equivale a la concentración utilizada en la dosis más alta.

Al finalizar el tratamiento se lavaron las células con PBS (ver esquema 2).



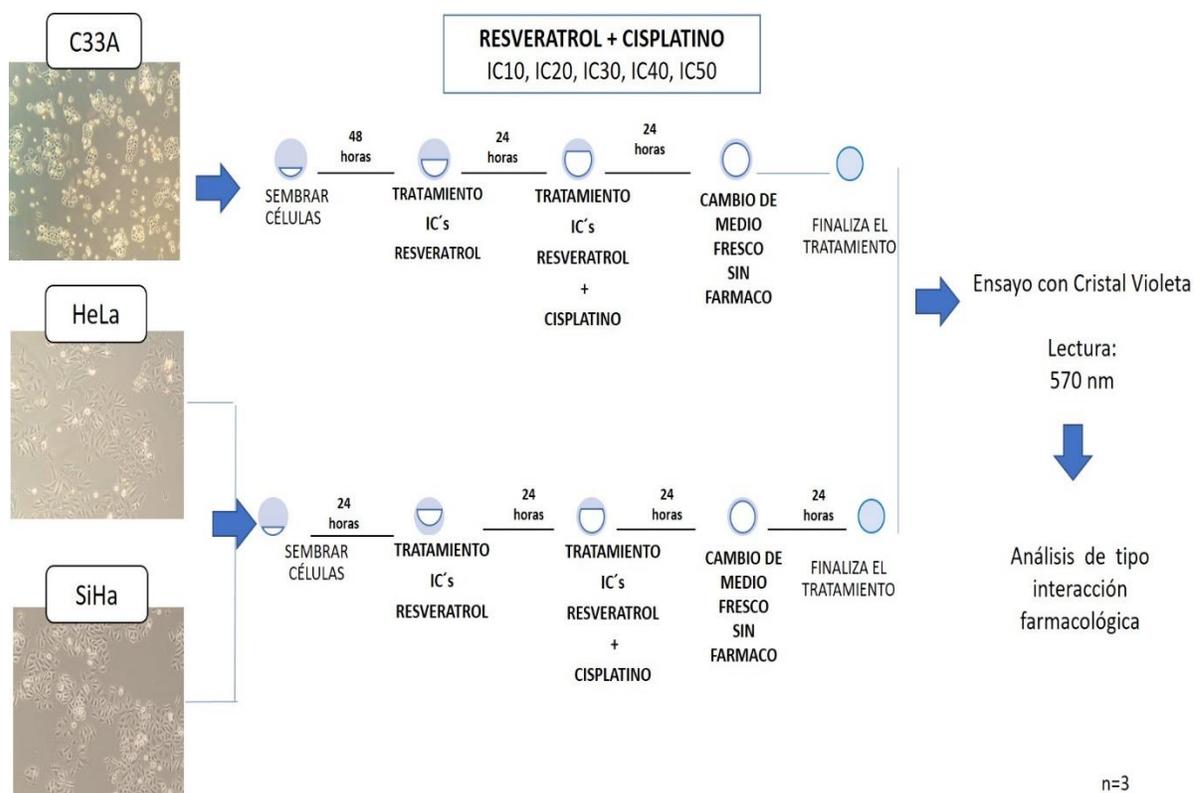
Esquema 2.- Estrategia utilizada para el tratamiento de resveratrol y cisplatino en las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa.

## COMBINACIÓN DE RESVERATROL Y CISPLATINO

Se obtuvieron cada una las de concentraciones inhibitorias (IC's), determinadas mediante curvas dosis respuesta que se analizaron posterior a la exposición de resveratrol y cisplatino por separado en las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa.

A continuación, se trataron las células 24 h con resveratrol y 24 h después se adiciono la combinación de resveratrol con cisplatino de manera proporcional según las IC's determinadas, a continuación, se sustituyó por medio fresco 24 h más (ver el esquema 3).

Finalmente, para determinar el tipo de interacción farmacológica se utilizó el programa CalcuSyn.



Esquema 3.- Estrategia utilizada para el tratamiento de resveratrol en combinación con cisplatino las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa.

## **ENSAYO DE VIABILIDAD POR LA TÉCNICA DE CRISTAL VIOLETA**

Para realizar el ensayo de cristal violeta, al cabo de 48 horas de tratamiento con resveratrol, se retiró el medio y se lavaron con 2 mL de PBS. Se adicionaron 500  $\mu$ L de la solución de cristal violeta al 0.75 % (etanol al 50%, NaCl al 0.25% y formaldehído al 1.75 %) e incubaron por 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se decantó la solución y se realizaron varios lavados con agua corriente, y se dejaron secar completamente. Después se adicionó 1 mL de SDS al 1% para solubilizar el colorante, se agitó durante 10 min.

Finalmente, se colocaron 200  $\mu$ L por pozo en una placa de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA.

Los datos fueron analizados en el programa Sigma Plot para determinar las IC's correspondientes a cada fármaco en las tres líneas tumorales.

## **WESTERN BLOT**

Se obtuvieron los extractos de proteínas totales de las 3 líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de resveratrol con buffer de lisis (RIPA) mediante sonicación de los botones celulares. Posteriormente, se realizó la cuantificación de las proteínas en cada una de las muestras mediante el método de Lowry.

A continuación, se analizaron las cantidades relativas de las proteínas ATM [Y170] (ab32420 Lot GR198716-33), utilizando una dilución de 1:1000 en albumina al 3% así como RAD51 (sc-8349 Lot #D2811, Rabbit polyclonal) 1:1000, utilizando anticuerpos específicos para cada una.

La cuantificación de las bandas específicas se evaluó por densitometría mediante el programa Image J y los resultados se expresaron en número de píxeles (DOR) de las proteínas de interés con respecto a la proteína de normalización  $\beta$ -actina.

## ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS PARA ATM Y RAD51.

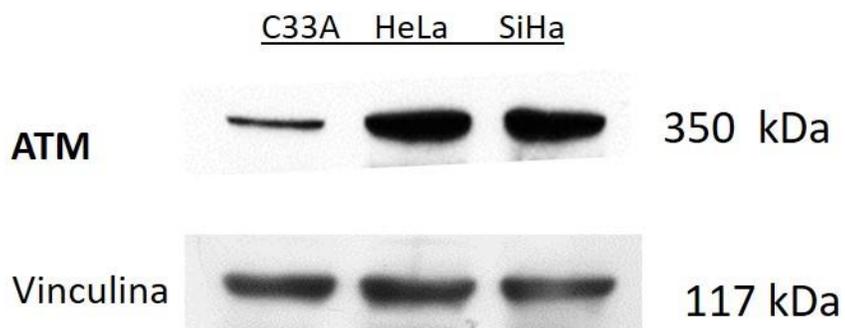


Imagen 7.- Estandarización de anticuerpos para ATM. Se cuantifico la cantidad de proteína y se utilizaron 40  $\mu$ g de en cada pozo en un gel al 8% de acrilamida.

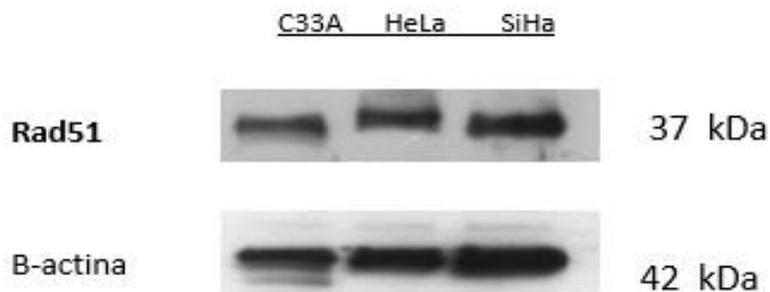


Imagen 8.- Estandarización de anticuerpos para Rad51. Se cuantifico la cantidad de proteína y se utilizaron 40  $\mu$ g de en cada pozo en un gel al 10% de acrilamida.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se muestran como el promedio y la desviación estándar (SD). Para determinar las diferencias estadísticas de los resultados se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey- Kramer para comparar la diferencia entre los grupos.

Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$  empleando el programa estadístico GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Cada uno de los valores determinados del índice de combinación fueron obtenidos mediante al programa Sigma Plot. Se utilizó el programa Calsusyn para el análisis del tipo de interacción farmacológica y las proteínas de interés fueron analizadas por densitometría con el programa Image J.

## RESULTADOS

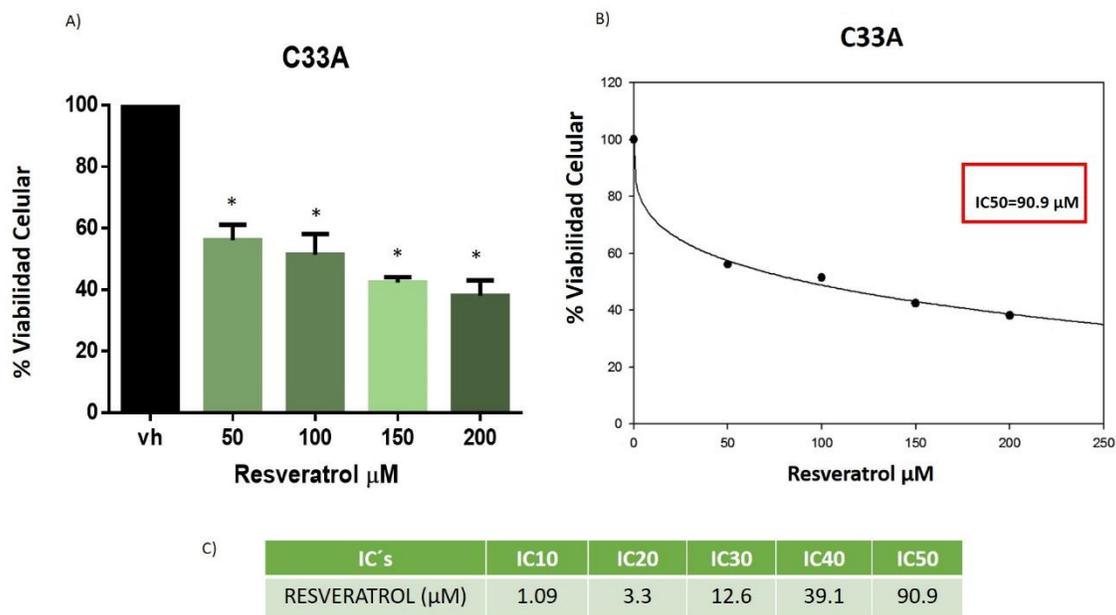
### Efecto de resveratrol en las tres líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.

En primera instancia se estudió el efecto del resveratrol sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino: C33A (negativa al HPV, p53 y RB mutados), HeLa (positiva a HPV18) y SiHa (positiva a HPV16).

Las células C33A, HeLa y SiHa, fueron tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ) de resveratrol y se cambió el fármaco a las 24 h. A continuación, se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de cristal violeta.

Los resultados de la Figura 1A muestran que el resveratrol disminuye la viabilidad de las células C33A, de manera dependiente de la dosis, ya que a partir de la concentración de 50  $\mu\text{M}$  la viabilidad disminuye por debajo del 60% con respecto al control. Con base en estos resultados se determinaron las concentraciones inhibitorias (IC's): IC10, IC20, IC30, IC40 y IC50 como se observa en la gráfica de la Figura 1B, obtenida en el programa Sigma Plot.

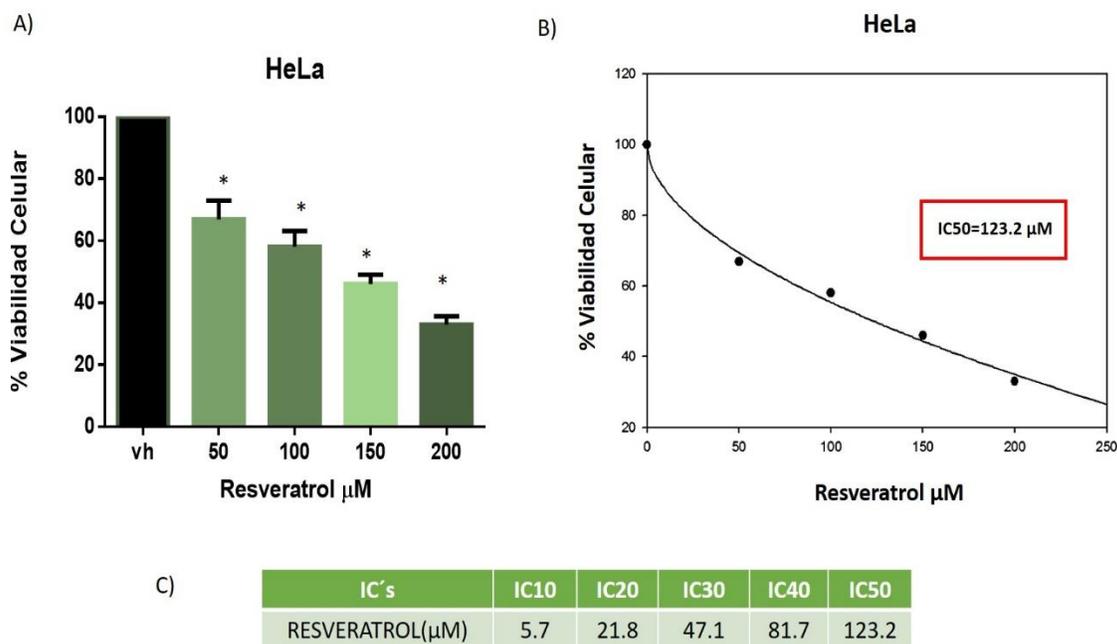
En C33A la IC50 se alcanza con una concentración de 90.9  $\mu\text{M}$ .



**Figura 1.- Efecto del resveratrol sobre la viabilidad de las células C33A.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas las células con diferentes concentraciones de resveratrol durante 48 horas. Las barras representan el promedio de tres

experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis-respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con resveratrol. C) En la tabla se muestran valores, en concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

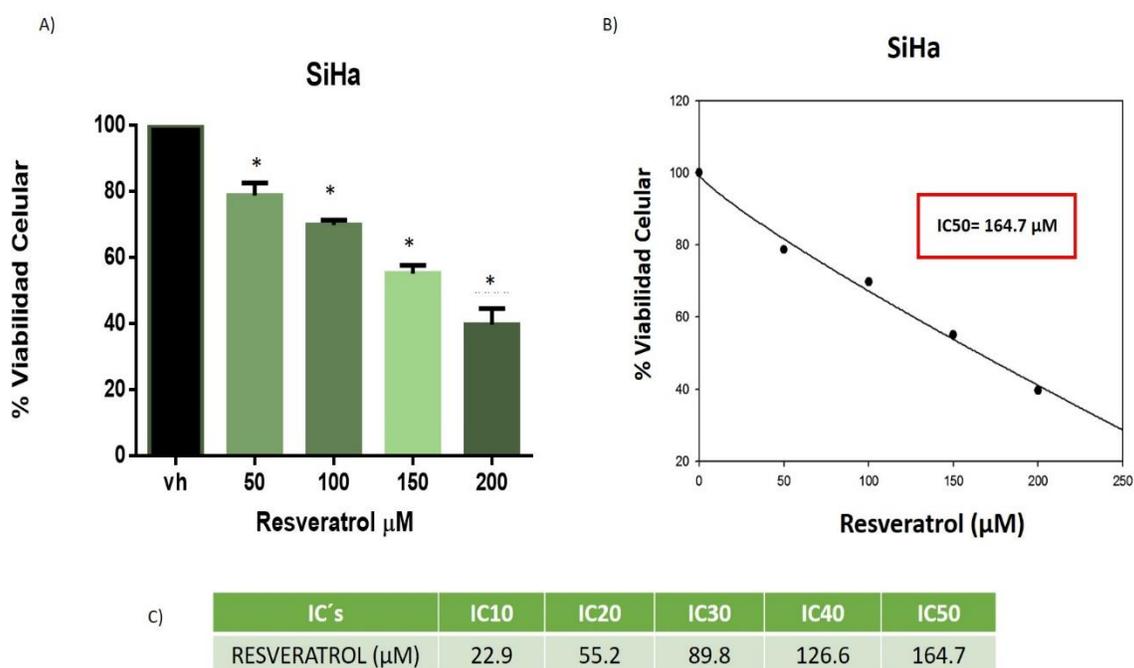
En la línea celular HeLa (Figura 2), la disminución del 50 % de la viabilidad celular se alcanzó con la concentración de 123.2  $\mu\text{M}$ . De acuerdo al análisis estadístico, se observó que existen diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en la viabilidad celular con el tratamiento en todas las concentraciones analizadas en comparación con el control. Además, se observó que estas células responden de manera dependiente de la dosis de resveratrol, es decir, conforme aumenta la concentración de resveratrol la viabilidad se reduce proporcionalmente.



**Figura 2.- Efecto del resveratrol sobre la viabilidad de las células HeLa.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas con diferentes concentraciones de resveratrol durante 48 horas. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con resveratrol. C) La tabla

muestra los valores, en concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

Finalmente, en la línea celular SiHa (Figura 3), también se observaron diferencias significativas en todas las dosis utilizadas para el tratamiento con resveratrol, respecto al control, donde la IC50 calculada es de  $164.7 \mu\text{M}$ . De acuerdo con estos resultados, SiHa, es la línea celular más resistente al tratamiento con resveratrol, comparada con HeLa (IC50 =  $123.2 \mu\text{M}$ ) y C33A (IC50 =  $90.9 \mu\text{M}$ ).

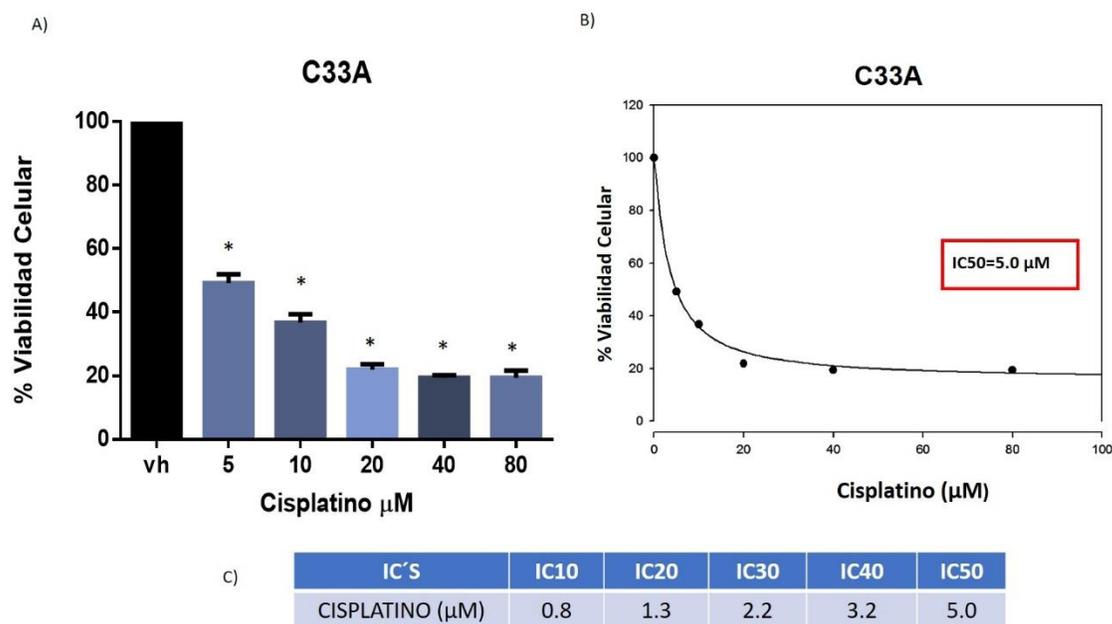


**Figura 3.- Efecto del resveratrol sobre la viabilidad de las células SiHa.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas con diferentes concentraciones de resveratrol durante 48 horas. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con resveratrol. C) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

## Efecto del tratamiento con cisplatino sobre la viabilidad de las células C33A, HeLa y SiHa.

Bajo las mismas condiciones experimentales en las cuales se analizó el efecto del resveratrol, se analizó el efecto del cisplatino sobre la viabilidad de estas líneas celulares a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$ ) pero en esta ocasión incubadas solamente durante 24 h (dada la alta toxicidad del cisplatino) y posteriormente se incubaron con medio fresco por otras 24 h.

En la línea celular C33A se observó un efecto de manera dosis dependiente en las concentraciones de 5 y 20  $\mu\text{M}$ , ya que en las concentraciones de 40 y 80  $\mu\text{M}$  el efecto es igual a la concentración de 20  $\mu\text{M}$ . El valor de la IC50 es de 5  $\mu\text{M}$ , es decir, con la concentración más baja utilizada disminuyó el 50% de viabilidad celular.

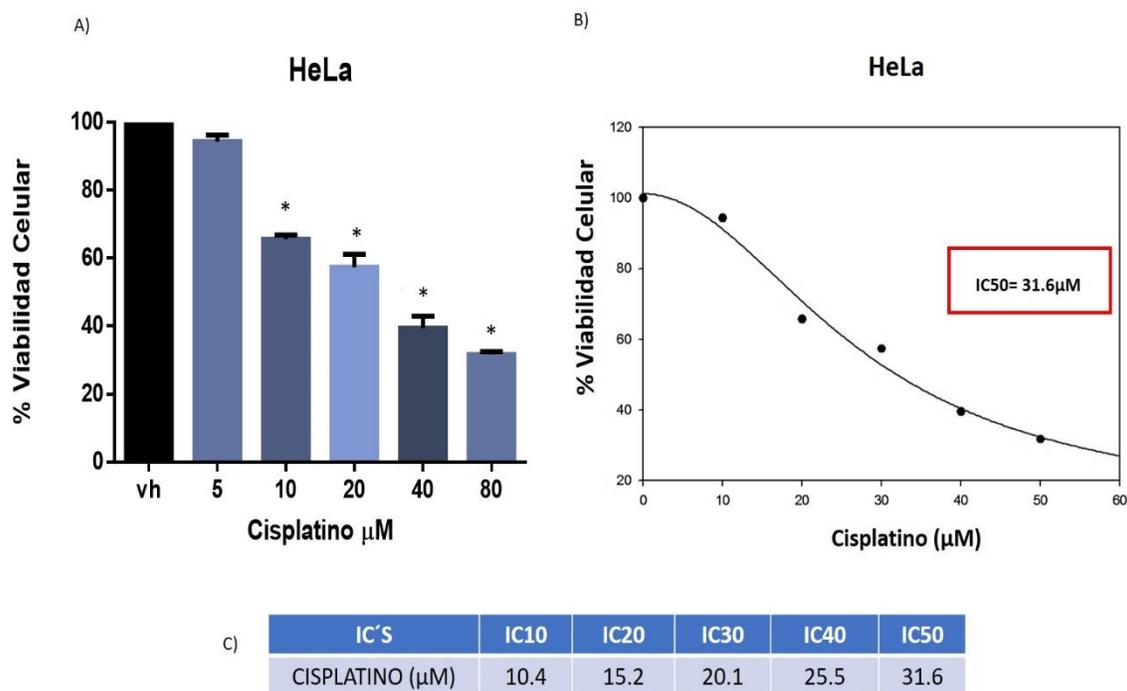


**Figura 4.- Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de las células C33A.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas con diferentes concentraciones de cisplatino durante 24 horas y posteriormente se incubaron con medio fresco 24 h más. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias

(IC's) del tratamiento con cisplatino. C) La tabla muestra los valores, en concentración ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

Para la línea celular HeLa se observó que la respuesta al cisplatino es de manera dosis dependiente entre las concentraciones de 10 y 80  $\mu\text{M}$ ; ya que en la concentración de 5  $\mu\text{M}$  no hay efecto sobre la viabilidad celular.

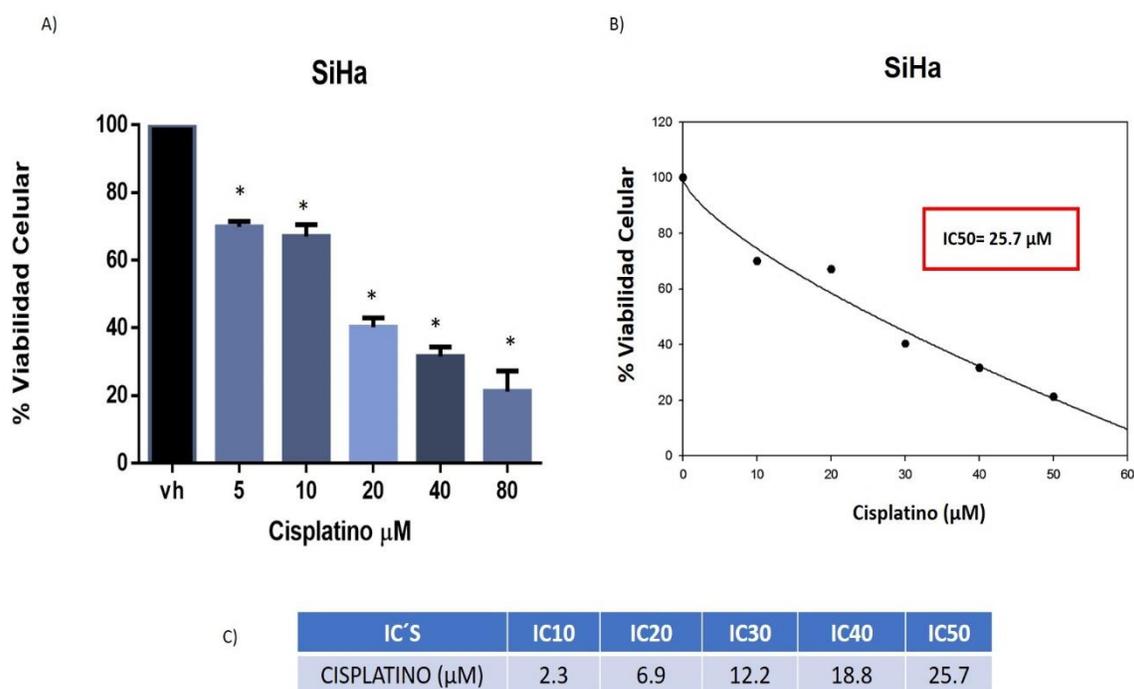
El valor que se determinó como la IC50 fue de 31.6  $\mu\text{M}$  de cisplatino, (ver Figura 5).



**Figura 5.- Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de las células HeLa.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas con diferentes concentraciones de cisplatino durante 24 horas y posteriormente se incubaron con medio fresco 24 h más. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con cisplatino. C) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

Por último, se analizó el efecto del cisplatino sobre la viabilidad de la línea celular SiHa. Se observa que, en las concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  (Figura 6A) el efecto es dosis dependiente. La concentración de cisplatino en la que se alcanzó la IC50 en esta línea celular fue de 25.7  $\mu\text{M}$  (Figura 6B).

De acuerdo a estos resultados HeLa ( $\text{IC}_{50}=31.6$ ), es la línea celular más resistente al tratamiento con cisplatino, comparada con SiHa ( $\text{IC}_{50} = 25.7 \mu\text{M}$ ) y finalmente las células C33A ( $\text{IC}_{50} = 5.0 \mu\text{M}$ ) que son las más sensibles.



**Figura 6.- Efecto del cisplatino sobre la viabilidad de las células SiHa.** A) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas con diferentes concentraciones de cisplatino durante 24 horas y posteriormente se incubaron con medio fresco 24 h más. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.0001$ . B) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con cisplatino. C) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar ( $\mu\text{M}$ ), determinados mediante el programa Sigma Plot.

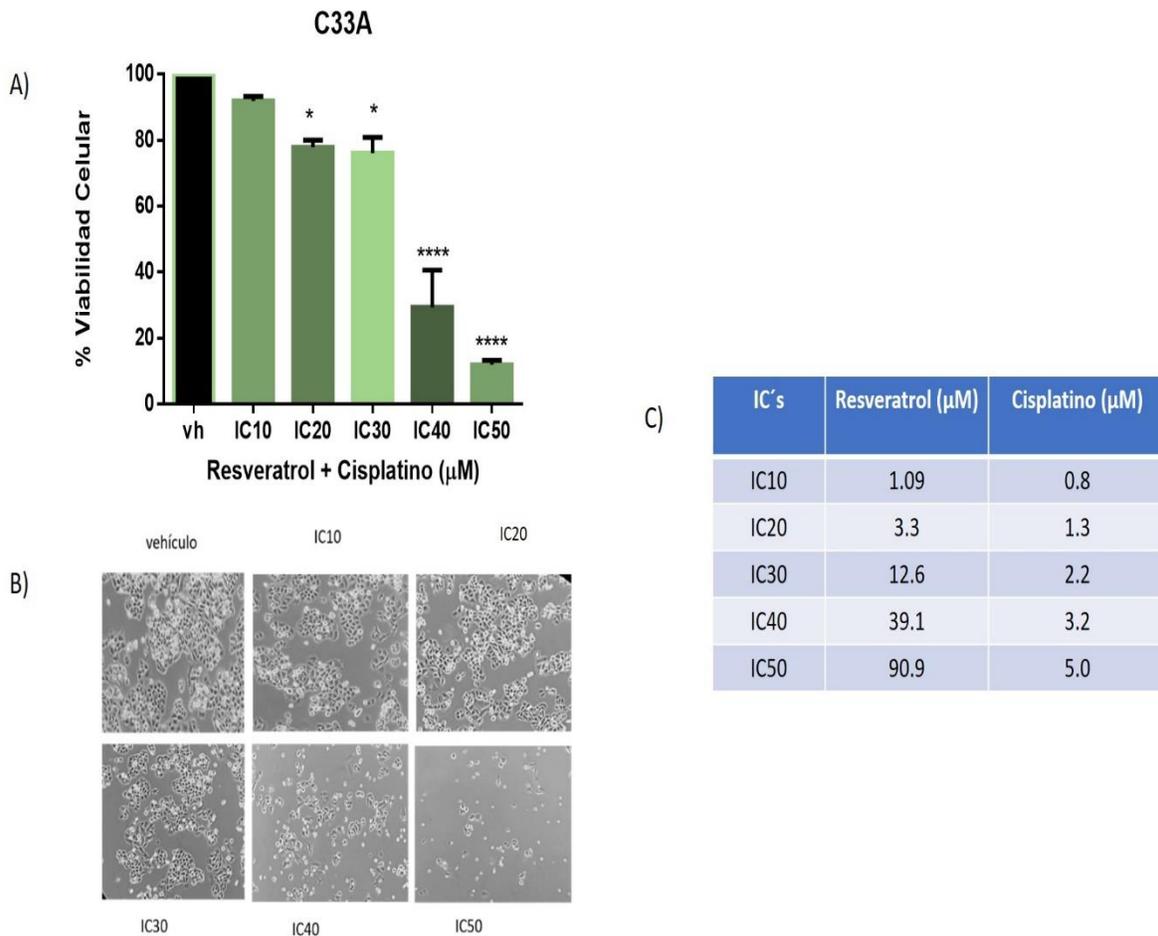
## **Efecto del tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad de las células C33A, HeLa y SiHa.**

Con base en las curvas dosis respuesta que se obtuvieron de la exposición a resveratrol o cisplatino sobre la viabilidad de las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa, se analizó el tratamiento combinado con resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad celular.

En la Figura 7, que corresponde a la línea celular C33A, se observa una reducción significativa de la viabilidad celular utilizando la combinación de las concentraciones que corresponden a las IC30 de cada fármaco, siendo aún más notable en las combinaciones con las IC40 e IC50 (ver dosis en Figura 7B).

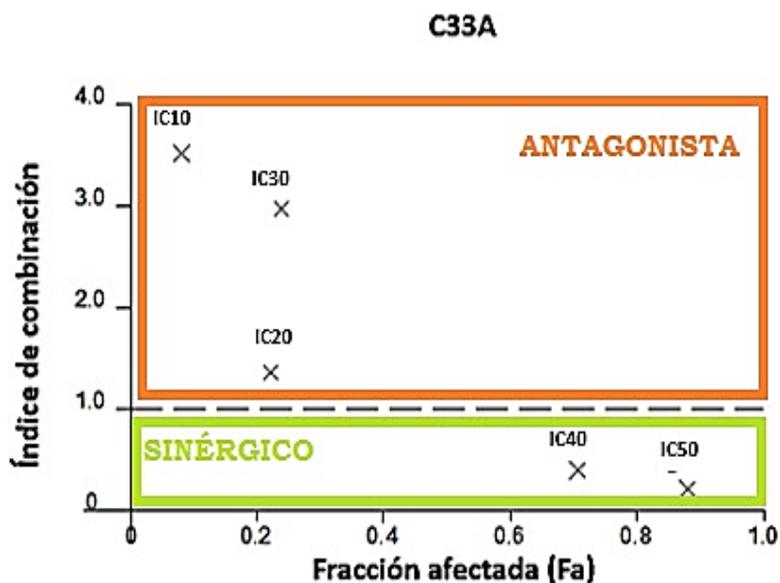
Posteriormente se realizó el análisis para observar el tipo de interacción farmacológica en donde los valores de IC (Índice de combinación) mayor a 1 indican “antagonismo”, los valores de IC menor a 1 muestran “sinergismo” y los valores iguales indican un efecto “aditivo”, mientras que la fracción afectada se refiere a la inhibición fraccional de la viabilidad para cada combinación.

En el caso de la línea celular C33A se observa que a las concentraciones más altas probadas de ambos compuestos (IC40 e IC50, Figura 7A) se tiene un tipo de interacción sinérgica, pues el valor obtenido fue menor a 1, ver Figura 8A y 8B.



**Figura 7.- Efecto del tratamiento con la combinación de resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad celular en la línea celular C33A.** A) Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de resveratrol y cisplatino (las IC10, IC20, IC30, IC40, IC50 de cada compuesto), primero 24 h con resveratrol seguido de 24 h con la combinación y finalmente 24 h con medio fresco sin fármaco. \*\*\*\* $p < 0.0001$  B) Cultivo celular de la línea celular C33A donde se aprecia la morfología y confluencia de las células tratadas con resveratrol y cisplatino C) Tabla con los IC's de resveratrol y cisplatino, utilizados para la combinación.

A)



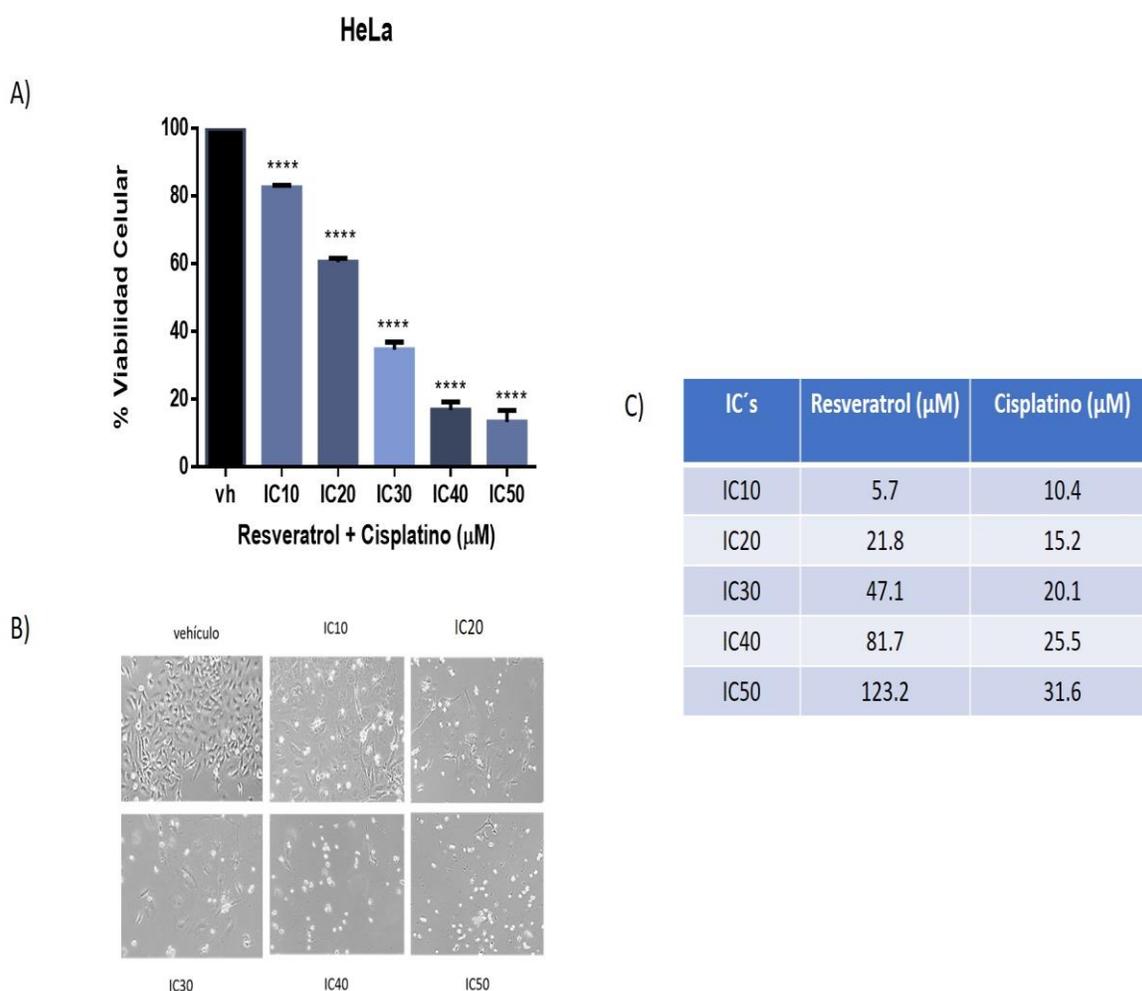
B)

Combinación (Resveratrol + cisplatino)	Índice de combinación (IC)	Tipo de interacción farmacológica
IC10	3.5	Antagonista
IC20	1.3	Antagonista
IC30	2.9	Antagonista
IC40	0.4	Sinérgico
IC50	0.214	Sinérgico

**Figura 8.- Interacción farmacológica.** A) Índice de combinación de resveratrol y cisplatino en células C33A. Los valores de IC mayor a 1 indican antagonismo, los valores de IC menores a 1 indican sinergismo y los valores iguales indican un efecto aditivo. Fracción afectada indica la inhibición fraccional de la viabilidad para cada combinación. B) Valores del análisis farmacológico de la combinación de resveratrol y cisplatino.

Para la línea celular HeLa (Figura 9B), se muestra un efecto sobre la viabilidad a partir de la combinación IC10 de ambos fármacos. En donde hasta la IC40 existe una disminución dosis-dependiente, pero en la viabilidad celular se mantuvo con la IC50 similar a la IC40.

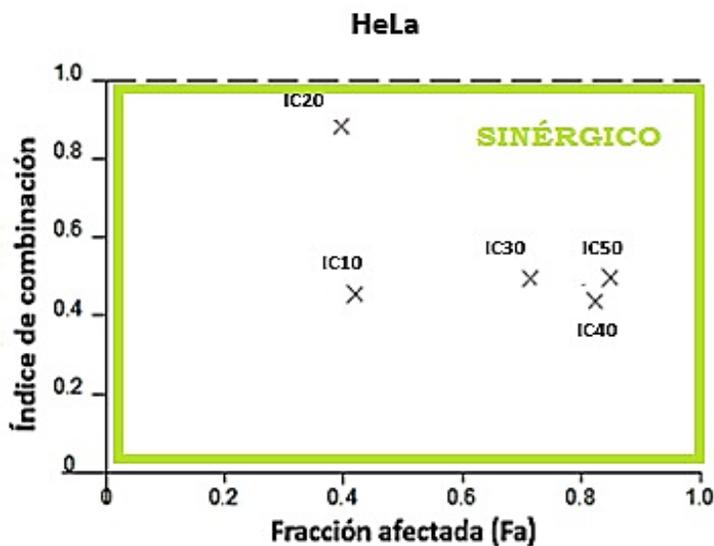
A continuación, se analizó el tipo de interacción farmacológica (figura 10A y 10B), donde se observa que existe un efecto sinérgico con la combinación de resveratrol y cisplatino para todas las dosis en esta línea celular, ya que los valores del índice de combinación son menores a 1.



**Figura 9- Efecto del tratamiento con la combinación de resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad celular en la línea celular HeLa** A) Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de resveratrol y cisplatino (las IC10, IC20, IC30, IC40, IC50 de cada compuesto), primero 24 h con resveratrol seguido de 24 h con la combinación y finalmente 24 h con medio fresco

sin fármaco. \*\*\*\* $p < 0.0001$  B) Cultivo celular de la línea celular HeLa donde se aprecia la morfología y confluencia de las células tratadas con resveratrol y cisplatino C) Tabla con los IC's de resveratrol y cisplatino, utilizados para la combinación.

A)



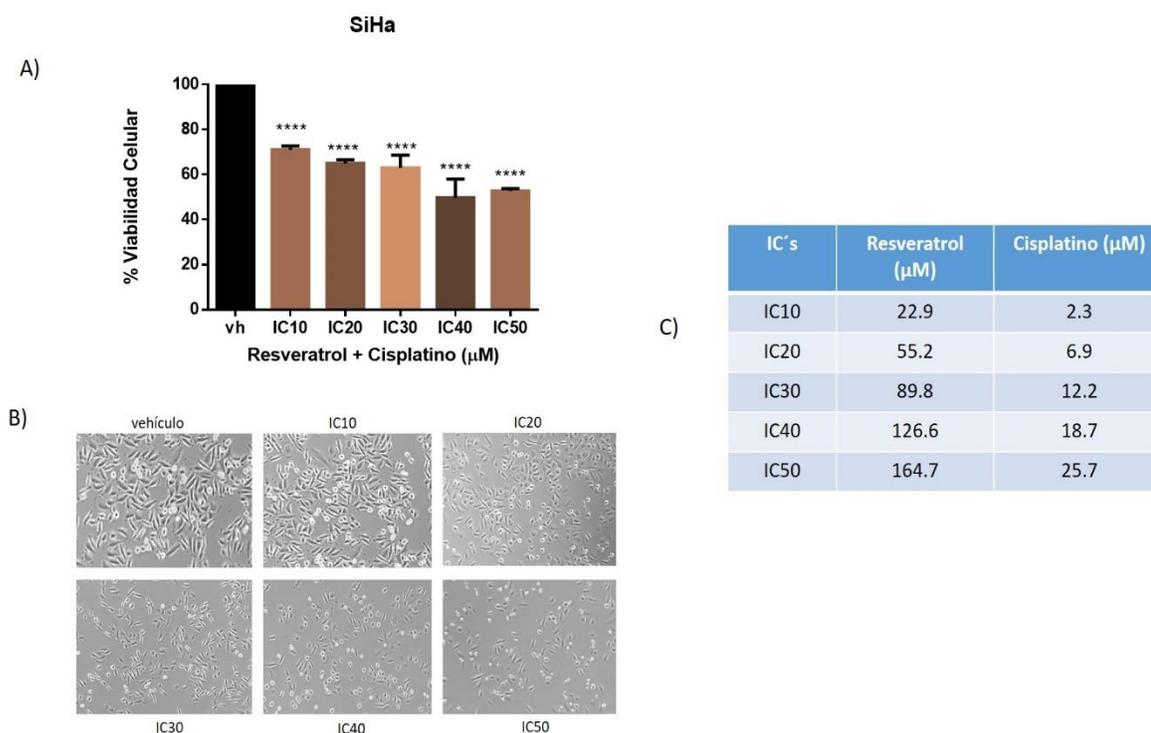
B)

Combinación (Resveratrol+ Cisplatino)	índice de combinación (IC)	Tipo de interacción Farmacológica
IC10	0.456	Sinérgico
IC20	0.884	Sinérgico
IC30	0.496	Sinérgico
IC40	0.437	Sinérgico
IC50	0.496	Sinérgico

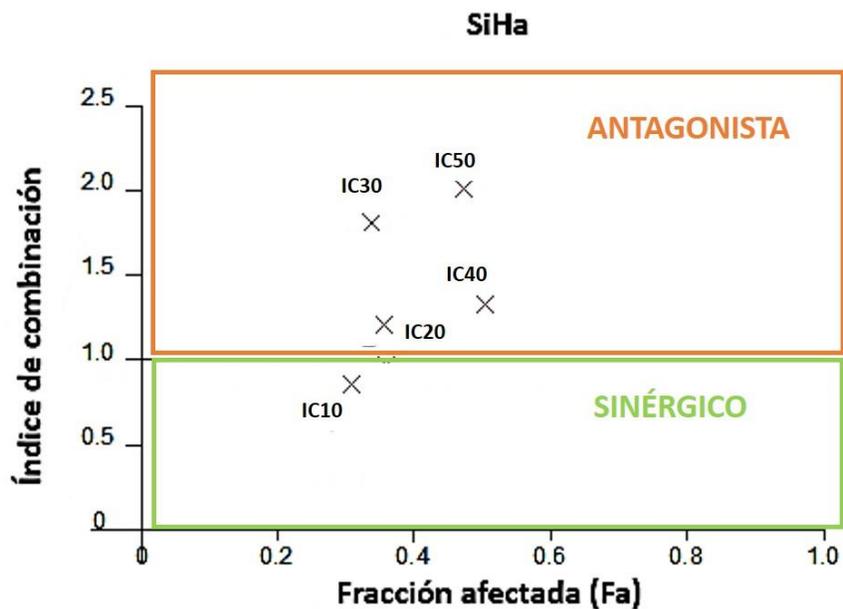
**Figura 10.- Interacción farmacológica.** A) Índice de combinación de resveratrol y cisplatino en células HeLa. Los valores de IC mayor a 1 indican antagonismo, los valores de IC menores a 1 indican sinergismo y los valores iguales indican un efecto aditivo. Fracción afectada indica la inhibición fraccional de la viabilidad para cada combinación. B) Valores del análisis farmacológico de la combinación de resveratrol y cisplatino.

En la línea celular SiHa (Figura 11), observamos diferencias estadísticamente significativas en todas las combinaciones de IC10, IC20, IC30, IC40, IC50 de ambos fármacos comparadas con el control. Sin embargo, se observa que aún con la combinación más alta, es decir, las IC50 de ambos fármacos, la viabilidad celular no disminuye más del 50%. Dicho efecto pudiera deberse a que sea una línea celular resistente a la combinación de resveratrol y cisplatino.

Se obtuvo un resultado de sinergismo para la dosis de IC10, encontrándose un efecto antagonista para las combinaciones de IC20, IC30, IC40, IC50. En la (Figura 12), se muestran los resultados de manera numérica.



**Figura 11- Efecto del tratamiento con la combinación de resveratrol y cisplatino sobre la viabilidad celular en la línea celular SiHa.** A) Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de resveratrol y cisplatino (las IC10, IC20, IC30, IC40, IC50 de cada compuesto), primero 24 h con resveratrol seguido de 24 h con la combinación y finalmente 24 h con medio fresco sin fármaco. \*\*\*\* $p < 0.0001$  B) Cultivo celular de la línea celular SiHa donde se aprecia la morfología y confluencia de las células tratadas con resveratrol y cisplatino C) Tabla con los IC's de resveratrol y cisplatino, utilizados para la combinación.



B)

Combinación (Resveratrol+ Cisplatino)	índice de combinación (IC)	Tipo de interacción Farmacológica
IC10	0.96	Sinérgico
IC20	1.31	Antagonista
IC30	1.811	Antagonista
IC40	1.33	Antagonista
IC50	2.01	Antagonista

**Figura 12.- Interacción farmacológica.** A) Índice de combinación de resveratrol y cisplatino en células SiHa. Los valores de IC mayor a 1 indican antagonismo, los valores de IC menores a 1 indican sinergismo y los valores iguales indican un efecto aditivo. Fracción afectada indica la inhibición fraccional de la viabilidad para cada combinación. B) Valores del análisis farmacológico de la combinación de resveratrol y cisplatino.

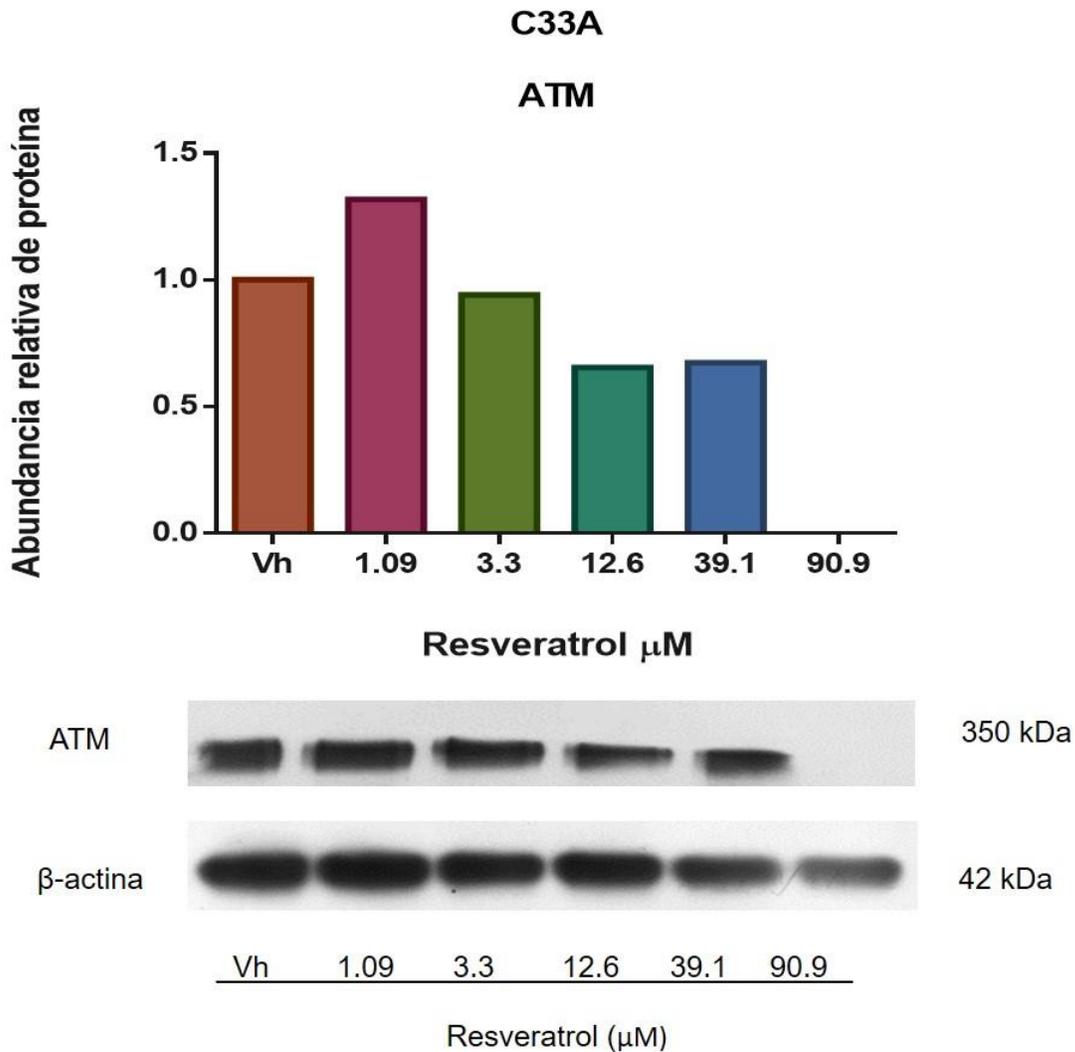
En resumen, encontramos un efecto sinérgico en la combinación de resveratrol y cisplatino en la línea celular C33A únicamente en las combinaciones de IC40 e IC50.

**Efecto del resveratrol sobre la abundancia de las proteínas ATM y RAD51 como marcadores de la vía de RH, en las líneas celulares de CaCu.**

Por otro lado, para determinar el mecanismo por el cual el resveratrol podría tener un efecto quimiosensibilizador al tratamiento con cisplatino en las líneas celulares C33A, HeLa y SiHa analizamos los niveles de las proteínas ATM y RAD51 de la siguiente manera:

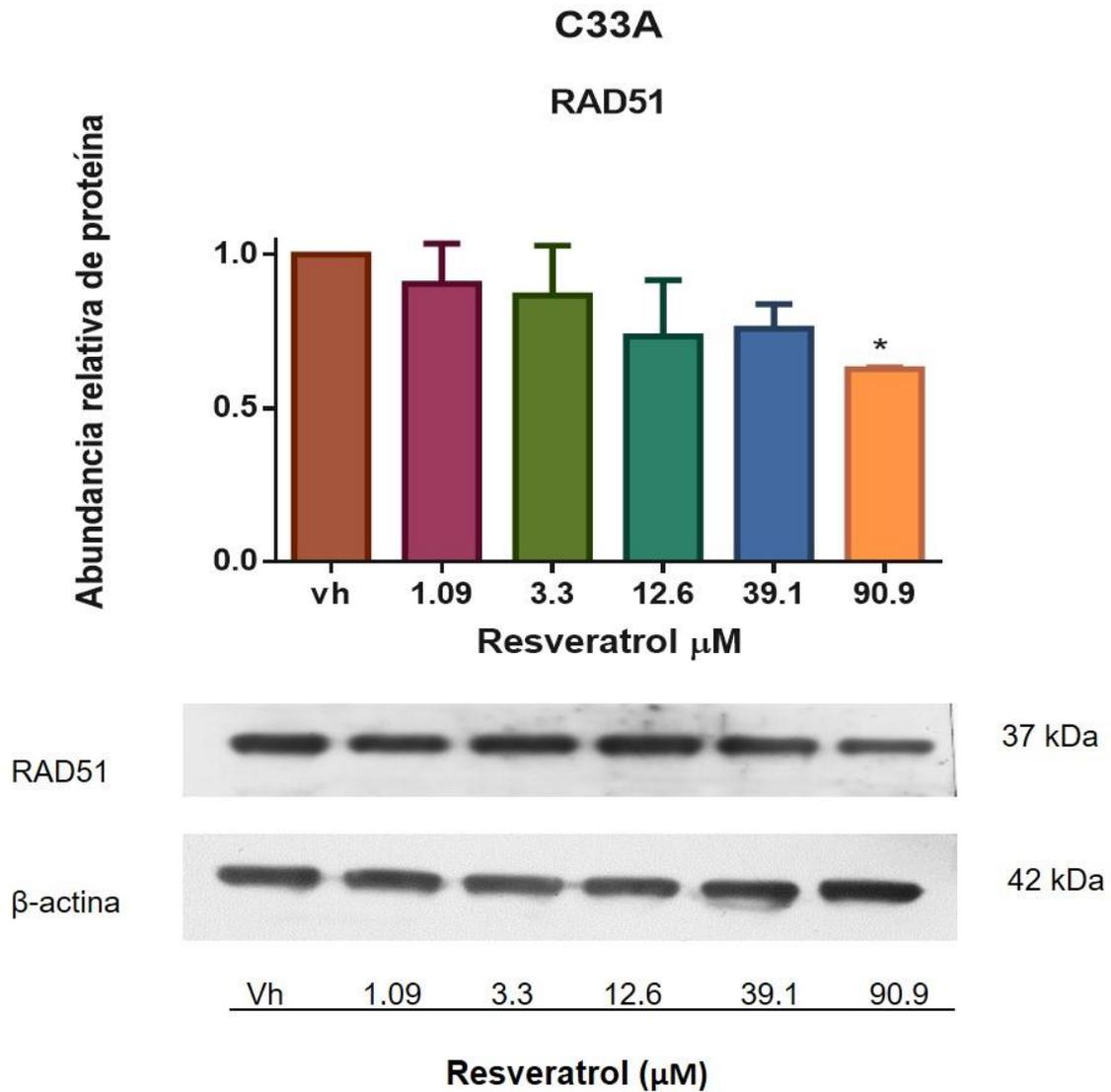
Se trataron cada una de las líneas celulares con cada una de las IC's (concentraciones inhibitorias) determinadas para el tratamiento con resveratrol en las tres líneas celulares (C33A, HeLa y SiHa) y analizamos la abundancia relativa de las proteínas ATM y RAD51.

Observamos una disminución significativa de la proteína ATM en la línea celular C33A posterior a los tratamientos a partir de la, IC30=12.6  $\mu$ M, IC40=39.1  $\mu$ M e IC50=90.9  $\mu$ M.



**Figura 13.- Abundancia relativa de la proteína ATM.** Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular C33A con diferentes concentraciones de resveratrol por 48 h. Como control de carga se utilizó la proteína β-actina. La figura en la parte inferior es representativa a una n=1.

En el caso de la proteína RAD51, la disminución no fue tan clara como para ATM por lo que decidimos hacer una densitometría, donde observamos una disminución significativa comparada con el control en la concentración de 90.9 μM que corresponde a la IC50 a las 48 h de tratamiento con resveratrol (Figura 14).

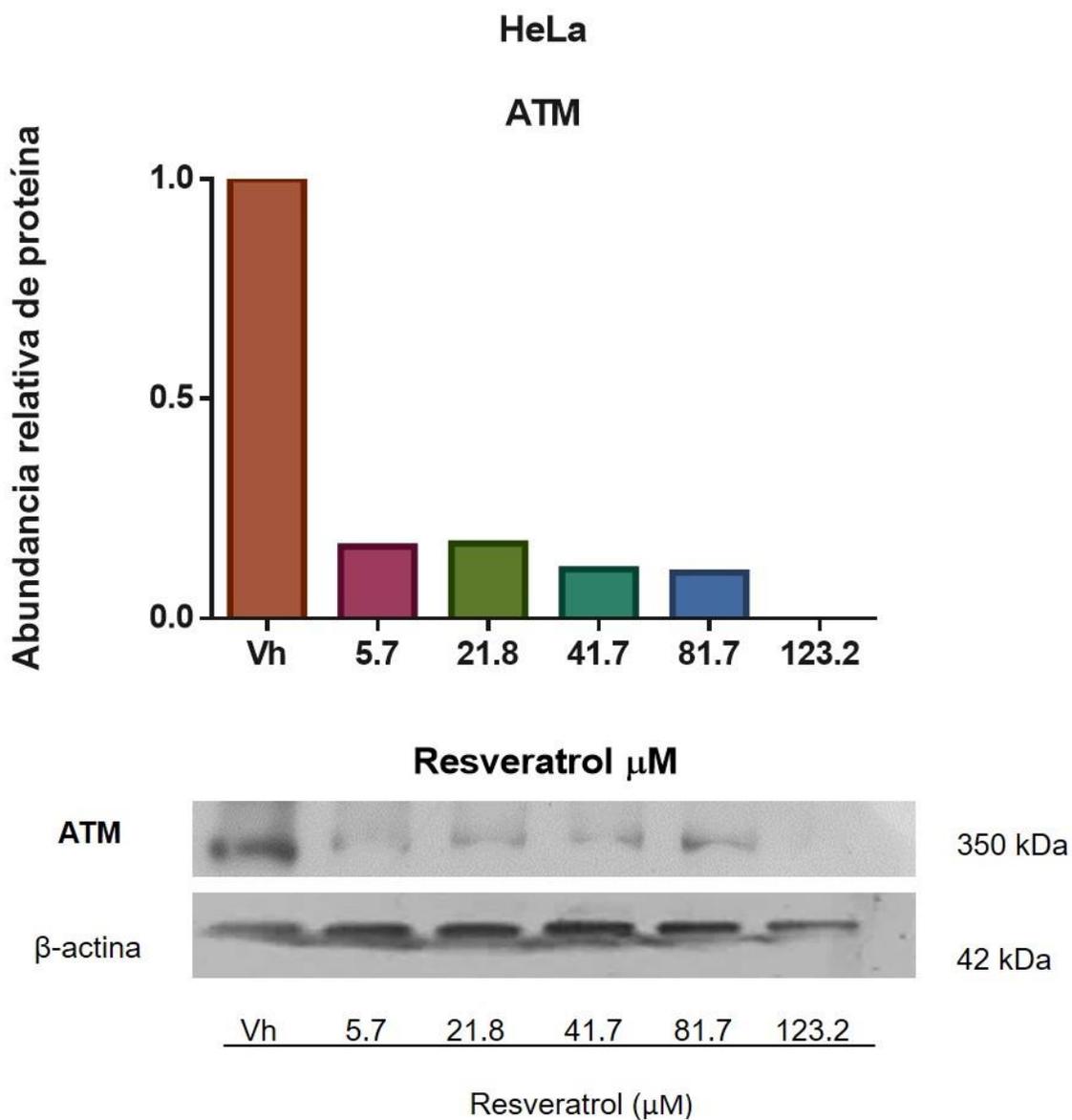


**Figura 14.- Abundancia relativa de la proteína RAD51.**

Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular C33A del tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol por 48h. posterior al tratamiento con resveratrol con diferentes dosis, durante 48 h. Como control de carga se utilizó la proteína β- actina.

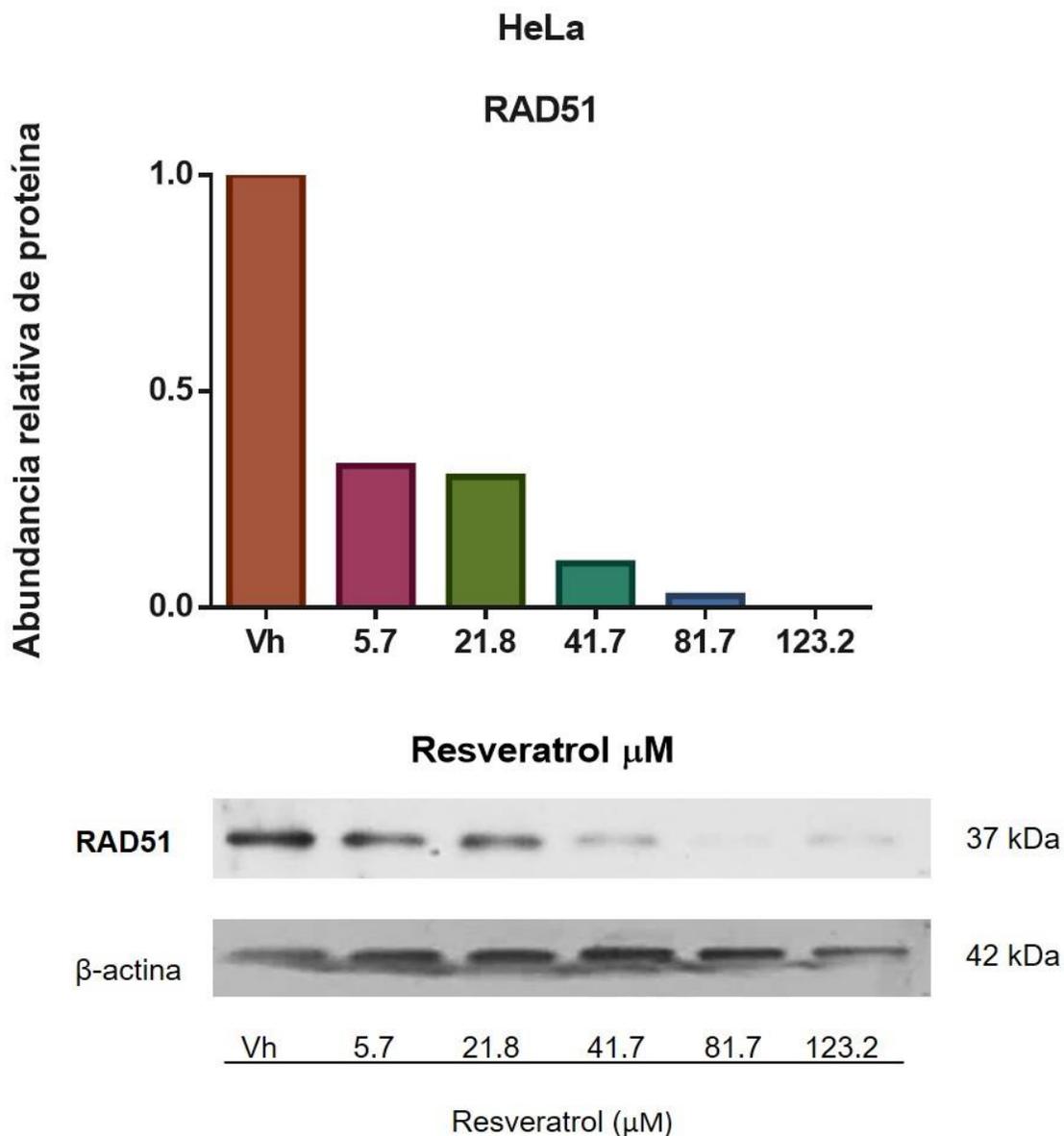
Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado  $\pm$  la desviación estándar (DS) y las diferencias significativas del tratamiento con resveratrol respecto al control (\*)  $p < 0.5$ .

En la línea celular HeLa observamos una disminución de ATM en todas las ICs probadas de resveratrol (Figura 15).



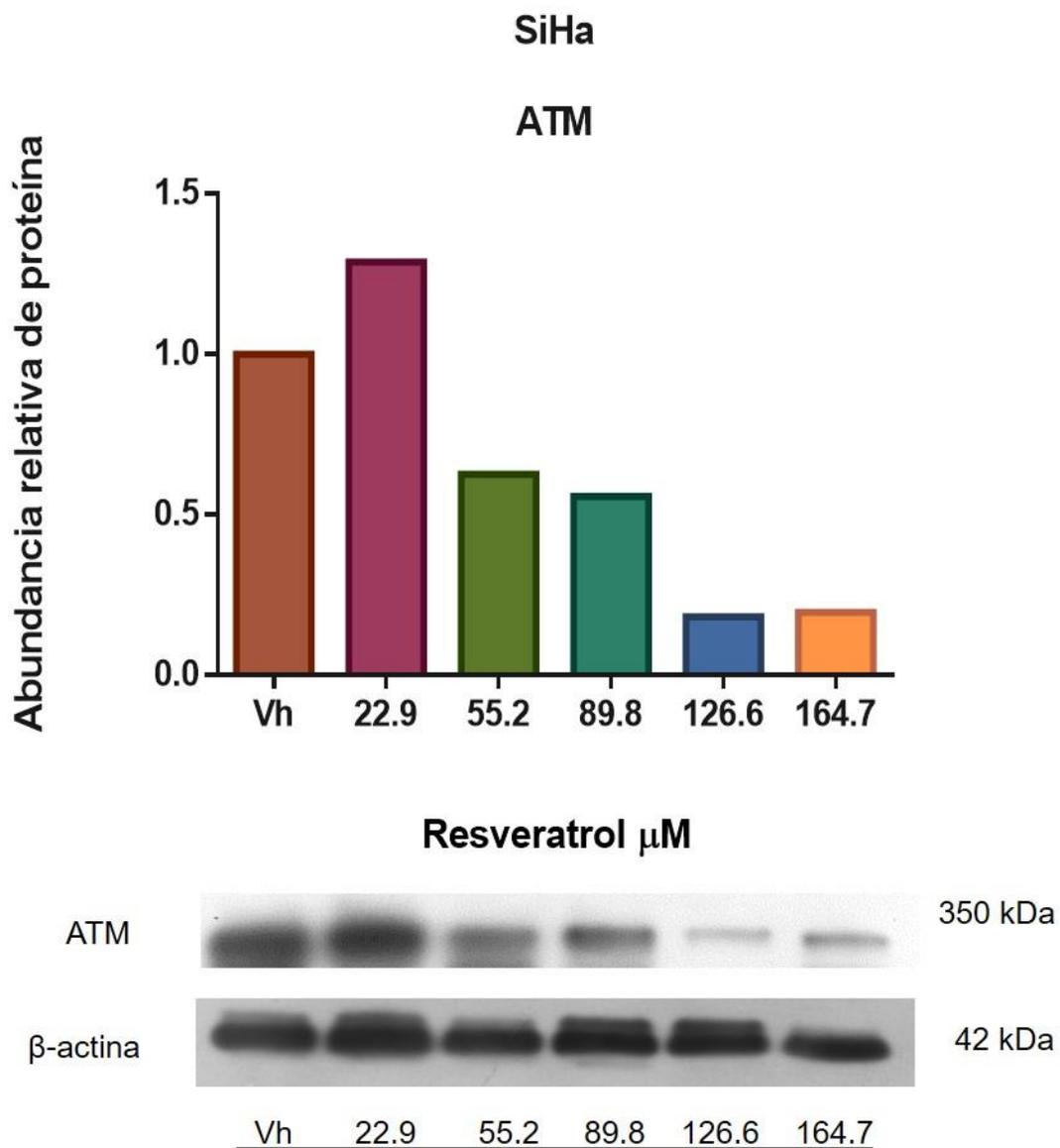
**Figura 15.- Abundancia relativa de proteína ATM.** Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular HeLa posterior al tratamiento con resveratrol con diferentes concentraciones, durante 48 h. Como control de carga se utilizó a la proteína β-actina. La figura en la parte inferior es representativa a una n=1.

Posteriormente se evaluó a RAD51 en la línea celular HeLa donde observamos una disminución significativa de esta proteína a partir de una dosis de 41.7  $\mu\text{M}$  con resveratrol durante 48 h (Figura 16).



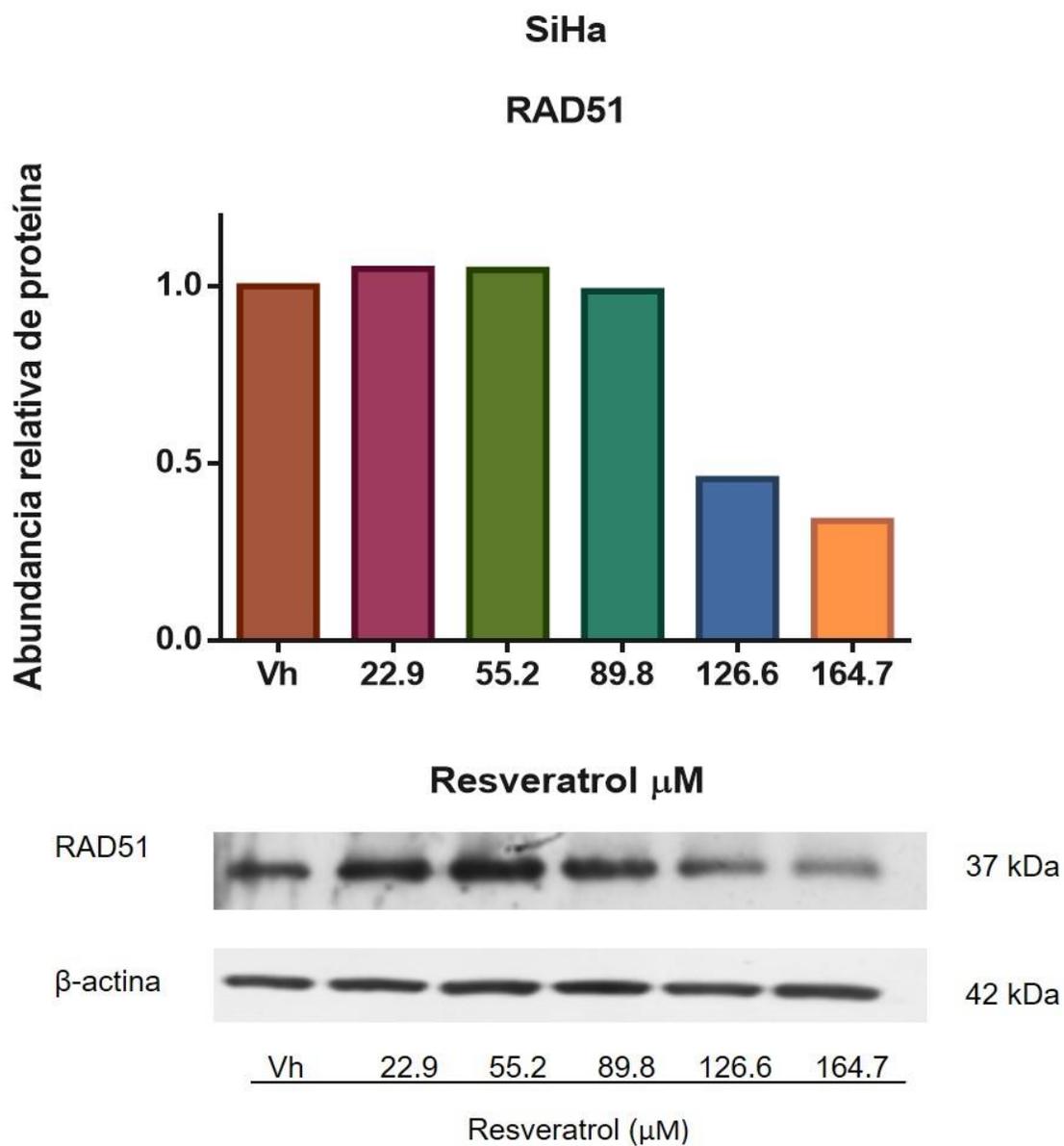
**Figura 16- Abundancia relativa de proteína RAD51.** Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular HeLa del tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol por 48 h. Como control de carga se utilizó a la proteína  $\beta$ -actina. La figura en la parte inferior es representativa a una  $n=1$ .

Por último, se analizó el efecto del resveratrol sobre la abundancia relativa de ATM y RAD51 en la línea celular SiHa, donde observamos una disminución evidente de ATM a las concentraciones de 55.2  $\mu\text{M}$  en adelante (Figura 17).



**Figura 17.- Abundancia relativa de proteína RAD51.** Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular SiHa del tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol por 48 h. Como control de carga se utilizó a la proteína  $\beta$ -actina. La figura en la parte inferior es representativa a una  $n=1$ .

En el caso de RAD51 observamos que el tratamiento con resveratrol induce una disminución significativa de la abundancia de proteína a partir de la concentración de 126.6  $\mu$ M.



**Figura 18.- Abundancia relativa de proteína RAD51.** Se obtuvieron extractos proteínicos de la línea celular SiHa del tratamiento con diferentes concentraciones de resveratrol por 48 h. Como control de carga se utilizó a la proteína  $\beta$ -actina. La figura en la parte inferior es representativa a una n=1.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se investigó el efecto del resveratrol como quimiosensibilizador al cisplatino y su efecto sobre dos proteínas implicadas en la reparación del DNA a través de la vía de recombinación homóloga, ATM y RAD51.

Los resultados obtenidos para el tratamiento con resveratrol sobre la viabilidad de las células C33A señalan que es la línea celular más sensible analizada, en contraste con HeLa y SiHa, ya que las IC50 son 90.9, 123.2 y 164.7  $\mu\text{M}$  respectivamente. Se sabe que los efectos anticancerígenos del resveratrol en varios modelos celulares como la inhibición de proliferación y la inducción de apoptosis son dependientes de p53, en este sentido, existe un reporte donde observaron que el tratamiento con resveratrol en esta línea celular incrementa la expresión de la proteína p53, en comparación con HeLa (positiva al VPH18) donde p53 se encuentra inactivo por la presencia de la oncoproteína E6 de VPH18, similar a SiHa donde p53 es inactivado por E6 de VPH16. En este mismo trabajo reportaron que en la línea celular SiHa se encuentra expresada la proteína NF- $\kappa$ B (factor de transcripción nuclear kappa-B), la cual regula genes implicados en sobrevivencia celular e inhibición de apoptosis lo cual podría explicar que la línea celular SiHa sea la línea celular más resistente al tratamiento con resveratrol (García *et al.*, 2013).

La regulación de p53 por resveratrol se ha propuesto, que ocurre mediante la activación de la vía de las MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógenos), específicamente ERKs y p38, los miembros de esta familia son implicados en proliferación y apoptosis (Signorelli *et al.*, 2005).

De acuerdo con nuestros resultados, Xin y colaboradores en 2009 reportaron que C33A es más sensible al tratamiento con resveratrol, seguido de HeLa y por último SiHa, ellos utilizaron concentraciones desde 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 600  $\mu\text{M}$ , por 48 h, esto indica que el efecto es similar a lo reportado (Xin *et al.*, 2009).

*En los tratamientos con cisplatino la línea celular más resistente fue HeLa y la más sensible C33A, donde los IC50 fueron de 31.6 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente, mientras que para las células SiHa fue de 25.7  $\mu\text{M}$ . Previamente, Zhu y colaboradores,*

reportaron que en células HeLa se encuentra disminuida la proteína CTR1 (cooper transporter 1), una proteína de membrana que participa en la regulación de la entrada de cisplatino a la célula tumoral, que conlleva a una reducción en la captación de cisplatino en la célula y puede contribuir al desarrollo de resistencia en la línea celular HeLa, por lo que se requiere mayor concentración de este fármaco para reducir su viabilidad (Zhu *et al.*, 2016).

Interesantemente, se ha reportado que las células HeLa pueden ser resistentes a cisplatino debido a que presentan altos niveles de GSH, este antecedente va de acuerdo con nuestros resultados donde observamos que la línea celular HeLa es la más resistente al tratamiento con cisplatino (Zhu *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha mencionado que la estabilización y la activación de p53 silvestre son mecanismos críticos para la inducción de apoptosis mediante cisplatino. La quimioterapia contra el cáncer cervical en pacientes que tienen a p53 silvestre suele tener mayor beneficio que en pacientes que tienen a p53 mutado (mutación de tipo missense) (Zhu *et al.*, 2016). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la línea celular C33A, la cual tiene mutado a p53, es la más sensible al tratamiento con cisplatino que HeLa y SiHa, lo cual podría sugerir que depende de la mutación que la caracteriza.

*La combinación del resveratrol y cisplatino en la línea celular HeLa, tiene un efecto sinérgico en todas las combinaciones de IC's analizadas*, recordemos que el efecto sinérgico se refiere a la combinación de fármacos donde el efecto es mayor que el obtenido por cualquiera de sus componentes utilizados individualmente (Tallarida, 2010), se sabe que la naturaleza de esta línea celular es positiva al HPV tipo 18 y debido a oncoproteínas como E6, puede asociarse a p53 conduciendo a su degradación (Lizano *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente el tratamiento con resveratrol demostró la ausencia de la proteína p53 (García *et al.*, 2013). Ahora bien, en otro estudio identifican que en células HeLa, es posible la restauración de la expresión de la proteína p53 mediante el tratamiento con cisplatino, mediante la represión de E6 contribuyendo a la restauración de p53 (Wesierska- Gadek *et al.*, 2002). Por lo que, podría explicarse que por medio de estos mecanismos exista

mayor sensibilidad en las células HeLa al tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino, comparado con C33A la cual es negativa al HPV.

Otra posible explicación es que de acuerdo a nuestros resultados del análisis de *los niveles de proteína ATM y RAD51 tratadas con resveratrol en la línea celular HeLa, observamos que existe una disminución de estas proteínas*, que participan particularmente en la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga, lo que sugiere que el resveratrol al disminuir los niveles de estas proteínas importantes para que se lleve a cabo la reparación del daño inducido por el cisplatino, contribuiría a la inducción de muerte celular.

*Por otro lado, observamos que la línea celular SiHa es más resistente que HeLa, ya que concentraciones altas de resveratrol y cisplatino, tienen un efecto antagonista.* Se ha reportado que esta línea celular se caracteriza por la expresión de proteínas antioxidantes como SOD1 (Superóxido dismutasa1), SOD2 (Superóxido dismutasa 2), y GP2 (Glutación Peroxidasa) así como una disminución de especies reactivas de oxígeno, por lo que esto podría contribuir a la resistencia observada en esta línea celular (Filippova *et al.*, 2014).

Otros mecanismos de acción descritos en la literatura pueden dilucidar la acción en conjunto del resveratrol y cisplatino. Uno de ellos es la GSH (Glutation en su forma reducida) la cual se encuentra asociada a la resistencia a cisplatino y que desactiva la droga de platino antes de la unión al DNA. Una forma de explicar el efecto del resveratrol es que se ha reportado que es capaz de aumentar la transcripción de la enzima GPx (Glutation peroxidasa) lo que disminuye la concentración de GSH, lo cual favorece la unión del cisplatino al ADN, esto se observó en células de cáncer de ovario incubadas con resveratrol (Zhu *et al.*, 2016; Nessa *et al.*, 2012).

Por otro lado, se sabe que la glicoproteína P contribuye al desarrollo de quimioresistencia ya que reduce la cantidad de cisplatino dentro de la célula, así disminuyendo su eficacia. interesantemente, se ha reportado que el resveratrol inhibe la expresión de la glicoproteína P, lo cual podría explicar en parte la quimiosensibilización inducida por el resveratrol en combinación con el cisplatino (Roy *et al.*, 2014; Nessa *et al.*, 2012).

Otro posible mecanismo de resistencia al cisplatino, es la sobre-expresión de proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN como la vía de recombinación homóloga, por lo cual en este trabajo analizamos la abundancia de dos proteínas implicadas en ésta vía, ATM y RAD51.

La sobreexpresión de RAD51 una proteína central de la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga se ha descrito en varios tipos de cáncer como el CaCu, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mama, ovario, páncreas melanoma y glioblastoma y se encuentra asociada con mayor agresividad que a su vez se encuentra involucrada con el desarrollo de resistencia tumoral (Paulikova *et al.*, 2013; Takenata *et al.*, 2017; Maake *et al.*, 2000; Raserschall *et al.*, 2002), por lo tanto se propone que la inhibición de RAD51 tendrá una repercusión negativa en la reparación de daño al ADN mediante recombinación homóloga (Ruiz *et al.*, 2018). Estos hallazgos reafirman la importancia de esta proteína en la sensibilidad al tratamiento contra el cáncer.

Como mencionamos anteriormente *el resveratrol disminuye los niveles de las proteínas ATM y RAD51, en las tres líneas celulares*, por lo que esto podría contribuir al efecto quimiosensibilizador del resveratrol al tratamiento con cisplatino. De acuerdo con nuestros resultados, en un trabajo previo reportaron que el resveratrol inhibe proteínas asociadas a la reparación del ADN como RAD50 y MRE11 que forman parte del complejo MRN (León-Galicia *et al.*, 2013). Además, en otro trabajo reportaron que el resveratrol disminuye los niveles de RAD51 en células de cáncer de mama MCF7 y observaron que el resveratrol disminuyó la concentración de cisplatino necesaria para inducir muerte celular en esta línea celular (León *et al.*, 2018).

En otro trabajo, probaron que el resveratrol es efectivo para sensibilizar la línea celular HeLa a etopósido, un compuesto que induce rupturas de doble cadena en el ADN, y los autores mencionan que el posible mecanismo es a través de la inhibición de RAD51 (Ruíz *et al.*, 2018); sin embargo, el etopósido no es un fármaco de uso común en cáncer cérvico-uterino. El cisplatino también induce rupturas de doble cadena en el ADN de manera indirecta por lo que el resveratrol puede tener un

efecto quimiosensibilizador en las células tumorales tratadas con cisplatino. Interesantemente, en nuestro trabajo observamos que el *resveratrol induce una disminución de los niveles de las proteínas de la vía de reparación por recombinación homóloga: ATM y RAD51* y esto correlaciona con una disminución de la dosis necesaria de cisplatino para inducir muerte celular en líneas celulares de CaCu al utilizar al resveratrol como un quimiosensibilizador.

## **CONCLUSIÓN**

La terapia para cada tipo de cáncer debe ser analizada muy cuidadosamente, ya que, con base en nuestros resultados, observamos que a pesar de que utilizamos líneas de cáncer cérvico-uterino no responden de manera similar.

Debido a que las líneas celulares como HeLa (positiva a VPH 18) son sensibles al tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino, se sugiere que el resveratrol se puede utilizar como quimiosensibilizador en CaCu, específicamente para tumores con este tipo de características. Además, se propone utilizar concentraciones bajas en los tipos de CaCu semejante a la línea celular SiHa (positivas a HPV16), por el contrario de la línea celular C33A (negativas a HPV, con mutaciones en pRB y p53) que requiere de concentraciones altas para tener un efecto de quimiosensibilización.

Nuestros resultados evidencian que el resveratrol podría estar inhibiendo proteínas de la vía de recombinación homóloga y que esto se correlaciona a su vez con la disminución en la viabilidad celular, posiblemente mediante este mecanismo. Este hallazgo respalda la posibilidad de que el resveratrol sea un posible fármaco quimiosensibilizador para el tratamiento del CaCu.

Sin embargo, se requieren más estudios para poder elucidar el posible mecanismo del resveratrol como quimiosensibilizador en el CaCu, lo cual deja un campo bastante amplio de investigación para aportaciones que beneficien a pacientes con CaCu.

## REFERENCIAS

1. Athar, M., Back, J. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., and Kim, A. L. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 486(2): 95-102.
2. Azios, N. G., Dharmawardhane S. F. (2005). Resveratrol and Estradiol Exert Disparate Effects on Cell Migration, Cell Surface Actin Structures, and Focal Adhesion Assembly in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 7, (2):128-140
3. Baribeau S., Chaudhry P., Parent S., Asselin E. (2014). Resveratrol Inhibits Cisplatin-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*. 9(1): e86987.
4. Beaudoux, J. L., Nivet-Antoine, V., and Giral, P. (2010). Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13 (6): 729-736.
5. Begg, A. C., Stewart, F. A., and Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature reviews Cancer* 11(4): 239-253.
6. Blaskewicz, C.D., Pudney J., Anderson, D., (2011). Structure and function of intercellular junctions in human cervical and vaginal mucosal epithelia. *Biology of the Reproduction* 85(1):97-104.
7. Bosch, F. X. (2003). Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud pública de México* 45 Suppl 3, S326-339.
8. Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nature reviews Cancer* 12 (9):587-598.
9. Bowers, J., Tyulmenkov, V., Jernigan, S., Klinge, C. (2000). Resveratrol Acts as a Mixed Agonist/Antagonist for Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ 1. *Endocrinology*,141(10), 3657-3667.
10. Bronowicka-Klys, D. E., Lianeri, M., Jagodzinski, P. P. (2016). The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cancer cervical. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 84:1945-1953.
11. Browning, R. J., Reardon, P.J.T., Parhizkar, M., Pedley, R.B., Edirisinghe, M., Knowles, J.C., Stride, E. (2017). Drug Delivery Strategies for Platinum Based Chemotherapy. *ACS Nano*. 11(9): 8560-8578.
12. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E., and Crozier, A. (2002). Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(11): 3337-3340.
13. Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual-Teresa, S., and Tomas-Barberan, F. A. (2000). Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(10): 4606-4612.

14. Cottart, C. H., Nivet-Antoine, V., and Beaudoux, J. L. (2014). Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Molecular nutrition & food research* 58(1): 7-21.
15. Counet, C., Callemien, D., and Collin, S. (2006). Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chem* 98(4):649-657.
16. Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer* 12(12):801-817.
17. Chen, Q., Cai, D. Li, M., Wu, X. (2017), The homologous recombination protein RAD51 is a promising therapeutic target for cervical carcinoma. *Oncology reports* 38(2):767-774.
18. Chernikova, S. B., Game, J. C., Brown, J. M. (2012). Inhibiting homologous recombination for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy* 13(2): 61-68.
19. Christmann, M., Tomicic, T. M., Roos, W. P., Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193 (1-2):3-34.
20. Choi, M., Kipps, T., Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8): 1781-1791.
21. Dasari, S., Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740, 364-378.
22. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., y Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità* 43(4):348-361.
23. Díaz, Chávez. J., Domínguez, Gómez. G. (2010). Vías de reparación del DNA: nuevos blancos en la terapia contra el cáncer. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15(4):221-227.
24. Eskander R. N., Tewari K. S., Krishnansu S. (2014). Chemotherapy in the treatment of metastatic, persistent, and recurrent cervical cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 26(4):314-21
25. Filippova, M., Filippov, V., William, V. M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkurova, s., Duerksen-Hughes, P. (2014). Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. *BioMedic Research International* 2014:574659.
26. Galluzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Keep, O., Castedo, M., Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31(15):1869-1883.
27. Gambini, J., Grueso- López, R., González- Olaso, G., Inglés, M., Abdelazid, K., Alami, M. E., Costa- Bonet, V., Borrás, C., Viña J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología* 48 (2): 79-88.

28. Garcia, Z. S. P., Garcia V. E., Diaz Ch. J., Hernandez, P. R., Gariglio P. (2013) Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *European Journal of Cancer Prevention*. 22(6):577–584.
29. Garg, A, K., Buchholz, T, A., Bharat B, A. (2005). Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols. *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (11-12):1630-1647.
30. Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P. Y., & Jameson, J. L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 14138–14143.
31. Gatz, S. A, Keimling, M., Baumann, C., Dörk, T., Debatin, K. M., Fulda, S., Wiesmüller, L. (2008). Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR–p53- and –Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis* 29 (3): 519-527.
32. Ghosal, G., and Chen, J. (2013). DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Translational cancer research* 2 (3):107-129.
33. Goodarzi, A. A., and Jeggo, P. A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics* 82: 1-45.
34. Goswami, S. K., Das, D. K. (2009). Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters* 284 (1):1-6.
35. Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J.H., Aggarwal, B. B. (2011). Chemosensitization of tumores by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 1215: 150- 160.
36. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5): 646-674.
37. Hernández, P., Olivera P., Dueñas, G. A., Pérez, P, AZ., Maldonado V., Meléndez, Z, J. (2001). Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 48 (6):488-492.
38. Hine, C. M., Seluanov, A., Gorbunova, V. (2008). Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,105(52):20810–20815.
39. Hougardy, B. M. T, van der Zee, A. G. J., van den Heuvel. F. A. J, Timmer, T., de Vries, E. G. E., 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. *Ginecología Oncológica*, 97 (2): 353–364.
40. Hu, S., Li, X., Xu, R., Ye, L., Kong, H., Zeng, X., Wang, H., Xie, W. (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 48 (6): 528-535.

41. Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Monn, R.C., Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275 (5297): 218-220.
42. Jasin, M., y Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in biology* 5(11): a012740.
43. Kostova Irena. (2006). Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discover* 1(1):1-22.
44. Kundu, J, K., Surh, Young-Joon. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269 (2008):243-261.
45. Lazcano-Ponce, E., Aranda, F. C., Aguado, P. R.A., Cruz, V. A., Bojalil R. (2014). Vacunas para proteger de la infección por virus de papiloma humano. *Gaceta Mexicana de Oncología* 13 (supl 4): 39-47.
46. Legg, K. (2012). Metabolic disease: Identifying novel targets of resveratrol. *Nature reviews Drug discovery* 11 (4): 273.
47. León-Galicia, I., Díaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer* 22(1):11-20.
48. León-Galicia, I., Díaz-Chavez, J., Albino-Sanchez, M, E., Garcia- Villa, E., Bermudez-Cruz, R., Garcia-Mena, J., Herrera, L, A., Garcia-Carranca, A., Gariglio, P. (2018). Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Reports* 39 (6): 3025-3033.
49. Levenson, A. S., Gehm, B. D., Pearce, S. T., Horiguchi, J., Simons, L. A., Ward III, J. E., Jameson, L., Jordan, V. C. (2003). Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER  $\alpha$ . *International Journal of Cancer*, 104(5): 587–596.
50. Lizano S. M., Carrillo, G. A., Contreras, P. A. (2009). Infección por virus del Papiloma Humano: Edpidemiología, Historia Natural y Carcinogenesis. *Instituto Nacional de Cancerología* 4: 205-216.
51. Ma, L., Li, W., Wang, R., Nan, Y., Wang, Q., Liu, W., & Jin, F. (2015). Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *International Journal of Oncology*, 47(4): 1460-1468.
52. Maak, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L., Lüttges, L., Kalthoff, H., Stürzbecher, H, W., (2000). DNA repair and recombination factor Rad51 is over- expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19 (23):2791-2795.
53. Manzo, M. J., Lima, J. R., and Gregorio, C. (2014). Biología Molecular del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 18 (supl 4):18-24.

54. Marechal, A., and Zou Lee. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*.5 (9): 1-17.
55. Martinho, N., Santos, C.B. T., Florindo, F. H., Silva, C. L. (2019). Cisplatin- membrane interactions and their influence on platinum complexes activity and toxicity. *Frontiers in Physiology* 9 (1898):1-15.
56. Momenimovahed, Z., Salehiniya, H. (2017). Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomedical Research and Therapy* 4 (12): 1795-1811.
57. Mukherjee, S. (2016). *El emperador de todos los males, una biografía del cáncer*. Madrid, España. Taurus. 64-65.
58. Mukherjee, S., Ranjan, D. P., Hussaini, R., Chatterjee, K., Baidoo, J. N.E., Sampat, S., Navarra, J.P., Fata, J., Severinova, E., Banerjee, P. Castellanos, M. R. (2017). Unique synergistic formulation of curcumin, epicatechin gallate and resveratrol, tricurin, suppresses HPV E6, eliminates HPV+ cancer cells, and inhibits tumor progression. *Oncotarget*. 8(37): 60904-60916.
59. Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 348 (6): 518-527.
60. Padilla, L, A., Leung, B, S., Carson, L, F. (2002). Evidence of an Association between Human Papillomavirus and Impaired Chemotherapy-Induced Apoptosis in Cervical Cancer Cells. *Ginecología Oncológica*, 85 (1): 59–66.
61. Paulikova, S., Chmelořova, M., Petera, J., Palicka, V., Paulik, A. (2013). Hypermethylation of RAD51L3 and XRCC2 genes to predict late toxicity in chemoradioteraphy-treated cervical cancer patients. *Folia Biol (Praha)* 59(6): 240-245.
62. Phuah, N, H., Nagoor, N, H. (2014). Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *BioMed research international*, 2014: 804510.
63. Pirola, L., and Frojdo, S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB life* 60 (5): 323-332.
64. Rassool, F. V., and Tomkinson, A. E. (2010). Targeting abnormal DNA double strand break repair in cancer. *Cellular and molecular life sciences* 67 (21): 3699-3710.
65. Raserschall, E., Stout, K., Freier, S., Suckow, V., Schweiger, S., Haaf, T. (2002). Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res* 62 (1): 219-225.
66. Romero, Pérez. A. I., Ibern, Gómez. M., Lamuela, Raventos. R. M., de la Torre, Boronat, M. C. (1999). Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of agricultural and food chemistry* 47 (4): 1533-1536.
67. Roy, M., Mukherjee, S. (2014). Reversal of resistance towards cisplatin by curcumin in cervical cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 15 (3),1403-1410.

68. Ruíz, G., Valencia, G, H. A., León, G, I., García, V, E., García C, A., Gariglio, P. (2018). Inhibition of RAD51 by siRNA and Resveratrol Sensitizes Cancer Stem Cells Derived from HeLa Cell Cultures to Apoptosis. *Stem cells international* 2018:2493869.
69. Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition* 130 (supl (S)): 2073S-2085S.
70. Shukla, Y., and Singh, R. (2011). Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1215, 1-8.
71. Shen, M., Xu, Z., Xu, W., Jiang, K., Zhang, F., Ding, Q., Xu, Z., Chen, Y. (2019). Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway. *Journal of experimental & clinical cancer research* 38 (1), 149.
72. Signorelli, P., Ghidoni, R. (2005). Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Jornal of Nutritional Biochemistry* 16 (8): 449-466.
73. Takenata, T., Yoshino, I., Kouso, H., Ohba, T., Osoegawa, A., Shoji, F., Maehara, Y. (2007). Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer. *Int J Cnacer* 121 (4): 895-900.
74. Tallarida, Ronald. J. (2010). Combination analysis, *Advances in experimental medicine and Biology* 678 (3): 133-7.
75. Tortora, G. J., Derrickson, B. (2006). *Principles of Anatomy and Physiology*. Madrid, España: Médica Panamericana. 1149-1152.
76. Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J., Irriti, M. (2016). Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Frontiers in Nutrition* 3:8.
77. Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189 (1):12-19.
78. Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., Jr., and Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 32 (12):1377-1382.
79. Wang, F., Liu, M., Li, X., Tang, H. (2013). MiR-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl2l2 in cancer cervical cell lines. *FEBS Lett* 587 (5):488-495.
80. Wang, Y., Huang, J, W., Calses, P., Kemp, C, J., Taniguchi, T. (2012). MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote celular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. *Cancer Research* 72 (16):4037-4046.

81. Wesierska, G. T., Schloffer D., Kotala V. (2002). Escape of p53 protein from E6- mediated degradation in HeLa cell after cisplatin therapy. *Int. Journal Cancer* 101 (2): 128-236.
82. Wieringa, H. W., Van der Zee A. G., De Vries E. G., Van Vugt M. A. (2016). Breaking the DNA damage response to improve cervical cancer treatment. *Cancer treatment reviews* 42:30-40.
83. Willingham, A. T., Deveraux Q, L., Hampton, G, M., Blanc, A, P. (2004). RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene* 23 (51): 8392-400.
84. Whitlock, N. C., Baek, S. J. (2012). The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors. *Nutrition and cancer* 64 (4): 493-502.
85. Yeo-Teh, N., Ito, Y., Jha, S. (2018). High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *International journal of molecular sciences*, 19 (6): 1706.
86. Zhu, H. Luo, H., Zhang, W. Shen, Z. Hu. X., Zhu, X. (2016). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug design, development and therapy*, 10: 1885–1895.
87. zur Hausen, H. (1999a). Papillomaviruses in human cancers. *Proceedings of the Association of American Physicians* 111(6): 581-587.
88. zur Hausen, H. (1999b). Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* 35 (8): 1174-1181.

#### **PÁGINAS WEB**

- ✓ American Cancer Society, (2017).  
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento.html>
- ✓ Carlson, D. Sistema Reproductivo femenino. 2019. [Imagen 2].  
<https://www.carlsonstockart.com/photo/reproductive-system-female-illustration/>
- ✓ Canadian Cancer Society, (2019).  
<https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/cervical/cervical-cancer/the-cervix/?region=on>
- ✓ Checa, Rojas, A., (2018,). Tinción de Cristal Violeta (0.5 %) en cultivo de células adherentes. *Conogasi, Conocimiento para la vida*.  
<http://conogasi.org/articulos/tincion-de-cristal-violeta-0-5-en-cultivo-de-celulas-adherentes/>
- ✓ IMSS (Instituto mexicano de seguro social) (2013).  
<http://www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/bibliotecas.salud.gob.mx/gsd/collect/publin1/index>
- ✓ GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), 2018.  
<https://gco.iarc.fr/>

## **ANEXO**

### **CRISTAL VIOLETA**

Durante el tratamiento con fármacos las células adherentes que entran en procesos de muerte celular, pierden su adherencia, y por lo tanto esa población de células se descarta del resto que permanecen intactas. Las células no viables no pueden incorporar el colorante en sus membranas. El colorante es capaz de interactuar con proteínas y el ADN.

La técnica del Cristal Violet Dye Elution (CVDE), nos permite valorar de una forma rápida y sencilla la masa celular total de un cultivo celular.

El método se basa en la tinción de las células con una solución al 0,75% del colorante Cristal Violeta y cuantificar en un lector espectrofotométrico de multiplacas, la densidad óptica (o absorbancia) del cristal violeta solubilizado.

Este método, al medir la masa celular total y de acuerdo a la Ley de Beer, donde la absorbancia es directamente proporcional al número de células en el pocillo, esto nos permite valorar de forma global la proliferación celular

### **SOLUCIONES**

- ✓ Cristal Violeta; 0.75% (m/v), Sigma Life Science, Crystal Violet con número de catálogo 612-205-00-8.
- ✓ Etanol; 50 % (v/v), Ethanol (Anhydrous – Alcohol, Biotechnology Grade.
- ✓ Solución salina; NaCl 0.25% (m/v), Cloruro de Sodio Cristal, J.T. Baker 3624-01.
- ✓ Formaldehído; 1.75% (v/v), J.T. Baker, 2106-03.

Modificado de Checa Rojas (2018).

## **WESTERN BLOT**

### **POE-LCMA-WBT-001: PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO DEL LABORATORIO DE CARCINOGENESIS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

El Western Blot es una técnica de laboratorio que utiliza anticuerpos específicos con el objetivo de identificar una proteína dentro de un conjunto de proteínas que han sido separadas en función de su peso molecular mediante una electroforesis en gel. Este ensayo utiliza una membrana hecha de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilideno), que, al estar en contacto con las proteínas separadas en el gel, y mediante la aplicación de una corriente eléctrica, induce la migración de las proteínas desde el gel hacia la membrana. Una vez realizada la transferencia, la membrana puede ser procesada con anticuerpos específicos dirigidos a una proteína de interés, que se visualiza mediante el uso de un anticuerpo secundario y agentes para su detección.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), es una técnica que permite separar moléculas con carga, a partir de su migración en un campo eléctrico. En función de este principio, las moléculas cargadas se desplazan en un campo eléctrico, migrando hacia el electrodo de carga contraria. Por lo tanto, a mayor carga, mayor es la velocidad con la que la molécula se puede desplazar en un campo eléctrico. Para que esas moléculas se desplacen y puedan ser estudiadas, se utiliza un medio de soporte para la inducción del campo eléctrico. En el caso de la técnica de Western Blot, y para los fines de este manual, ese medio de soporte es un gel de poliacrilamida. La poliacrilamida al polimerizarse forma un gel termoestable, transparente y químicamente inerte, lo que hace que sea un material ideal para la realización de esta técnica. Durante la preparación de este gel se utiliza dodecil sulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, eliminando las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas, sin alterar los enlaces disulfuro. Un aspecto importante en los geles de poliacrilamida es el tamaño medio de los poros que se forman durante la polimerización, pues esto genera una resistencia a la migración de proteínas. A menor tamaño de poro, mayor será la resistencia en el medio para la migración de proteínas por carga, por lo que este es un factor a considerar al momento de diseñar un experimento y detectar una proteína de interés.

Por lo tanto, es importante considerar la concentración final de acrilamida en el gel, en función del peso de las proteínas a evaluar. Mientras que, para ser visualizadas, las proteínas de bajo peso molecular requieren un gel de poliacrilamida a una mayor

concentración (menor tamaño medio del poro), las proteínas de alto peso molecular requieren un gel de poliacrilamida a una menor concentración (mayor tamaño medio del poro) (POE-LCMA-WBT-001, Procedimientos Operativos Estandarizados, Laboratorio de Carcinogenesis del Instituto Nacional de Cancerología).

## 1-. LISIS DE CELULAS

Reactivos y Materiales:

Buffer de Lisis

- ✓ Cell Lysis Buffer (10x) (Cell Signaling, Cat #9803) o buffer RIPA.
- ✓ Coctel de Inhibidores de proteasas (*Cell. Signaling, Cat #:5871*)
- ✓ Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). (Sigma, # Cat. P7626)
- ✓ Ortovanadato de sodio (*Sigma, Lot #. 069K0031*)

## PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA

Reactivos y Materiales

Gel Concentrador y Separador

- ✓ Solución de Acrilamida Bis Acrilamida 40% (*Sigma, # Lote: SLBHO323V*)
- ✓ H<sub>2</sub>O milliq
- ✓ Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 10% (*BIO-RAD, # Cat. 161-0301*)
- ✓ Persulfato de Amonio (APS) 10% (*BIO-RAD, # Cat. 161-0700*)
- ✓ TEMED (*Sigma # Lote:71K1515*)
- ✓ Tris 0.5 M (*BIO-RAD # Cat. 161-0716*)

2.1. Preparar Gel de acrilamida de acuerdo al tamaño de la proteína.

Tamaño de la proteína (kDa)	Porcentaje del gel (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Tomado de WESTERN BLOTTING - A BEGINNER'S GUIDE – abcam.

2.2. Agregar la cantidad de reactivo correspondiente con respecto al porcentaje del gel que se desea preparar.

	Cantidad de reactivo por cada gel:					
Porcentaje del gel de poliacrilamida	Agua Milliq	Buffer de Tris (pH 8.8/6.8)*	Acilamida /Bisacrilamida al 40%	Dodecil Sulfato de sodio (SDS) al 10%	Persulfato de amonio al 10%	TEMED**
Gel Separador						
Gel al 8%	5.33 mL	2.5 mL	2 mL	100 µL	50 µL	10 µL
Gel al 12%	4.34 mL	2.5 mL	3 mL	100 µL	50 µL	10 µL
Gel Concentrador						
Gel al 4%	3.20 mL	1.311 mL	0.658 mL	525 µL	14 µL	5.83 µL

\* La preparación del gel separador: Buffer de Tris-HCL (pH 8.8) y la preparación del gel concentrador: Buffer Tris-HCL (pH 6.8)

Nota: Al preparar el gel, tomar en cuenta agregar los reactivos de manera ordenada y así evitar una polimerización inmediata; (1) Agua Milliq, (2) Tris-HCL 1.5 M (pH 8.8/6.8), (3) Acilamida/Bisacrilamida al 40%, (4) Dodecil Sulfato de sodio (SDS) al 10%, (5) Persulfato de amonio al 10% (APS) y (6) TEMED. Antes de agregar el PSA y el TEMED vigilar que todo esté listo para agregar el gel en los cristales. El PSA se debe prepara cada dos semanas y en caso de que la polimerización no se lleve a cabo adecuadamente, se puede aumentar la cantidad de TEMED.

¡Precaución! La acilamida es considerada un agente cancerígeno y una potente neurotoxina. Por lo tanto, tener precaución al preparar las soluciones de los geles de poliacrilamida.

### 3-. CORRIDA DE PROTEINAS POR SDS-PAGE

#### Reactivos y Materiales

##### Buffer de carga Laemmli (5X):

- ✓ 6 mL Tris 0.5 pH 6.8 (BIO-RAD # Cat. 161-0716)
- ✓ 2.5 mL glicerol (Fermont, # Lote: 525432)
- ✓ 0.5 mL H<sub>2</sub>O Milliq
- ✓ 0.5 mL β-mercaptoetanol (BIO-RAD, Cat # 161-0710)
- ✓ 1 g. Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (BIO-RAD, # Cat.161-0301)

- ✓ 0.002 g. de Azul de Bromofenol (Sigma, # Lot. 66H3672)

*Agregar como reactivo final el  $\beta$ -Mercaptoetanol, hacer alícuotas y congelar.*

Buffer de Corrida 10x:

- ✓ 32.2 g. de Tris 0.5 M (BIO-RAD # Cat. 161-0716)
- ✓ 144 g. de Glicina (*Promega*, # Lot. 0000155432)
- ✓ 10 g. de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).

*Ajustar pH a 8.3 y aforar a 1L.*

#### 4-. TRANSFERENCIA DE PROTEINAS EN MEMBRANAS DE PVDF

Buffer de Transferencia 10X

- ✓ 30 g. Tris-Base 25 mM (*BIO-RAD* # Cat. 161-0716)
- ✓ 145 g. Glicina 190 mM (*Promega*, # Lot. 0000155432)
- ✓ Metanol (J.T. Baker, # Cat. 9070-03): 20% para nitrocelulosa ó 10% para PVDF.

*Aforar a 1 L.*

- Membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Inmobilon # Cat. IPVH00010)

#### 5-. BLOQUEO CON LECHE

Reactivos y Materiales

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- ✓ NaCl 150 mM (J. K. Baker, #Cat. 3624-01)
- ✓ Tris-HCL 20mM (*BIO-RAD*, # Cat. 161-0716)
- ✓ Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V)

*Ajustar el pH a 7.5.*

Solución con Leche 5%

- ✓ Leche en polvo, *Svelty* de NESTLE, cero grasas.
- ✓ TBS Tween al 0.1%

#### 6-. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO:

Reactivos y Materiales

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- ✓ NaCl 150 Mm (J. K. Baker, #Cat. 3624-01).
- ✓ Tris-HCL 20mM (*BIO-RAD*, # Cat. 161-0716).
- ✓ Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V).

Ajustar el pH a 7.5.

Solución con Albumina de suero Bovino (BSA) al 3%

- ✓ Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma, Lot # SLBM2234V).
- ✓ TBS Tween al 0.1%.

- Preparar la dilución del anticuerpo primario antes de iniciar el procedimiento.

## 7-. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO:

Reactivos y Materiales

Solución con Leche 5%

- ✓ Leche en polvo, *Svelty* de NESTLE, cero grasas.
- ✓ TBS Tween al 0.1%

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- ✓ NaCl 150 Mm (J. K. Baker, #Cat. 3624-01).
- ✓ Tris-HCL 20mM (*BIO-RAD*, # Cat. 161-0716).
- ✓ Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V).

## 8-. REVELADO

Reactivos y Materiales

Solución Buffer Tris (TBS) Tween20 al 0.1%

- ✓ NaCl 150 Mm (J. K. Baker, #Cat. 3624-01).
- ✓ Tris-HCL (*BIO-RAD*, # Cat. 161-0716).
- ✓ Tween20 (Sigma, Lot # SLBN3325V).

Sustrato Quimioluminiscente para HRP (Luminol y Peroxido) (Milipore, Cat # WBKLS0500)

Revelador y reforzador al 20% (Sigma. Cat # P7042-1GA)

Fijador y reforzador al 20% (Sigma. Cat # P7167-1GA)

Placas de revelado Amersham Hyperfilm ECL. (GE Healthcare, Lot # 64102)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00076

Matricula: 2173801326

Análisis del efecto quimiosensibilizador del resveratrol, mediante la inhibición de la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga (RH), en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 31 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ  
DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR  
DR. CARLOS CESAR CORTES GONZALEZ  
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS



ANTONIA SANCHEZ VIZCARRA  
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ANTONIA SANCHEZ VIZCARRA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ

VOCAL

DR. JAVIER ESTEBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL

DR. CARLOS CESAR CORTES GONZALEZ

SECRETARIA

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS