

Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño a DNA por recombinación Homóloga (HR) y No Homóloga (NHEJ)

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Exp. **Andrea Torres Acosta**
2202800620
andreatorres2133@outlook.es

Con la Dirección de:

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Dra. Roxana Uri Miranda Labra

Dr. José de la Luz Díaz Chávez

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 1 de Agosto de 2022

Comisión Académica del Posgrado

Presente

La que suscribe Andrea Torres Acosta alumno(a) con número de matrícula 2202800620, del posgrado Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ)" a desarrollar en el Instituto Nacional de Cancerología, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



ANDREA TORRES ACOSTA

Nombre completo y firma autógrafa*

Declaración de originalidad

La que suscribe Andrea Torres Acosta, alumna del posgrado Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ)".

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el jurado para la obtención del grado de Maestro en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el __1__ de __08__ del 2022.

Atentamente



ANDREA TORRES ACOSTA

Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.

COMITÉ TUTORAL

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez
Codirectora externa
Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Roxana Uri Miranda Labra
Codirectora Interna
Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. José de la Luz Díaz Chávez
Asesor
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

**Dr. José De La Luz Díaz Chávez, Investigador en Ciencias Médicas “E”
Subdirección de Investigación Básica Instituto Nacional de Cancerología
jdiazchavez03@gmail.com**

SECRETARIO

**Dr. Héctor Fernando Serrano Universidad Autónoma Metropolitana-
Iztapalapa Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS
hser@xanum.uam.mx**

VOCAL

**Dra. Saé Muñiz Hernández Investigador en Ciencias Médicas “D”
Subdirección de Investigación Básica Instituto Nacional de Cancerología.
sayide@hotmail.com**

VOCAL

**Dr. Carlo César Cortés González Investigador en Ciencias Médicas “D”
Subdirección de Investigación Básica Instituto Nacional de Cancerología.
cesarcortesg@gmail.com**

AGRADECIMIENTOS

El Programa de la Maestría en Biología del posgrado en Biología Experimental, 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).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores:

A la Dra. **María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez**: Por su apoyo, paciencia, por alentarme a seguir adelante, por su aporte de conocimientos y las experiencias compartidas, así como las enseñanzas de las técnicas realizadas porque son invaluable, fueron una herramienta fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. **José De La Luz Díaz Chávez**: Por su valiosa asesoría, su aporte de conocimientos que fue crucial en este trabajo, su paciencia y atención.

A la Dra. **Roxana Uri Miranda Labra**: Por su supervisión a lo largo del trabajo, su atención, por alentarme a seguir adelante y por enseñarme que la humanidad es fundamental en cualquier gran investigador.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, por no dudar de mi en ningún momento, por cada día creer en mí y en mis expectativas. Gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora recaída de ánimo y por no dejarme nunca sola en este camino. Gracias a mi padre por anhelar lo mejor para mi vida. Gracias a los dos por cada consejo y por sus palabras que han servido de guía en mi vida. Agradezco a mi hermano quién me enseñó a no decaer en ningún momento a pesar de las adversidades.

A Dani, mi pareja quién me sacaba una sonrisa en los momentos adversos, nunca dejo de creer en mí y me alentó a no dejar de perseguir esta meta que hoy se cumple.

Gracias a mis amigos (Oli, Tere, Jacqueline, Rous, Are, Emanuelito, Andrés, Nicole, Marina, Lau, Carmen, entre otros) y algunos de mis primos quienes nunca dejaron de tenderme su mano. Agradezco también a mis maravillosos compañeros de laboratorio de quienes tuve la oportunidad de conocer su gran corazón y a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí, que con una palabra de aliento me animaron a seguir adelante. Al Profesor Reyes y su esposa Claudia quienes me apoyaron en la parte estadística y a nivel personal de este trabajo, los considero parte de mi familia y les llevo siempre en el corazón. A las personas que ya no están con vida pero que su memoria me sirve de inspiración para continuar cada día intentando ser un mejor ser humano.

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más común en el mundo que ocurre en la población femenina. La mayoría de los casos de CaCu se diagnostican en estadios avanzados. Por lo tanto, la radioterapia es la modalidad terapéutica más utilizada. El mecanismo de acción de la radiación ionizante (RI) es inducir daño al ADN de manera directa o indirecta; la forma directa se debe a la inducción de rupturas sobre la doble cadena de ADN y la indirecta se da a través de la formación de radicales libres. En respuesta a este estímulo, la célula es capaz de activar vías de reparación de daño al ADN como la reparación por recombinación homóloga (HR) y reparación no homóloga (NHEJ) mediante la activación de las proteínas RAD51, Ku70 y Ku80, respectivamente. Sin embargo, las células cancerosas presentan una alta actividad de estas vías de reparación que puede generar resistencia a la radioterapia. Es por eso, que actualmente existe gran interés en desarrollar o encontrar nuevos compuestos con propiedades radiosensibilizadoras que puedan actuar sobre estas vías de reparación del ADN para el tratamiento del cáncer. En este trabajo analizamos el resveratrol, un compuesto polifenol natural, como un posible radiosensibilizador. El objetivo principal fue analizar si el resveratrol (RSV) tiene propiedades como radiosensibilizador en CaCu, y si es así, buscar el posible mecanismo implicado en este efecto. Para ello se realizaron curvas dosis respuesta con RSV y RI en células SiHa, C33a y HeLa de CaCu. Los resultados demostraron que RSV efectivamente sensibiliza estas líneas celulares a RI. De manera interesante, se observó un mayor efecto en la línea celular C33a en comparación con SiHa y HeLa mediante una disminución significativa en la tasa de sobrevivencia celular. En contraste, la línea celular SiHa fue la más resistente a RSV y a la combinación RSV+ RI. Posteriormente, con el fin de dilucidar el mecanismo de reparación implicado en este efecto, se analizaron los niveles de la proteína KU80 en células SiHa. Los resultados demostraron una disminución en los niveles de la proteína KU80 con la combinación de RSV y RI (IC50-RSV+DL50-RI). Estos resultados podrían sugerir que el resveratrol funciona como radiosensibilizador en líneas celulares CaCu.

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the second most common cancer in the world that occurs in the female population. Most CC cases are diagnosed in advanced stages. Therefore, radiotherapy is the most used therapeutic modality. The mechanism of action of ionizing radiation (IR) is to induce DNA damage directly or indirectly. It can directly induce double-stranded DNA breaks and indirectly through forming free radicals. In response to this stimulus, the cell can activate DNA damage repair pathways such as homologous recombination repair (HR) and non-homologous repair (NHEJ) by activating Rad 51, Ku70, and Ku80 proteins, respectively. However, cancer cells show a high activity of these repair pathways that can generate resistance to radiotherapy. For this reason, there is currently great interest in developing or finding new compounds with radiosensitizing properties that can act on these DNA repair pathways for the treatment of cancer. In this work, we have proposed to analyze resveratrol, a natural compound polyphenol, as a possible radiosensitizer. The main objective was to analyze whether resveratrol (RSV) has properties as a radiosensitizer in CaCu, and, if so, to find the mechanism involved in this effect. For this, dose-response curves were made with RSV and RI in SiHa, C33a, and HeLa cells from CaCu. The results demonstrated that RSV effectively sensitized these cell lines to RI. Interestingly, a greater effect was shown in the C33a cell line compared to SiHa and HeLa by a significant decrease in cell survival rate. In contrast, the SiHa cell line was the most resistant to RSV and the RSV+ RI combination. Subsequently, in order to elucidate the repair mechanism involved in this effect, the levels of KU80 protein in SiHa cells were analyzed. The results show a decrease in the levels of the KU80 protein with the combination of RSV and RI (IC50-RSV+DL50-RI). These results could suggest that resveratrol works as a radiosensitizer in CC cell lines.

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: **Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño a DNA por recombinación Homóloga (HR) y No Homóloga (NHEJ)**, con fecha **10 de Agosto del 2022**.

Dr. José De La Luz Díaz Chávez, Investigador en Ciencias Médicas "E"
Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología
jdiazchavez03@gmail.com

Dr. Héctor Fernando Serrano, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS
hser@xanum.uam.mx

Dra. Saé Muñiz Hernández, Investigador en Ciencias Médicas "D" Subdirección de
Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.
sayide@hotmail.com

Dr. Carlo César Cortés González, Investigador en Ciencias Médicas "D"
Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.
cesarcortesg@gmail.com

INDICE

COMITÉ TUTORAL.....	-IV-
MIEMBROS DEL JURADO	-V-
AGRADECIMIENTOS.....	-VII-
RESUMEN.....	-IX-
ABSTRACT.....	-X-
INTRODUCCIÓN	-15-
TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER CERVICOUTERINO.....	-17-
RADIACIÓN IONIZANTE Y CÁNCER.....	-18-
RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA Y NO HOMOLÓGA (NHEJ).....	-20-
RESVERATROL.....	-23-
EFFECTOS DEL RESVERATROL.....	-23-
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	-28-
JUSTIFICACIÓN.....	-29-
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	-30-
HIPÓTESIS.....	-30-
OBJETIVO GENERAL	-30-
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	-30-
MATERIAL Y MÉTODOS.....	-31-

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	-34-
RESULTADOS.....	-35-
DISCUSIÓN	-59-
CONCLUSIÓN.....	-63-
REFERENCIAS.....	-64-

ABREVIATURAS

RSV	Resveratrol
CaCu	Cáncer Cervicouterino
HR	Recombinación Homóloga
NHEJ	Recombinación No Homóloga
VPH	Virus de Papiloma humano
E5, E6 y E7	Oncoproteínas
Rb	Proteína del Retinoblastoma
NFKB	factor de transcripción nuclear kappa-B
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
DBS	roturas de cadena doble
P53	Proteína supresora de tumores
KU80/70	heterodímero requerido para el proceso de recombinación no homóloga durante la reparación del ADN
RI	Radiación Ionizante
IC	Concentración Inhibitoria
DL	Dosis Letal

Introducción

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un tipo de cáncer que se inicia en las células del cuello uterino, se caracteriza por el desarrollo y multiplicación de manera desordenada y sin control de las células del cuello uterino, normalmente este se ubica en la parte baja del útero donde se conecta a la vagina. El CaCu es el segundo cáncer más frecuente en el mundo que se presenta en la población femenina. En México, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar de morbilidad de neoplasias malignas en la mujer sólo superado por el cáncer de mama. La incidencia en México de acuerdo con la Secretaría de Salud registró en 2017 unas 306,675 defunciones en mujeres de las cuales 42,891 corresponden a tumores malignos, el cáncer de mama junto con el de cuello uterino representa el 25% de todos los casos reportados (como se muestra en la Tabla 1), por lo tanto, la Secretaría de Salud apuntó: “1 de cada 10 muertes por cáncer de mujeres mexicanas se debe al cáncer de cuello uterino” (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva; 2018). La evidencia muestra que el diagnóstico para estas pacientes es poco prometedor, es por ello por lo que se han buscado diferentes alternativas para mejorar el tratamiento de esta enfermedad (Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva; 2018).

Principales causas de muerte en mujeres	
De 30 a 59 años	100
Tumor maligno de la mama	23
Tumor maligno del cuello del útero	13
Tumor maligno del ovario	9
Tumor maligno del colon, del recto y del ano	6
Otras causas de tumores malignos	49

Tabla 1. Imagen de la incidencia página INEGI, tomada de Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero), 2020.

Uno de los principales factores para desarrollar CaCu es la infección por el virus del papiloma humano (VPH), se estima que está presente en más del 99% de los casos; sin embargo, también se ha asociado a otros factores como: el tabaquismo, el uso prolongado de anticonceptivos orales, deficiencia del sistema inmunitario, infección por clamidia, el virus del herpes tipo 2, parto precoz, entre otras. La infección por VPH puede transmitirse a través de rutas no sexuales, aunque, la causa más común es el contacto sexual (Arévalo B et al; 2017).

El VPH es un virus pequeño no envuelto que posee una cápside icosaédrica de 50-52 nm de diámetro en donde, en conjunto con histonas celulares y formando estructuras semejantes a la cromatina, alberga un genoma de DNA circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 8 Kb. El genoma viral se replica dentro del núcleo de la célula hospedera y contiene ocho marcos de lectura abiertos (por sus siglas en inglés ORFs, Open Reading Frame) clasificados en genes tempranos y tardíos. Los ORFs tempranos codifican a seis proteínas denominadas E1, E2, E4,

E5, E6, y E7, las cuales son necesarias para la replicación del genoma viral. La transcripción de estos genes es iniciada por un promotor temprano ubicado río arriba del ORF E6 y su activación es independiente de la diferenciación de la célula hospedera. Los ORFs tardíos codifican a las proteínas principal L1 y secundaria L2 que conforman la cápside icosaédrica viral. Estos genes son expresados a partir de la activación del segundo promotor o promotor tardío, de manera dependiente a la diferenciación de la célula hospedera (Moody CA et al., 2010). La proteína L1 es capaz de auto ensamblarse mientras que la proteína L2 empaca el genoma viral dentro de la cápside. Dentro de los productos de los genes tempranos se encuentran las oncoproteínas E6 y E7, las cuales son las principales causantes de las propiedades oncogénicas de los VPH de alto riesgo como el VPH16 y VPH18. La unión de E6 con p53 es la interacción proteica más estudiada de esta oncoproteína. E6 se une y degrada a la proteína supresora de tumores p53 en conjunto con la E3 ubiquitin ligasa E6AP, formando el complejo trimérico E6-E6AP-p53 el cual marca a p53 hacia degradación por ubiquitinación vía proteasoma 26S. Por otro lado, E7 se une a Rb (proteína del retinoblastoma) y libera al factor de transcripción E2F favoreciendo la expresión de genes necesarios para la replicación de DNA, ocasionando que la célula infectada entre a la fase S del ciclo celular de manera sostenida y no programada (Ganguly N et al., 2009).

Tratamiento para el cáncer cervicouterino

En el CaCu se proponen diferentes tratamientos que dependen de distintos factores como el volumen del tumor, la edad de las pacientes y la etapa en la que se encuentra el cáncer, entre otros (American Cancer Society, 2017).

Dado que algunas pacientes no tienen éxito con la terapia estándar y que estos tratamientos tienen efectos secundarios muy evidentes, uno de los objetivos en la actualidad es la personalización de terapias, buscando mayor especificidad, eficacia y el menor daño colateral posible (American Cancer Society, 2017).

Los principales tratamientos contra el CaCu son los siguientes:

- **Cirugía:** Técnica en donde se retira el tejido canceroso.
- **Radioterapia:** Forma de tratamiento basada en altas dosis de radiación para tratar el cáncer
- **Quimioterapia:** tratamiento basado en la administración de un coctel de fármacos (por ejemplo, cisplatino, carboplatino y taxol).

La mayoría de los casos de CaCu son diagnosticados en estadios avanzados, utilizando como tratamiento principal la radiación combinada con quimioterapia. Actualmente, el uso de quimio-radioterapia concomitante basada en cisplatino se considera el tratamiento estándar debido a que el cisplatino ha demostrado un efecto sensibilizador a la radiación.

Radiación ionizante y cáncer

La radiación ionizante es un tipo de energía liberada por los átomos en forma de ondas electromagnéticas (rayos gamma o rayos X) o partículas (partículas alfa y beta o neutrones) y que tienen energía suficiente como para modificar la materia a nivel atómico (Havránková et al., 2020). Al interaccionar la radiación ionizante con una célula se producen ionizaciones y excitaciones en estas grandes moléculas

como son el ADN, ARN, enzimas, proteínas entre otras con el medio en el que están en suspensión las estructuras celulares (mayoritariamente agua). Por esta razón suele dividirse la acción de la radiación en directa (sobre las macromoléculas) e indirecta (sobre el medio) (Ghosh et al., 2019). En el caso de la acción directa, la radiación induce rupturas de cadena simple (single strand DNA, ssDNA) y rupturas de cadena doble (double strand breaks, DSBs) en el DNA, lo que provoca la interrupción de la división y la proliferación celular, o incluso la necrosis y la apoptosis de las células cita (Mecanismo ilustrado en la Figura 1).

INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA

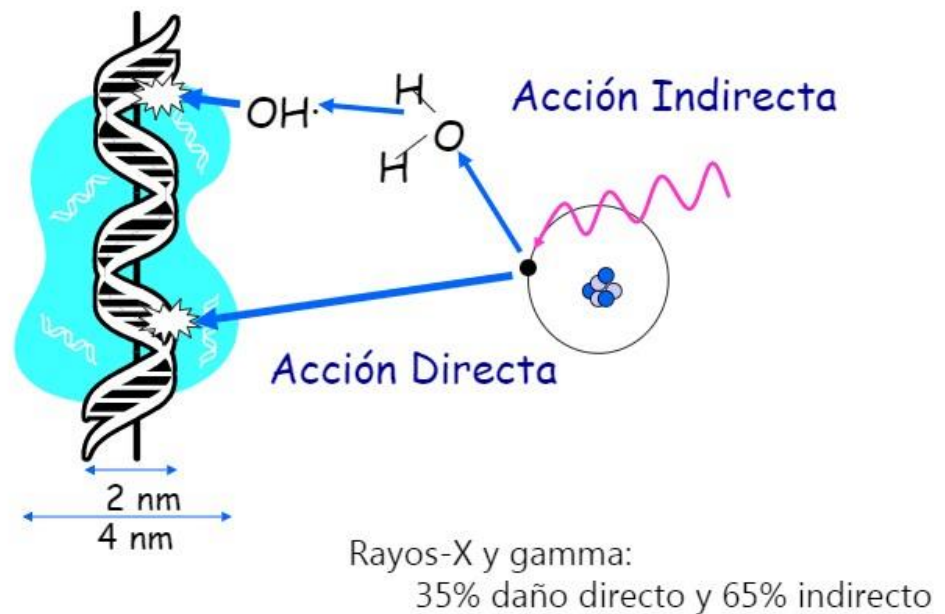


Figura 1. Tipos de daño inducidos por radiación ionizante sobre el DNA.

Mientras que, en la acción indirecta, la radiación promueve la generación de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno), que pueden inducir estrés celular y alterar las

vías de señalización celular. Los estudios clínicos han demostrado que más de la mitad de los pacientes (alrededor del 70%), necesitan recibir radioterapia, y en algunos casos es la única opción de tratamiento para las pacientes (Martin OA et al., 2020). Sin embargo, presenta desventajas al igual que los observados por la citotoxicidad del cisplatino como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, etc.

Recombinación Homóloga (HR) y recombinación No Homóloga (NHEJ)

Como respuesta del daño al DNA por rupturas de doble cadena existen mecanismos de reparación que se activan cuando las células sensan este daño, uno de ellos es la recombinación homóloga (HR) como se muestra en la Figura 2, este mecanismo consiste en usar la cromátida hermana homóloga para poder reparar las cadenas dañadas a través de un complejo enzimático que se une al DNA. La proteína serina/treonina cinasa ATM, sensa el daño y esta activa al complejo MRN formado por las proteínas Rad50 (proteína reparadora de DNA), MRE11 (proteína reparadora de doble hebra) y NBS1 (nibrina). RAD51 forma filamentos de nucleoproteína, que invaden la cromátida hermana homóloga adyacente, propicia la formación de una estructura en forma de asa, enseguida la extensión del asa da pie a que pueda capturar el otro extremo del DNA, dando como resultado una estructura de cadenas entrecruzadas conocido como estructuras de “Holliday” esta resolución se realiza por medio de una resolvasa, llamada Gen1, completando la reparación, y generando dos cromátidas hermanas idénticas ;(Rassool y Tomkinson et al., 2010; Jasin y Rothstein et al., 2013; Kristoffer et al., 2019). La HR se activa durante la fase S del ciclo celular, cuando existe una cromátida hermana replicada

que se puede utilizar como molde homólogo para copiar y restaurar la secuencia de DNA (Aparicio et al., 2015).

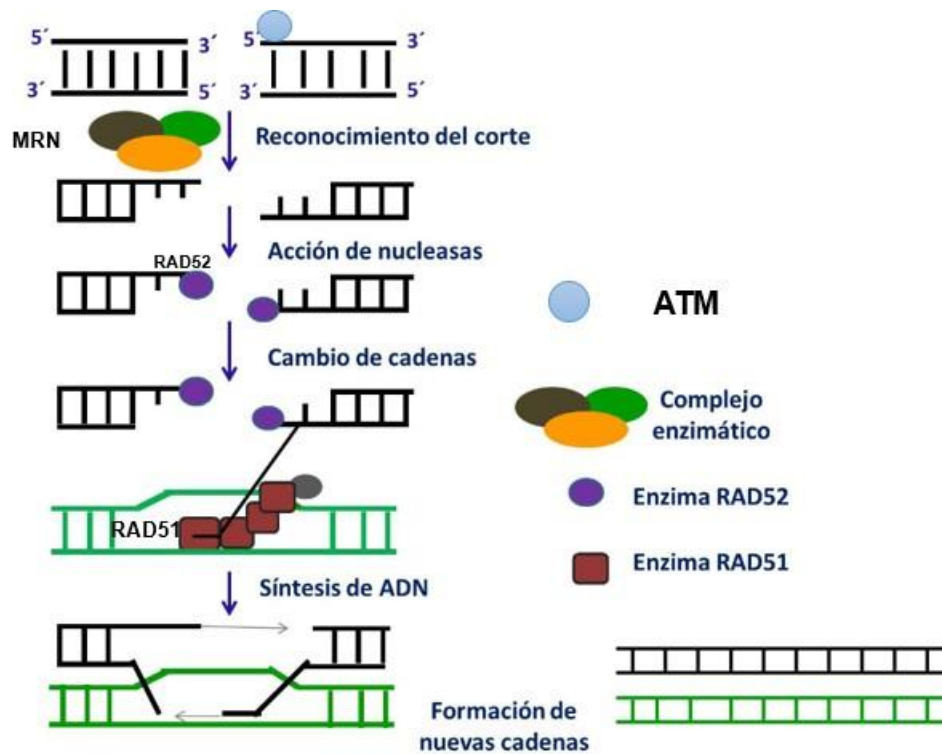


Figura 2. Vía de reparación por recombinación Homóloga.

Por otro lado, si la vía de HR no se activa la célula es capaz de activar otro mecanismo de reparación conocido como reparación de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). En este mecanismo los extremos de las cadenas se colocan juntos y se pegan; sin embargo esta vía de reparación es susceptible de errores porque no utiliza la cromátida hermana como molde, se activa durante la fase S y la fase G2 y, se considera más rápido (Kristoffer et al., 2019). Como se puede observar en la Figura 3 este mecanismo de reparación se activa a través del complejo proteico KU, el cual está formado por un hetero tetrámero de dos subunidades, Ku70 y Ku80. Este complejo reconoce el sitio de corte y se encarga

de mantener las cadenas unidas por lo tanto es considerado necesario para la vía de NHEJ durante la reparación del DNA. Posteriormente, se activa la cinasa de proteínas dependiente de DNA, la ligasa IV que une extremos de DNA y XRCC4, que son requeridas para llevar a cabo la ligación de las cadenas (Kakarougka et al., 2013).

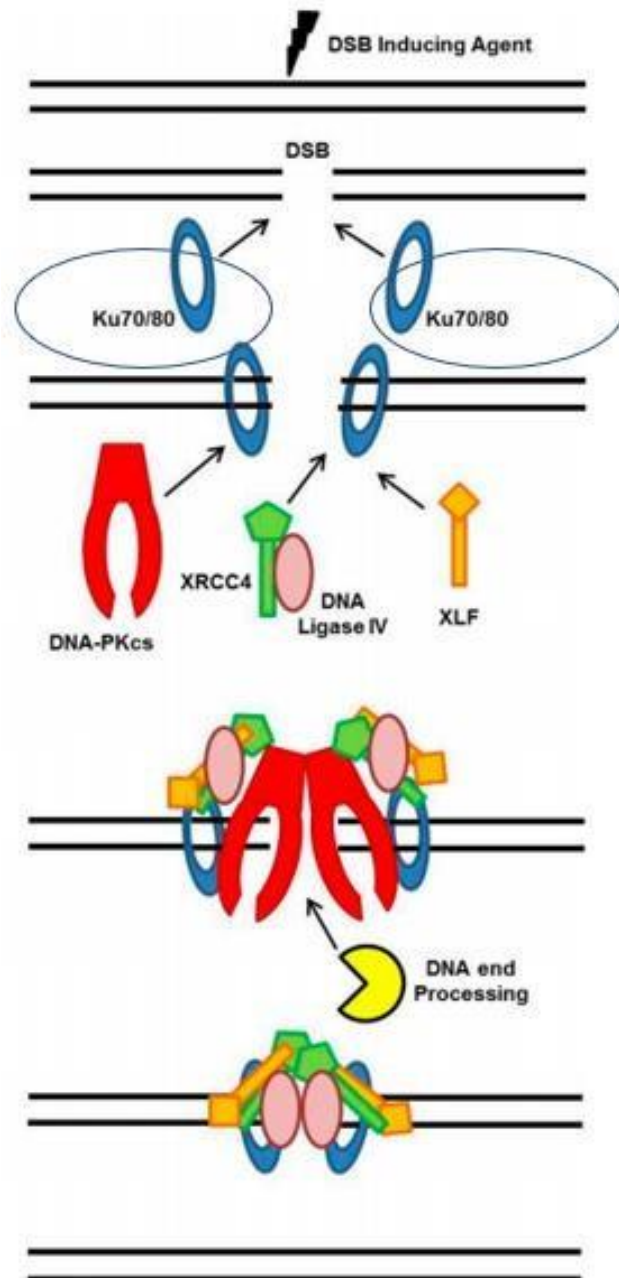


Figura 3. Vía de reparación por recombinación No Homóloga

Resveratrol

El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol y fitoalexina natural, que se encuentra en ingredientes de la dieta mediterránea como en los cacahuates, uvas, vinos, entre otros frutos. El resveratrol posee efectos antiinflamatorios, antioxidantes, neuroprotectores, cardioprotectores, quimiopreventivos, antitumorales y quimiosensibilizadores (Figura 5) (Cottar *et al.*, 2014).

La biodisponibilidad de este compuesto natural dependerá de su estructura química (Figura 4). La glicosilación en el caso del resveratrol lo hace más soluble y lo protege de ser degradado (Scalbert and Williamson, 2000).

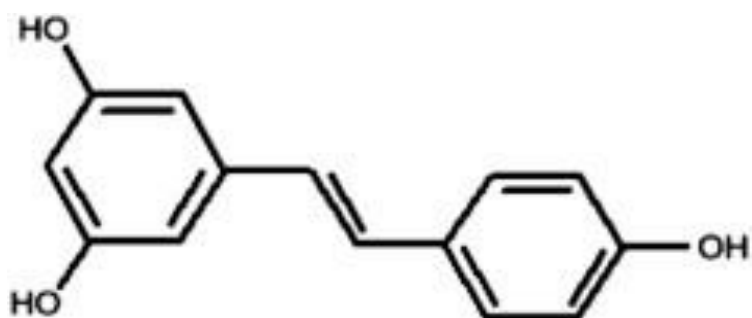


Figura 4.- Forma activa (trans-resveratrol). Obtenida de Gambini *et al.*, 2013.

Efectos del resveratrol

Diversos estudios han reportado un efecto pleiotrópico del RSV en células tumorales el cual depende de las dosis administradas (Figura 5) (Abdullah *et al.*, 2020); por

ejemplo, se ha observado que el resveratrol induce un aumento de las ciclinas A y E; así como una acumulación de CdC2, eventos que provocan una detención total del ciclo celular en la fase S (Andrew K Joe et al; 2002).

Además, se ha reportado que el resveratrol tiene propiedades prooxidantes, acelerando la peroxidación de lípidos y favorece el daño al DNA debido a que es capaz de inhibir el ribonucleótido reductasa y las DNA polimerasas implicadas en las vías de reparación de daño al DNA (Abdullah Shaito et al; 2020).

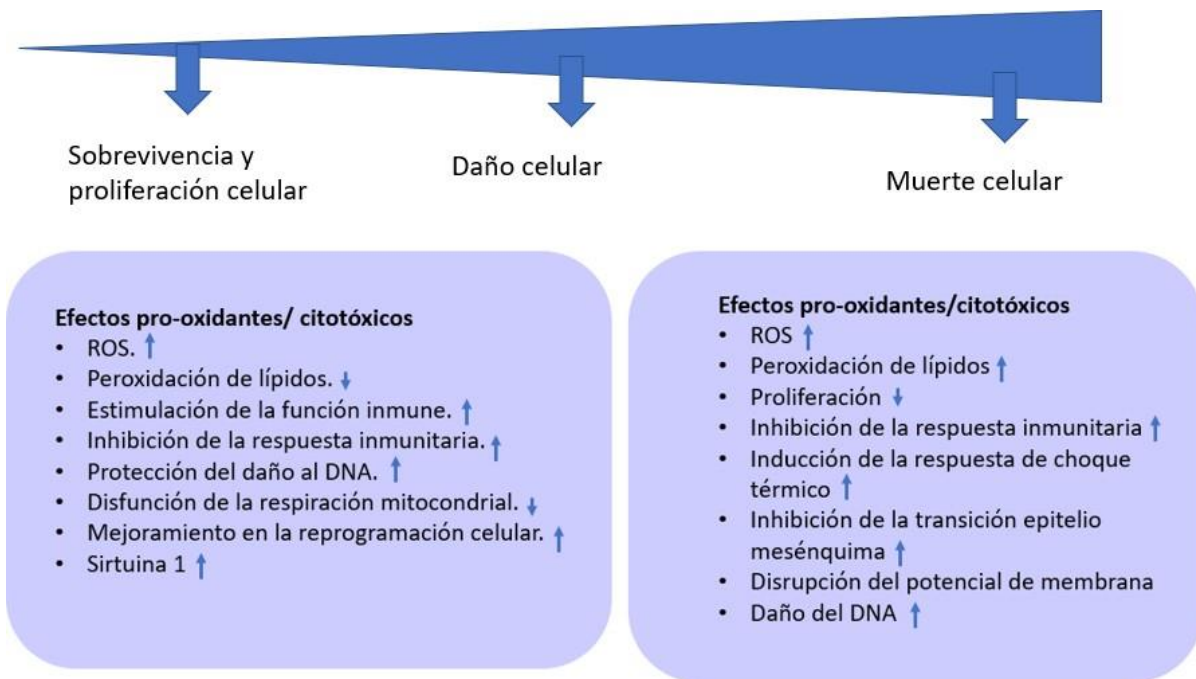


Figura 5. Obtenida de Abdullah., 2020. Efectos dependientes de la dosis del resveratrol (RSV). A concentraciones bajas y altas ofrece efectos beneficiosos en la prevención de la formación de cáncer (quimiopreventivo) y como antitumoral en el tratamiento del cáncer (citotóxico).

Otra función que tiene el resveratrol es que puede favorecer la resistencia al daño oxidativo a través de la activación de la vía de señalización SIRT1/FoXO1 (Jiang et al; 2020).

Por otro lado, el resveratrol también ha demostrado tener propiedades antitumorales en respuesta de daño al DNA inducido por la radiación ionizante través de la captación de radicales (Figura 5) (ROS por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) que conducen a la activación de la proteína quinasa activada por 5-AMP (Tomokazu et al; 2021) y al bloqueo de los puntos de control del ciclo celular (Araldi et al.,2018).

También se ha observado que el resveratrol inhibe la enzima ribonucleótido reductasa, la actividad DNA polimerasa, así como la inhibición de la proteína cinasa C o ciclooxigenasa-2 a través de la inhibición de NF-kB y la degradación de IκB y por lo tanto la translocación de la subunidad p65 de NF-kB desde el citosol al núcleo (Elsaheer et al., 2018). Otro estudio sugiere que RSV inhibe la carcinogénesis mediada por ROS a través desactivación de la vía SIRT1/AMPK y Nrf2 lo que conlleva a la inhibición de la división celular y activación de la muerte celular por autofagia a través de la inhibición de mTOR dependiente de SIRT1/AMPK; así como la estimulación de las proteínas autofágicas Atg5, Atg12, Beclin-1 y LC3-II (Baatout S et al., 2004, García et al., 2013). Otro estudio también demostró que RSV induce autofagia por la inhibición de la vía AKT/mTOR a través de SIRT1 y NLRP3 (Kma, Lakhan et al., 2013).

Además, se ha reportado que el RSV es capaz de inducir apoptosis a través de la activación de P53, así como a través de la inhibición de la expresión del miR-21. Por otro lado, se ha reportado que RSV también suprime inflamación ya que tiene la capacidad de inhibir el inflamosoma NLRP3, como se había mencionado anteriormente, que contiene una proteína adaptadora asociada a la apoptosis y procaspasa -1 (Kma,

Lakhan et al., 2013). Además, el RSV puede inhibir tanto el crecimiento celular e inducir apoptosis en células escamosas de cáncer de piel mediante la inactivación de WNT2 (Kma, Lakhan et al., 2013).

Otro estudio reveló que el RSV tiene la capacidad de inducir la expresión de la proteína activada por mitógeno (MAP) quinasa fosfatasa -1 (MKP-1), proteína clave para suprimir la inflamación (Kma, Lakhan et al., 2013). Se ha observado que RSV también puede inhibir la activación de anti-carcinógenos a través de la regulación negativa de los citocromos P450 (Elsaheer et al., 2018). Todos estos efectos se ilustran en la Figura 6.

Con base en estos descubrimientos se ha observado que el resveratrol tiene la capacidad de regular la expresión de moléculas antiproliferativas y proapoptóticas, así como de inhibir las moléculas pro-proliferativas y anti-apoptóticas, lo que conduce a la inducción de la apoptosis a través de diversas vías y muerte celular (Figura 6) (Kma, Lakhan et al., 2013).

Debido a que la radiación ionizante induce de manera indirecta la formación de ROS, se ha propuesto que los compuestos radiosensibilizadores como el resveratrol pueden incrementar las reacciones de óxido/ reducción (redox) y que son capaces de exacerbar los daños celulares relacionados con las ROS incluyendo las RCD s (por sus siglas en inglés, Regulated Cell Death) lo cual satura a los sistemas de captación de ROS y favorece la muerte de las células tumorales (Vendrely., et al 2019). En este sentido, un estudio sugiere que el resveratrol tiene la capacidad de incrementar las reacciones redox, provocando un aumento en la producción de ceramida y en la expresión de receptores de apoptosis como el ligando Fas (FasL)

lo que sugieren que el resveratrol puede aumentar la eficacia terapéutica de la radioterapia en cáncer (Ashrafizadeh M et. Al, 2020).

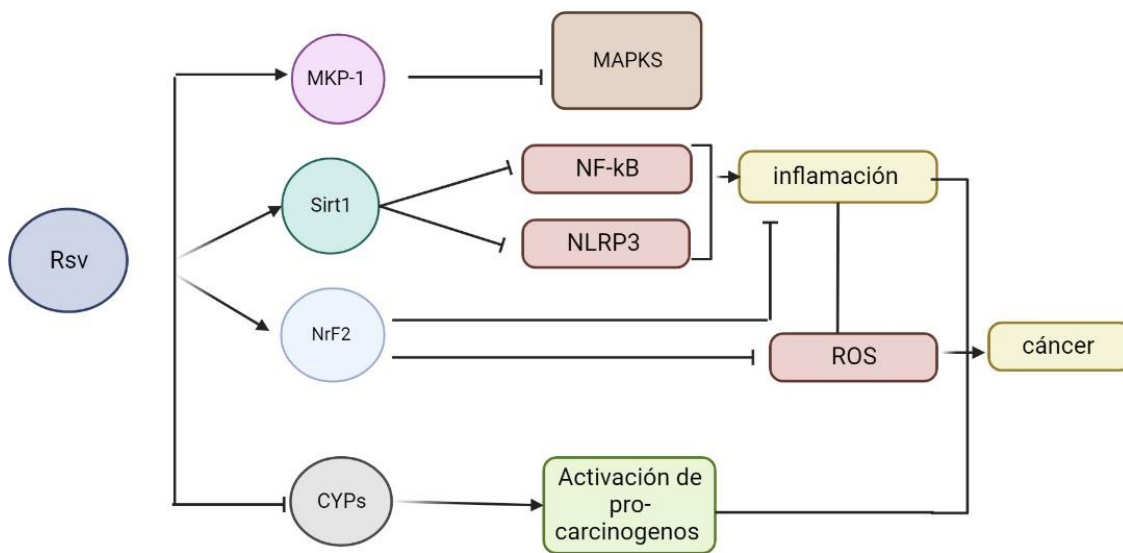


Figura 6. Mecanismos por los cuales el resveratrol ejerce sus efectos antitumorales ilustración tomada de (Elsaheer et al., 2018)

Antecedentes directos

Se ha reportado que el resveratrol induce muerte celular por apoptosis en células de cáncer cervicouterino HeLa, SiHa y CaSki e incrementa la autofagia en células HeLa, C33a y CaLo (García et al., 2013). Posteriormente, también se reportó que el RSV disminuye la expresión de genes implicados en vías de reparación de daño al DNA específicamente del complejo MRN (NBS1 y MRE11) en células de cáncer de mama MCF7 (León-Galicia et al, 2013). Recientemente Assad y sus colaboradores en 2018 corroboraron estos resultados en células de cáncer cervicouterino HeLa, y también reportaron que la combinación de RSV (100 μ M) con los fármacos Everolimus y temsirolimus incrementa los niveles de apoptosis celular e inhibición de la actividad de la telomerasa (Assad et al; 2018). Con base en estos resultados existe gran interés en comprobar si el RSV pudiera tener un efecto como radiosensibilizador en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, Baatout y sus colaboradores en el 2004, demostraron que el tratamiento concomitante de RSV (concentraciones de 0 a 200 μ M) y radiación ionizante induce apoptosis e inhibición del crecimiento celular en células de cáncer cervicouterino HeLa, mieloma IM9 y leucemia K-562 (Baatout S et al., 2004). Otro estudio también demostró que el tratamiento con RSV y radiación ionizante en células de cáncer oral disminuye la migración celular y aumenta la muerte celular por apoptosis (Atienzar et al., 2014). Además, otro estudio apoyo estos hallazgos y demostró que RSV (100 μ M) puede actuar como quimio y radiosensibilizador en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) FaDu y HSC-4, a través de la inhibición del crecimiento celular y al aumento de REGIII (proteína 3 gamma regeneradora) *in vitro* (Mikami et al., 2019). Estos resultados fueron posteriormente correlacionados en un modelo

murino de xenotransplante de células de HNSCC (Mikami et al., 2019). Otro estudio también analizó el mecanismo de radiosensibilización mediado por RSV en células de cáncer de mama MCF-7 a través del aumento en la actividad de la caspasa 8 y Bax/ Bcl2, vía de apoptosis extrínseca, junto con la sobreexpresión de p53 y un aumento en el daño al DNA; sin embargo, no analizaron que vías de reparación, podrían estar involucradas (Araldi et al., 2018).

Justificación

El cáncer cervicouterino en la actualidad sigue siendo un problema de salud pública en las mujeres de todo el mundo. La mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados, por lo tanto, la radioterapia es la modalidad terapéutica más utilizada (Cetina, 2006). Por lo anterior, uno de los tratamientos estándares para este tipo de cáncer es el uso combinado de quimio-radioterapia, principalmente con cisplatino, este fármaco ha demostrado un efecto como sensibilizador a la radiación (Ghosh et al., 2019); sin embargo, los efectos secundarios resultan en toxicidades muy altas para los pacientes. Por lo que, la búsqueda de nuevos agentes radiosensibilizadores es de gran importancia en este tipo de neoplasia. En este sentido, se ha reportado que el RSV es un buen candidato como radiosensibilizador en varios tipos de cáncer.

En base a lo anterior, consideramos que es importante estudiar el posible efecto radiosensibilizador del RSV en cáncer cérvicouterino y si esto es dependiente de la inhibición de las vías de reparación HR y NHEJ, responsables de reparar el daño inducido por la radiación ionizante; con el objetivo de reducir la dosis necesaria para

disminuir el tamaño de los tumores y por lo tanto reducir los efectos secundarios contribuyendo a una mayor supervivencia y calidad de vida de las pacientes con cáncer cervicouterino.

Pregunta de investigación.

¿Cuál es el efecto del RSV en combinación con radioterapia y mediante que mecanismos de reparación de daño al DNA está asociado?

Hipótesis

El tratamiento con RSV tendrá un efecto radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ).

Objetivo general

Evaluar el efecto del RSV como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño al DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ).

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la combinación de RSV y radiación ionizante en células de cáncer cervicouterino.

2. Analizar el efecto de RSV y radiación ionizante sobre el nivel de la proteína RAD51 de la vía de reparación por HR.
3. Analizar el efecto de RSV y radiación ionizante sobre el nivel de las proteínas clave Ku70 y Ku80 de la vía NHEJ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular. Las células de cáncer cervicouterino HeLa (positiva para VPH-18), SiHa (positiva para VPH-16) y C33a (Negativa para VPH) se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco con F12, pH 7.4 (DMEM-F12, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Gibco) al 10% (v/v) y una solución comercial de antibióticos compuesta por 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) en una incubadora a 37°C, con una atmósfera húmeda de 5% de CO².

Tratamiento. Se sembraron 2X10⁴ células HeLa, 3X10⁴ células SiHa y 4X10⁴ células C33a en placas de 12 pozos y se incubaron por 24h, y 48h exclusivamente para las células C33a con fin de asegurar que se hayan adherido a la placa. Posteriormente se realizaron curvas dosis-respuesta y fueron expuestas a diferentes dosis de RSV (Sigma-Aldrich) (50, 100, 150, 200 y 250 µM) por 48h. Como control de vehículo del fármaco se utilizó etanol.

Radiación Ionizante. Se sembraron 2.5 x 10⁵ células HeLa, SiHa y C33a en botellas de cultivo con una superficie de 25 cm² y se incubaron a 37°C, con una atmósfera húmeda de 5% de CO². Después de 24 h fueron expuestas a diferentes

dosis de radiación ionizante (rayos gamma) 2, 4, 6 y 8 Gy con el equipo Biobeam GM2000 (fuente de poder Cs 137) posteriormente se determinaron las DL20 y DL50 (Dosis Letal) mediante ensayos clonogénicos.

Ensayo clonogénico. Después de la exposición a radiación ionizante las células HeLa, SiHa y C33a se tripzinizaron y se cuantificaron mediante un contador electrónico TC10 BIORAD, se sembraron 1,000 células irradiadas en cajas p60 por 14 días aproximadamente, o dependiendo del tiempo de duplicación celular de cada una de las líneas celulares. Posteriormente, se fijaron y se tiñeron las colonias formadas con 50 células mediante una solución con formaldehído al 10% y cristal violeta, finalmente se cuantificaron mediante el software Image J y se determinó la eficiencia de plaqueo (EF) y la fracción de sobrevivencia (FS).

Determinación de la Concentración Inhibitoria (IC50).

Para poder utilizar el tratamiento combinado en las células HeLa, SiHa y C33a primero se determinaron las “Concentración Inhibitoria” ICs 10, 20, 30, 40 y 50 con RSV. La IC50 se define como la concentración a la que un fármaco es capaz de inhibir un proceso biológico en un 50% en este caso la viabilidad celular. Por lo que a partir de los datos obtenidos en las curvas dosis-respuesta se obtuvo una gráfica sigmoïdal mediante una regresión no-lineal de cuatro parámetros con el programa Sigma Plot 10.0. y finalmente se obtuvieron las concentraciones correspondientes a las ICs (Tabla 2).

Tratamiento combinado con RSV y radiación ionizante.

Después de determinar las ICs se seleccionaron las dosis IC20 e IC50 de RSV y DL20 y DL50 correspondientes para cada línea celular. A continuación, se trataron las células por 48h con RSV (IC20 e IC50) y posteriormente fueron expuestas a RI (DL20 y DL50) finalmente se resembraron células para realizar los ensayos de clonogenicidad así como también se obtuvo un botón celular para la extracción de proteínas.

Extracción de proteínas. Después de exponer las células a RSV y radiación ionizante como se describió anteriormente, se obtuvo el botón celular de cada una de las líneas celulares mediante tripsinización. A continuación, los botones celulares fueron resuspendidos en 80 μ l de buffer de lisis para la extracción de proteínas mediante el método de RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, NaCl₂, Tris 50mM, se adicionó un inhibidor de proteasas PMSF (1mM) y 1X de cocktail de inhibidor de proteasas # Cat. P8340, Sigma-Aldrich). La concentración de proteínas de cada una de las muestras se cuantificó mediante el método del ácido bicinconinico (Sigma-Aldrich).

Western blot. Se tomó el volumen equivalente a 30 μ g de proteínas por muestra y se mezcló en un tubo con buffer desnaturizante (Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, 150mM de β -mercaptoetanol, 150mM de Ditioteitol, 1% de azul de bromofenol y 30% de glicerol) y se colocaron en ebullición durante 5 min. Las muestras se cargaron en un gel desnaturizante al 10% (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) y posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF con un poro de 0.45 μ m. Para confirmar la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se tiñó con Rojo de

Ponceau (# Cat. P7170, Sigma-Aldrich) y se incubó en la solución de bloqueo (Tween-TBS 0.1% y 5% de leche baja en grasas, TTBS) por 1h. Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente para las proteínas Ku80 (ab119935), dilución: 1:1000; Rad51 (sc-8349), dilución 1:1000 y Actina (A3854-200 UI), dilución: 1: 10,000 en TTBS toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 10 min y posteriormente se re-incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante una hora a temperatura ambiente, después se realizarán cuatro lavados de 10 min con TTBS y la membrana fue incubada con un sustrato quimioluminiscente (BIO RAD) y expuesta con una película radiográfica. Finalmente, se realizó el análisis densitométrico de la placa escaneada con el software Image J.

Análisis estadístico.

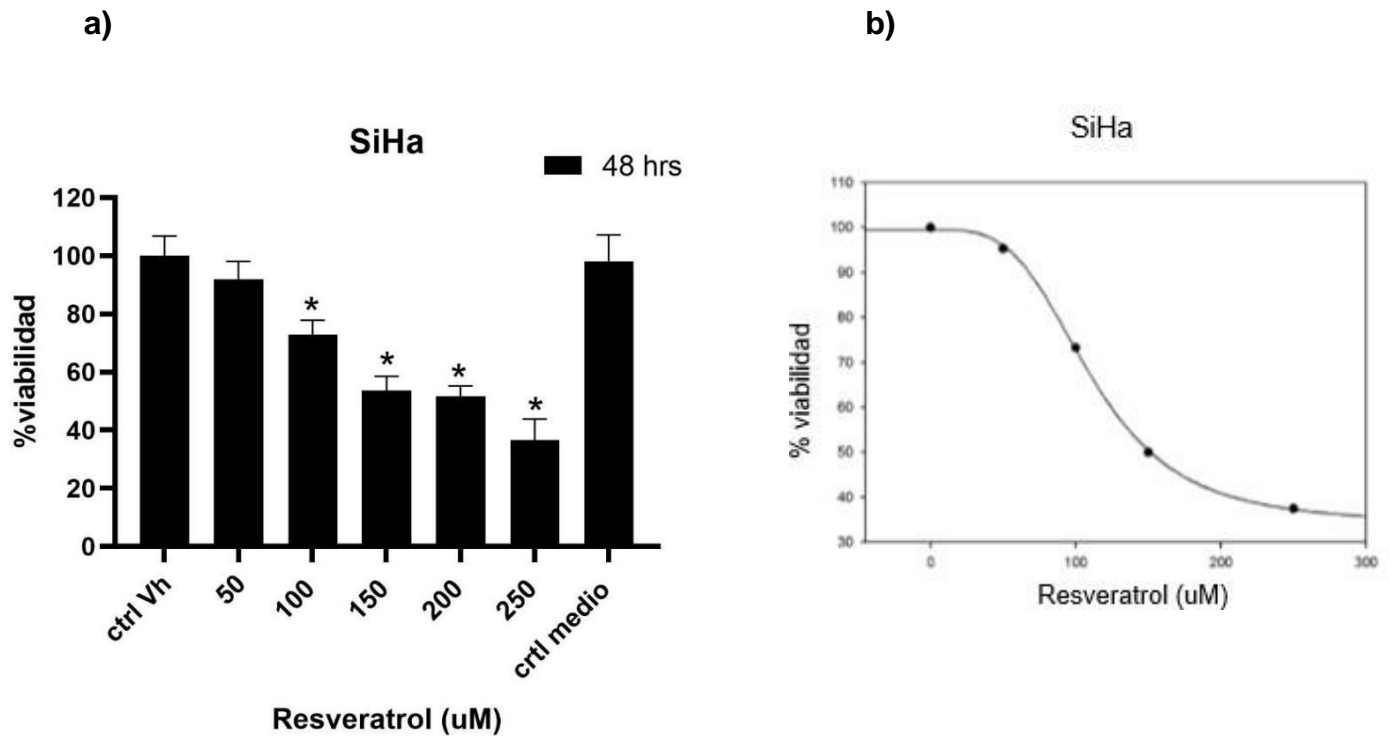
Los ensayos se hicieron por triplicado y los resultados descriptivos se muestran como el promedio de los 3 experimentos y su desviación estándar (SD). Para determinar las diferencias estadísticas se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y Dunnet para hacer la comparación entre sí.

Los asteriscos * representan las diferencias significativas consideradas con un valor de $P < 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

Efecto del RSV en la línea celular SiHa.

Los resultados de la Figura 7a muestran que el RSV disminuye de manera significativa la viabilidad de las células SiHa, de manera dosis-dependiente con respecto a las células no tratadas. Posteriormente, se determinaron las IC's de RSV a partir de la gráfica sigmoideal (Figura 7b) obtenida mediante el programa Sigma Plot. Los valores de las IC's para Siha fueron IC10=66µM, IC20=85 µM, IC30=104 µM, IC40=123 µM, IC50=149 µM (Figura 7c).



c)

IC	IC10	IC20	IC30	IC40	IC50
Resveratrol uM	66	85.7	104.74	123.7	149

Figura 7. Efecto del RSV sobre la viabilidad de las células SiHa. a) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas las células con diferentes concentraciones de RSV 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 RSV respecto al control. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA de dos vías con un valor de $P < 0.05$. b) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con RSV c) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar (μM), determinados mediante el programa Sigma Plot.

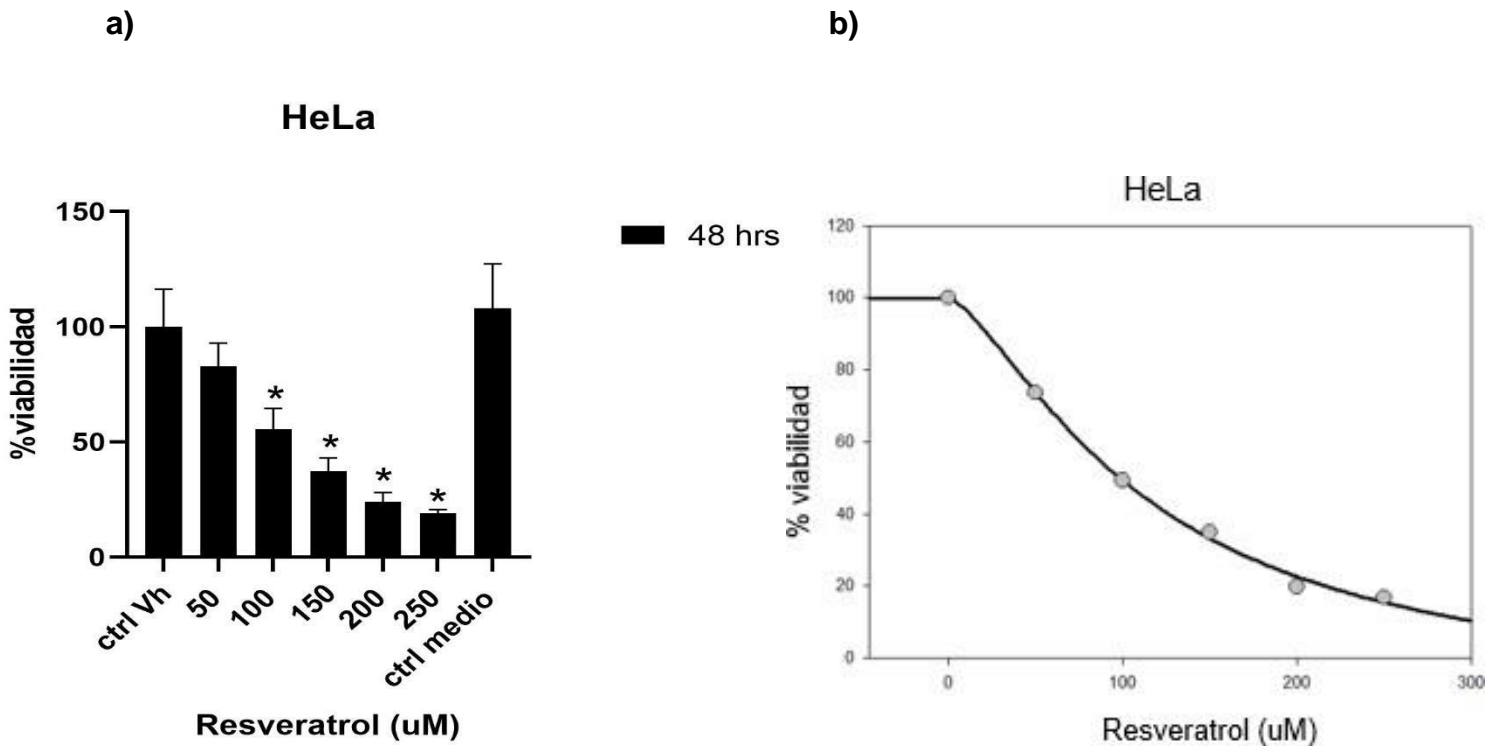
Efecto del RSV en la línea celular HeLa.

En segundo lugar, las células HeLa también fueron tratadas con diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200 μM) de RSV en medio fresco cada 24 h y tratadas durante 48h. Los resultados de la Figura 8a muestran que el RSV disminuye de manera significativa la viabilidad de las células HeLa, de manera dosis-dependiente con respecto a las células no tratadas.

A continuación, se determinaron las IC's de RSV a partir de la gráfica sigmoideal obtenida mediante el programa Sigma Plot (Figura 8b y 8c).

Estos resultados demostraron que las células HeLa fueron más sensibles al tratamiento con RSV en comparación con las células SiHa, pues las concentraciones de las ICs en células SiHa como podemos observar fueron mayores (IC₁₀=66 μM , IC₂₀=85 μM , IC₃₀=104 μM , IC₄₀=123 μM , IC₅₀=149 μM) en comparación con las calculadas para las células HeLa (IC₁₀=21 μM , IC₂₀=38.6 μM ,

IC30=54.7 μ M, IC40=74.94 μ M, IC50=97.8 μ M). Siendo así, la IC10, 3 veces menor en células HeLa que la reportada para la línea SiHa. Del mismo modo la IC20, IC30, IC40 y IC50, fueron 2 veces menor en células HeLa en comparación con las células SiHa (Figura 8c).



c)

IC	IC10	IC20	IC30	IC40	IC50
Resveratrol uM	21.03	38.6	54.7	74.94	97.8

Figura 8. Efecto del RSV sobre la viabilidad de las células HeLa. a) La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de cristal violeta después de ser incubadas las células con diferentes concentraciones de RSV durante 48 horas. Las barras representan el promedio de tres experimentos por triplicado \pm la desviación estándar (DS) y las diferencias del tratamiento con RSV respecto al

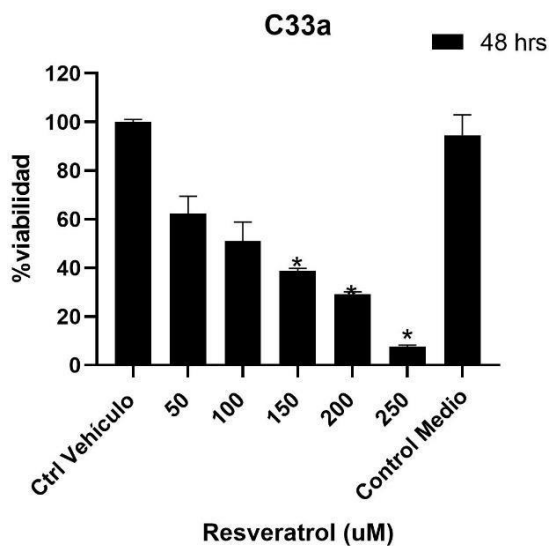
control. b) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con RSV. c) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar (μM), determinados mediante el programa Sigma Plot.

Efecto del RSV en la línea celular C33a.

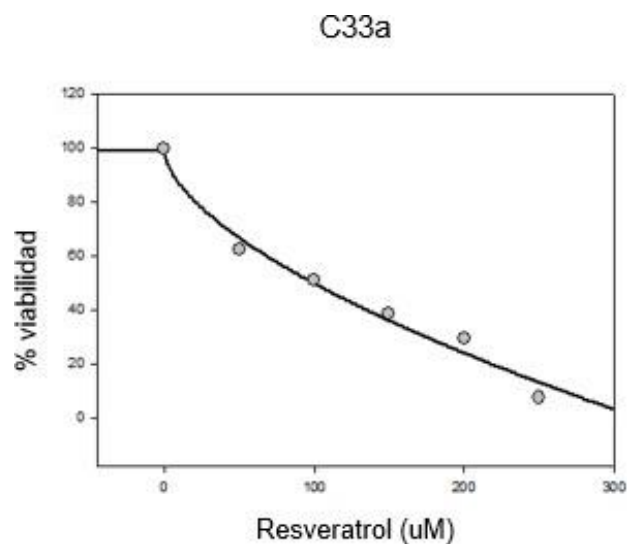
Las células C33a, también fueron tratadas y evaluadas con diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 200 μM) de RSV durante 48 h. Los resultados de la Figura 9a muestran que el RSV disminuye de manera significativa la viabilidad de las células C33a, de manera dosis-dependiente con respecto a las células no tratadas. A continuación, se calcularon las IC's de RSV a partir de la gráfica sigmoidea obtenida mediante el programa Sigma Plot (Figura 9b y 9c).

Observamos una mayor sensibilidad al tratamiento con RSV en las células C33a en comparación con la línea Hela y SiHa. Como podemos observar para línea C33a los valores de las IC20 e IC50 con RSV fueron 21 μM y 96.5 μM , respectivamente y fueron muy similares a los obtenidos para las células HeLa, IC20 fue de 38 μM y la IC50 de 97.8 μM . En contraste con lo observado en las células SiHa en donde los valores fueron mucho más altos IC20 de 85.7 μM , es decir 4 veces mayor y una IC50 de 149 μM casi el doble de la concentración.

a)



b)



c)

IC	IC10	IC20	IC30	IC40	IC50
Resveratrol uM	6	21.03	41.25	68.2	96.5

Figura 9.- Efecto del RSV 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 RSV 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 RSV respecto al control. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA de dos vías con un valor de $P < 0.005$. b) Gráfica de la curva dosis respuesta para determinar las concentraciones inhibitorias (IC's) del tratamiento con RSV. c) La tabla muestra los valores, en concentración micromolar (μM), determinados mediante el programa Sigma Plot.

Finalmente se muestra en la siguiente Tabla el resumen de las concentraciones inhibitorias (IC20 e IC50) calculadas para cada una de las líneas celulares de cáncer cervicouterino.

	IC20	IC50
SiHa	55.2 μM	142 μM
HeLa	21.8 μM	98 μM
C33a	21 μM	96.5 μM

Tabla 2 . Cuadro comparativo de las ICs, resultados obtenidos y calculados previamente de las líneas celulares C33a, SiHa y HeLa.

Determinación del efecto de la radiación ionizante en las líneas celulares de cáncer cervicouterino

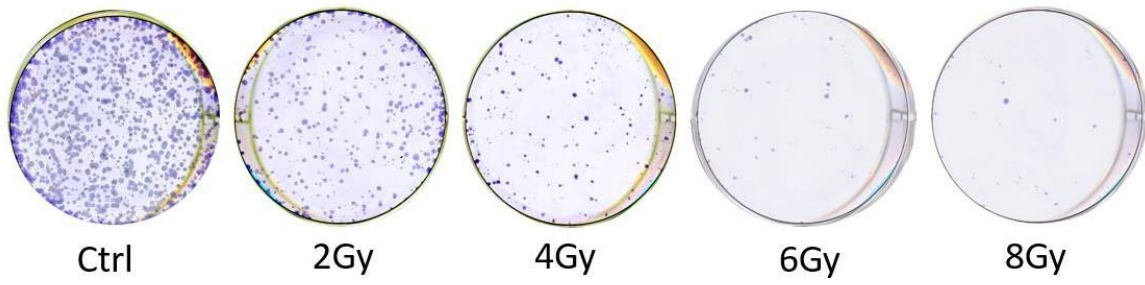
A continuación, se analizó el efecto de la radiación ionizante en las células líneas celulares SiHa, HeLa y C33a mediante curvas dosis respuesta de la exposición a radiación ionizante (2, 4, 6 y 8 Gy) y mediante ensayos clonogénicos durante 9 y 11 días. El ensayo clonogénico permite cuantificar la tasa de supervivencia celular después de una dosis de radiación. Finalmente se determinó la fracción de

sobrevivencia DL20 y DL50 a partir de la ecuación $Y = \exp(-1*(A*X + B*X^2))$ en el programa Sigma Plot.

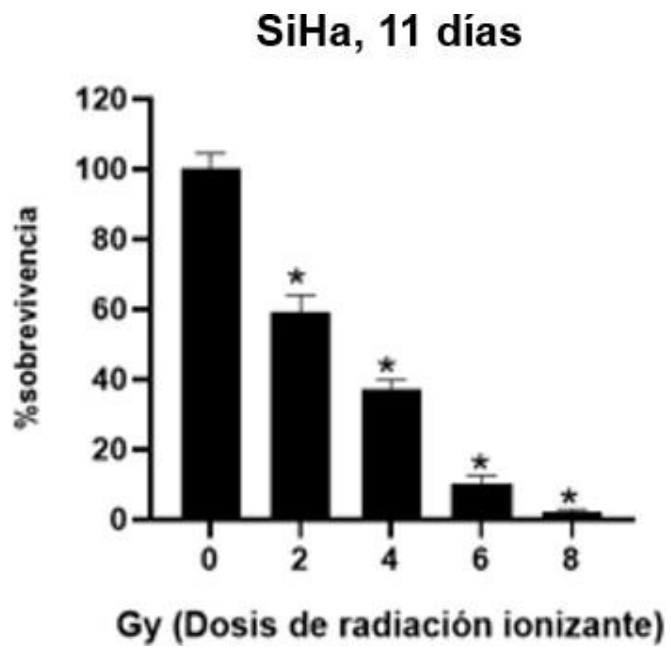
Determinación de la DL20 y DL50 de la RI en células SiHa

Como se observa en la Figura 10, la sobrevivencia celular de la línea SiHa se redujo de manera dosis dependiente ya que a una mayor dosis se aprecia una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia celular, es decir, que a partir de los 2Gy y en adelante hay una disminución en el número de colonias con respecto a las células que no fueron irradiadas (Figura 10a y 10b). Para corroborar estos resultados se determinó la “fracción de sobrevivencia” mediante la siguiente ecuación $Y = \exp(-1*(A*X + B*X^2))$ en el programa Sigma Plot ya que este parámetro permite evaluar la tasa de supervivencia celular después de una dosis de radiación. Y los resultados también demostraron el mismo comportamiento una disminución de la fracción de sobrevivencia de manera dosis-dependiente. Con base en este cálculo de la fracción de sobrevivencia determinamos la DL20 y DL50 de radiación ionizante en células SiHa. Las dosis fueron las siguientes 1Gy y 2.7 Gy, respectivamente (Tabla 3).

a)



b)



c)

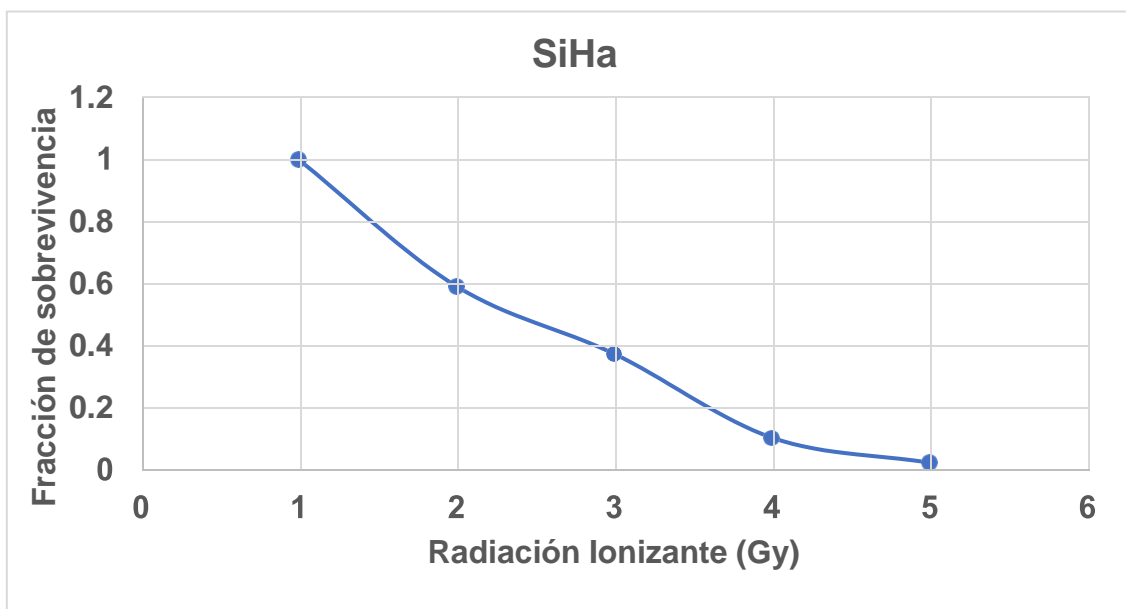


Figura 10. Efecto de la radiación ionizante en células SiHa. a) ensayo clonogenico de células SiHa después la exposición a diferentes dosis de radiación gamma con el equipo BioBeam y después de 11 días de incubación. b) El porcentaje de supervivencia celular fue determinado mediante el número de colonias con respecto a la Eficiencia de Plaqueo (PE). c) Gráfica de la Fracción de Supervivencia a partir de la ecuación $Y = \exp(-1*(A*X + B*X^2))$ en el programa Sigma Plot y en donde fueron determinadas la DL20 y DL50.

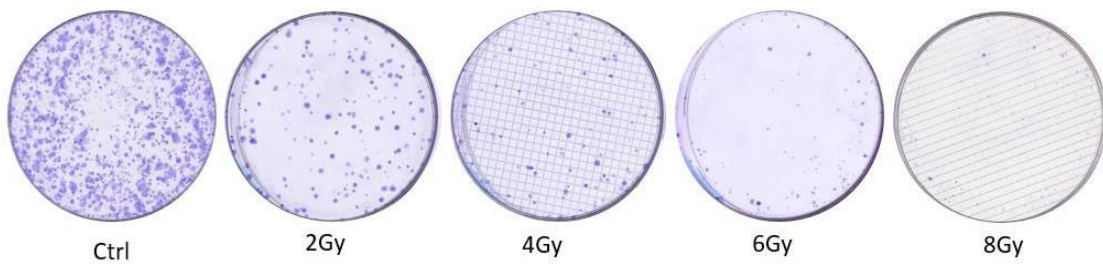
Determinación de la DL20 y DL50 de la radiación ionizante en células HeLa

A continuación, como se muestra en la Figura 11 en las células HeLa la supervivencia celular disminuyó significativamente de manera dosis dependiente, ya que a una mayor dosis de radiación hay una mayor disminución del porcentaje de supervivencia celular, así como también en el número de colonias con respecto a las células que no fueron irradiadas (Figura 11a y 11b). Para confirmar estos resultados a continuación se determinó la “fracción de supervivencia” (Figura 11 c) mediante la ecuación mencionada anteriormente y los resultados fueron similares.

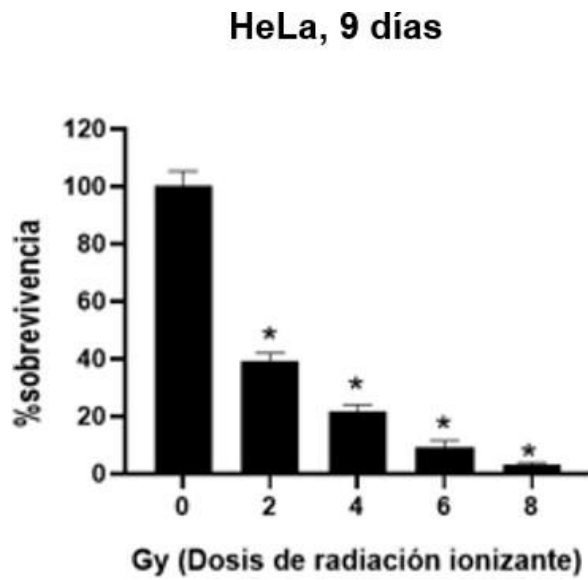
Con base en este cálculo se obtuvieron las concentraciones correspondientes a las DL20 y DL50 las cuales corresponden a las siguientes dosis 0.5 Gy y 1.7 Gy, respectivamente (ver Tabla 3).

Estos resultados demostraron que la DL 20 en células HeLa es 2 veces menor que la calculada en las células SiHa, mientras que para la DL50 resulta ser 1Gy mayor de la obtenida en células HeLa.

a)



b)



c)

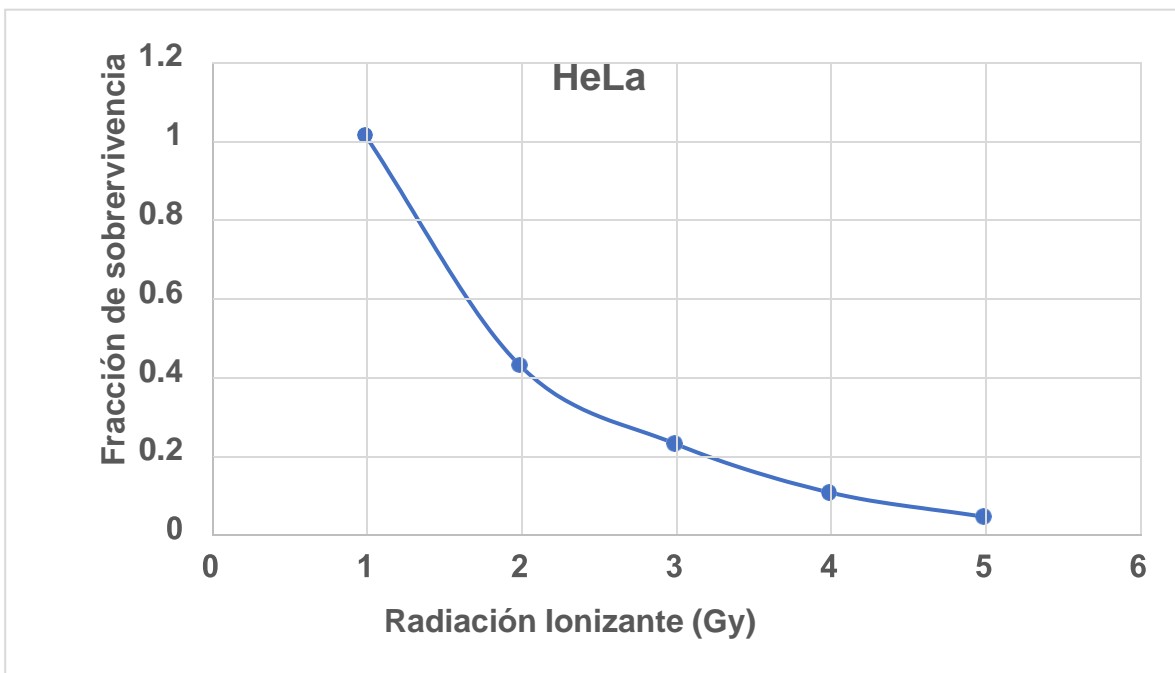


Figura 11. Efecto de la radiación en células HeLa. a) ensayo clonogénico de células HeLa después la exposición a diferentes dosis de radiación gamma con el equipo BioBeam y después de 9 días de incubación. b) El porcentaje de sobrevivencia celular fue determinado mediante el número de colonias con respecto a la Eficiencia de Plaqueo (PE). c) Gráfica de la Fracción de Sobrevivencia

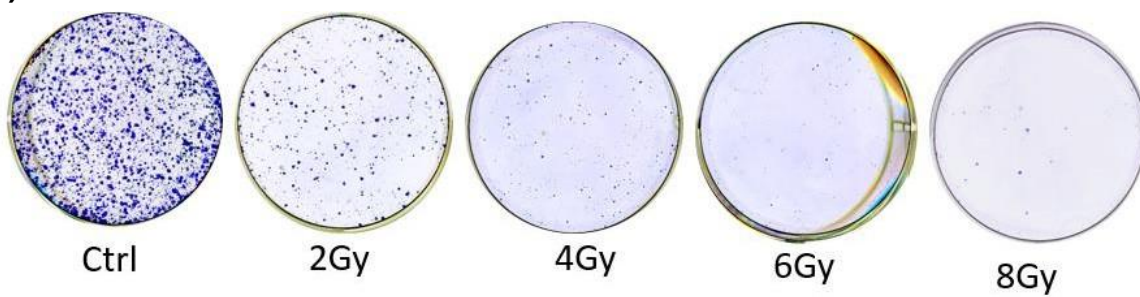
a partir de la ecuación $Y = \exp(-1*(A*X + B*X^2))$ en el programa sigma plot y en donde fueron determinadas la DL20 y DL50.

Determinación de la DL20 y DL50 de la radiación ionizante en células C33a

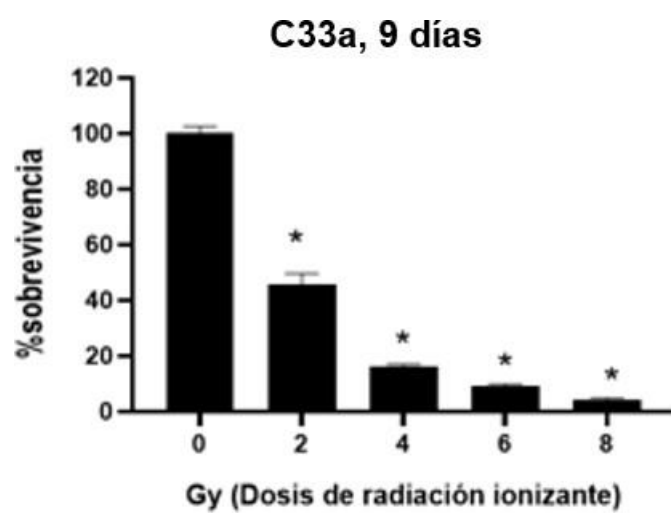
También repetimos el mismo procedimiento para la línea celular C33a. El análisis de los resultados demostró que la sobrevivencia celular de la línea C33a disminuyó de manera dosis dependiente y al igual que las otras dos líneas celulares anteriores a una mayor dosis se aprecia una disminución significativa en el porcentaje de sobrevivencia celular también a partir de los 2Gy hasta 8Gy podemos observar una disminución en el número de colonias con respecto a las células que no fueron irradiadas (Figura 12a). A continuación, se determinó la “fracción de sobrevivencia” (Figura 12b) y se calcularon la DL20 y DL50 las cuales corresponden a las siguientes dosis 0.5 Gy y 1.6 Gy, respectivamente (Tabla 3).

Cabe resaltar que los valores obtenidos para las células Hela son muy parecidos a los obtenidos en las células C33a, en contraste con lo obtenido en la línea celular SiHa que resultó ser el doble de resistente para la DL20 y 1 Gy mayor para la DL50 que en las células C33a.

a)



b)



c)

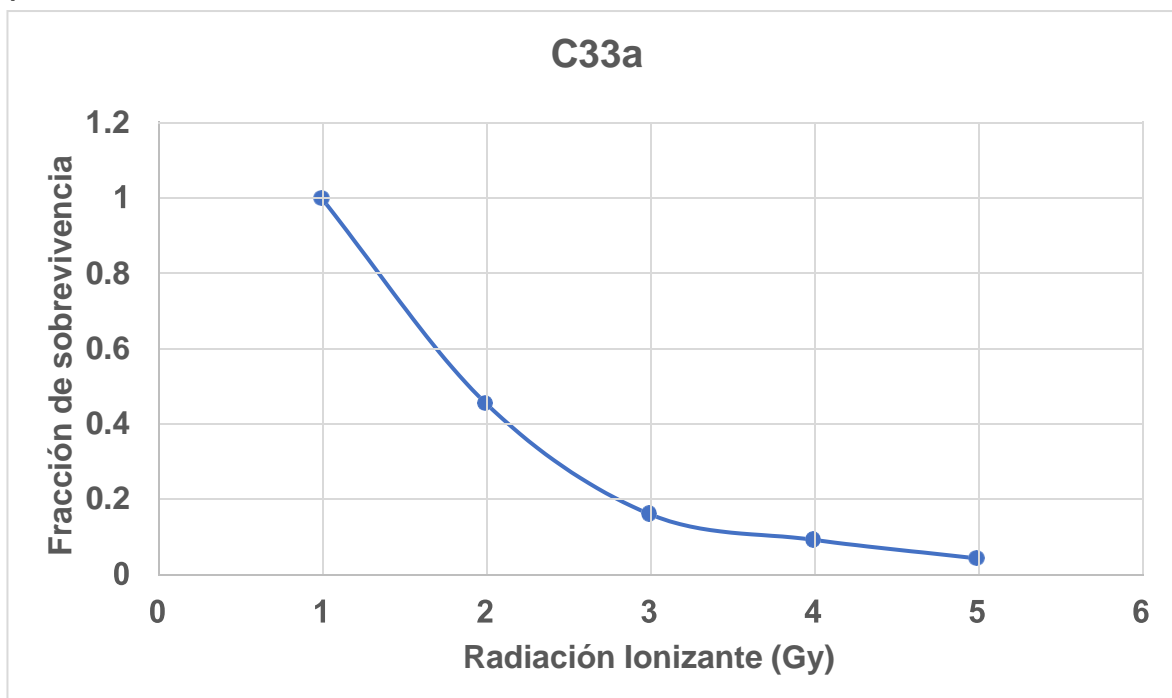


Figura 12. Efecto de la radiación en células C33a. a) ensayo clonogénico de células C33a después la exposición a diferentes dosis de radiación gamma con el equipo BioBeam y después de 9 días de incubación. b) El porcentaje de supervivencia celular fue determinado mediante el número de colonias con respecto a la Eficiencia de Plaqueo (PE). c) Gráfica de la Fracción de Supervivencia a partir de la ecuación $Y = \exp(-1*(A*X + B*X^2))$ en el programa sigma plot y en donde fueron determinadas la DL20 y DL50.

A continuación, se aprecia un cuadro comparativo de las DL calculadas en las tres líneas de cáncer cervicouterino, así como la diferencia entre los valores obtenidos.

	DL20	DL50
C33a	0.5Gy	1.6Gy
SiHa	1Gy	2.6Gy
HeLa	0.5Gy	1.7Gy

Tabla 3. Cuadro comparativo de las y DL previamente cada una de las líneas celulares de cáncer cervicouterino C33a, SiHa y HeLa.

Efecto de la combinación RSV y RI en líneas celulares de cáncer cervicouterino.

Después de determinar las IC20 e IC50 de RSV y las DL20 y DL50 de radiación ionizante se evaluó el efecto de RSV como radiosensibilizador en las líneas celulares HeLa, SiHa y C33a.

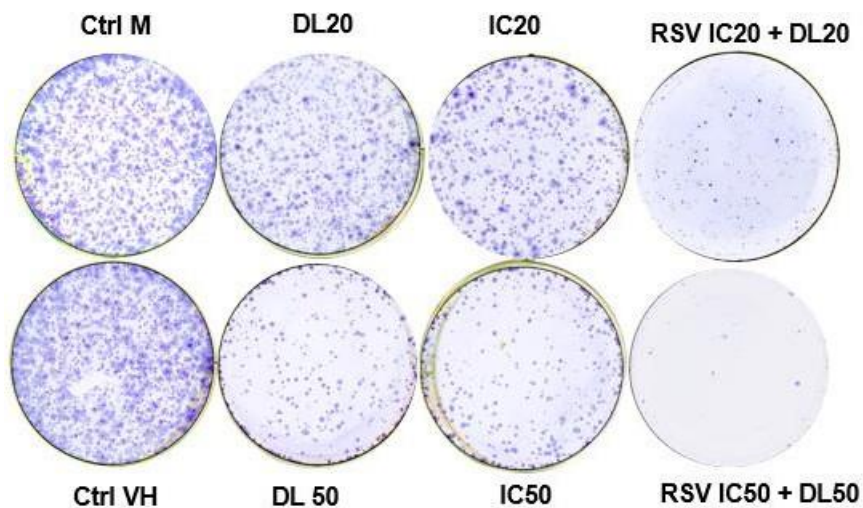
Efecto del RSV en combinación con RI en la línea celular SiHa.

A continuación, se analizó el efecto del RSV como sensibilizador a la RI en células SiHa. Como se muestra en la Figura 13a y 13b el porcentaje de la sobrevivencia celular y el número de colonias en la línea SiHa tratada con la combinación RSV+RI disminuyó de manera significativa en comparación con las células expuestas a cada uno de los tratamientos de manera individual.

Cabe resaltar que el tratamiento combinado de la IC20 de RSV+la DL20 de RI (55.2 μ M + 1Gy, respectivamente) disminuye el porcentaje de la sobrevivencia celular hasta un 40%, mientras que el tratamiento donde se aplicó la combinación IC50 de RSV+la DL50 de RI (142 μ M + 2.6 Gy, respectivamente) el efecto fue mayor como se observa en la Figura 13b el porcentaje de la sobrevivencia disminuyó hasta el 25%.

Con respecto a la combinación IC20-RSV+DL20-RI se puede observar que el efecto sensibilizador de RSV disminuye hasta 2 veces más que en las células con tratamiento individual. Mientras que en las células expuestas a la combinación IC50-RSV+DL50-RI disminuye hasta a la mitad el efecto comparado con las dosis individuales (Figura 13b).

a)



b)

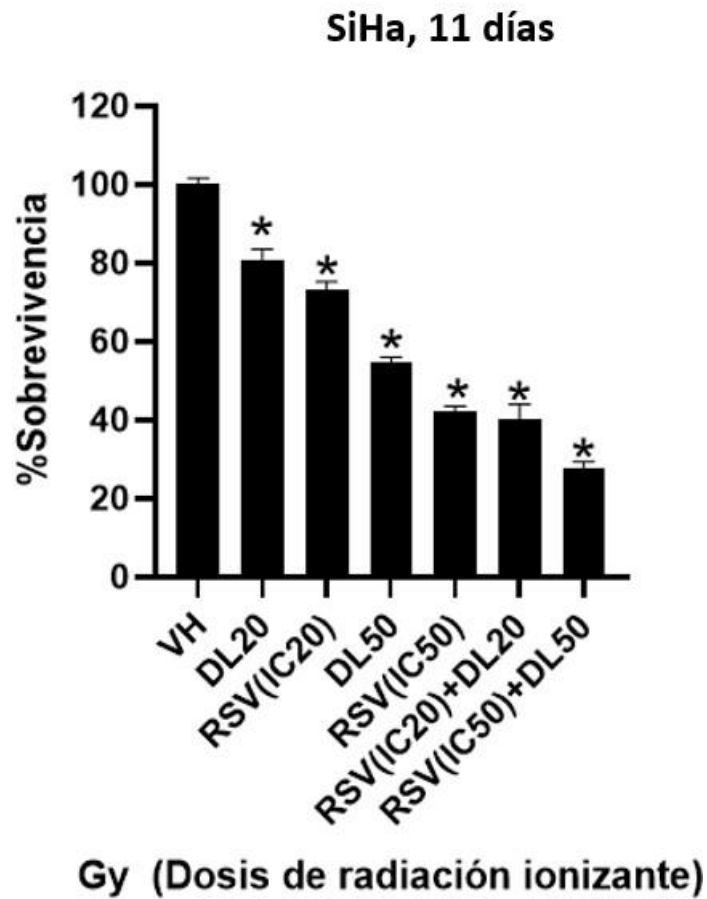


Figura 13. Efecto radiosensibilizador del RSV en la línea celular SiHa. a) Ensayo clonogénico de células SiHa tratadas 48 hrs con Resveratrol en combinación con RI, las células se incubaron por 11 días. b) Gráfica del porcentaje de la sobrevivencia con respecto de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células: Control Vehículo (VH), Dosis Letal 20 (DL20), RSV Concentración Inhibitoria 20 (RSV (IC20) (55.2 μ M +1Gy), Dosis Letal 50 (DL50), RSV Concentración Inhibitoria 50(RSV(IC50) (142 μ M + 2.6 Gy), y las combinaciones de RSV+ Radiación Ionizante 20 y 50 respectivamente.

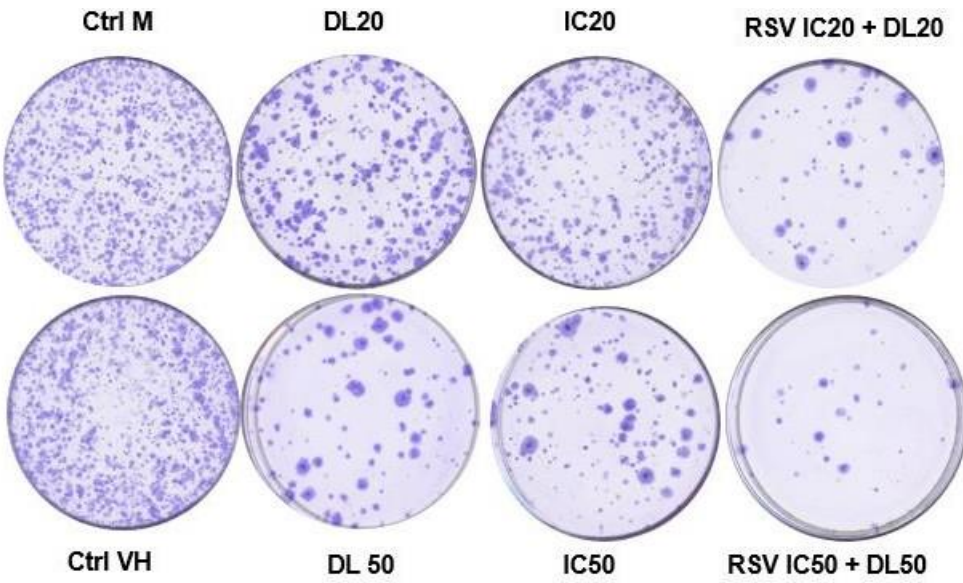
Efecto del RSV en combinación con radiación ionizante en la línea celular HeLa

Posteriormente, analizamos el efecto del RSV como radiosensibilizador en la línea celular HeLa. Como se puede observar en la Figura 14a y 14b, el número de colonias y el porcentaje de la sobrevivencia celular disminuyeron de manera significativa en las células HeLa con la combinación RSV+RI en comparación con las células expuestas a cada uno de los tratamientos de forma individual.

Con respecto a el tratamiento con la IC20-RSV+DL20-RI (21.8 μ M +0.5Gy, respectivamente) se puede observar de manera más evidente que el porcentaje de la sobrevivencia celular disminuye hasta un 50% mientras que con el tratamiento IC50-RSV+DL50-RI (98 μ M + 1,7 Gy, respectivamente) el efecto fue mucho mayor y más efectivo como se observa en la Figura 14a y 14b debido a que el porcentaje de la sobrevivencia celular disminuyó hasta el 18%. Cabe resaltar que esta combinación disminuyó más del doble que con los tratamientos individuales.

Así mismo, observamos que la combinación IC20+DL20 fue más efectiva en las células SiHa en comparación con la línea HeLa.

a)



b)

HeLa, 9 días

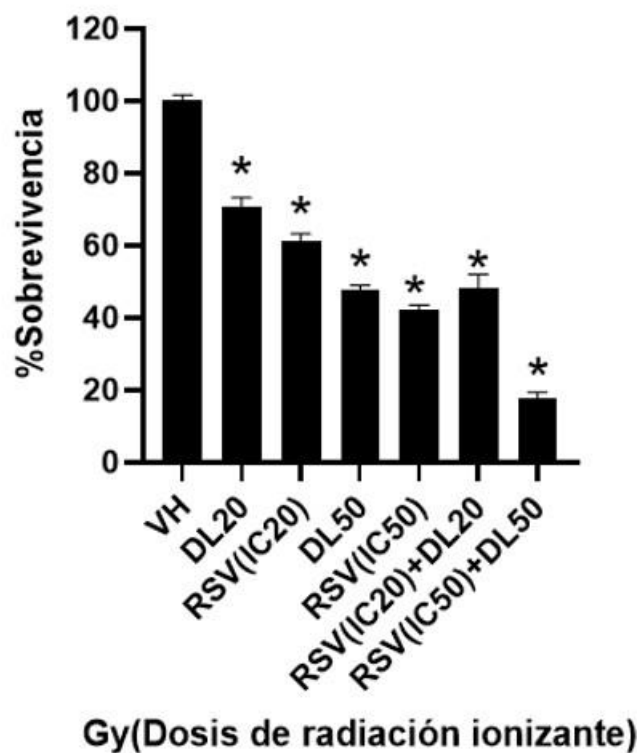


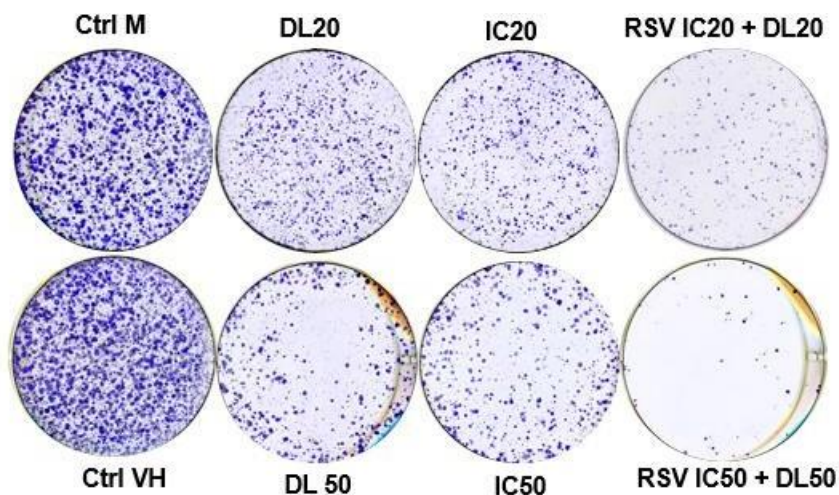
Figura 14. Efecto radiosensibilizador del RSV en la línea celular HeLa. a) Ensayo clonogénico de células HeLa tratadas 48 hrs con Resveratrol en combinación con RI, las células se incubaron por 9 días. b) Gráfica del porcentaje de la sobrevivencia con respecto de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células previamente: Control Vehículo (VH), Dosis Letal 20 (DL20), RSV Concentración Inhibitoria 20 (RSV (IC2021.8 μ M + 0.5 Gy), Dosis Letal 50 (DL50), RSV Concentración Inhibitoria 50 (RSV IC5098 μ M + 1.7 Gy), y las combinaciones de RSV+ RI 20 y 50 respectivamente.

Efecto del RSV en combinación con radiación ionizante en la línea celular C33a

Finalmente se realizó el análisis del efecto de la combinación RSV y RI en células C33a y cómo podemos observar en la Figura 15a y 15b el porcentaje de la sobrevivencia celular disminuyó de manera significativa en comparación con las células expuestas a cada uno de los tratamientos de manera independiente. Cabe resaltar que el tratamiento con la IC20-RSV+DL20-RI (20 μ M + 0.5Gy, respectivamente) disminuye hasta un 50% el porcentaje de la sobrevivencia celular mientras que con el tratamiento donde se aplicó la IC50-RSV+DL50-RI (90 μ M + 1.6 Gy, respectivamente) el efecto fue mucho mayor pues como se observa en la Figura 15b el porcentaje de la sobrevivencia disminuyó hasta el 15%.

En esta línea celular se puede apreciar que el efecto del RSV con la combinación IC20-RSV+ DL20-RI fue similar al observado en las células HeLa. En cuanto al tratamiento IC50-RSV+DL50-RI observamos una mayor efectividad del RSV ya que el porcentaje de la sobrevivencia celular se redujo hasta 2 veces más, similar a lo observado en las células HeLa (Figura 15b).

a)



b)

C33a, 9 días

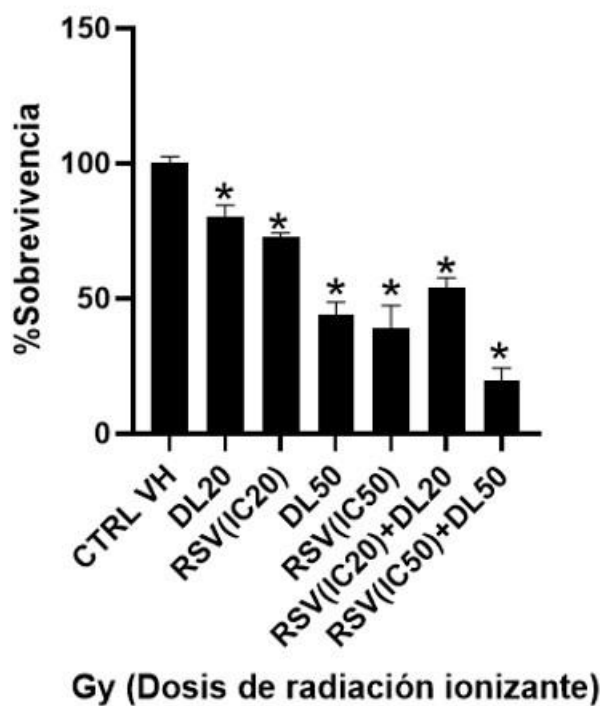


Figura 15. Efecto radiosensibilizador del RSV en la línea celular C33a. a) Ensayo clonogénico de células C33a tratadas 48 hrs con Resveratrol en combinación con RI, las células se incubaron

por 9 días. b) Gráfica del porcentaje de la sobrevivencia con respecto de los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células previamente: Control Vehículo (VH), Dosis Letal 20 (DL20), RSV Concentración Inhibitoria 20 (RSV(IC20) (20 μ M + 0.5 Gy), Dosis Letal 50 (DL50), RSV Concentración Inhibitoria 50(RSV(IC50) (90 μ M + 1.6 Gy), y las combinaciones de RSV+ Radiación ionizante 20 y 50 respectivamente. Se realizó en un gel de acrilamida al 12%.

Efecto del resveratrol sobre los niveles de la proteína KU80

Por otro lado, para tratar de determinar el mecanismo por el cual el RSV podría estar actuando como radiosensibilizador se analizaron los niveles de la proteína Ku80 en la línea celular SiHa. Los resultados demostraron una disminución de los niveles de la proteína Ku80 después del tratamiento con RSV-IC50 +DL50 (Figura 16).

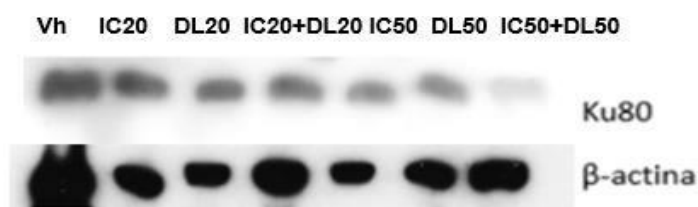


Figura 16- Expresión de la proteína KU80 en la línea celular SiHa. Se obtuvieron extractos proteicos de la línea celular SiHa de diferentes tratamientos (control vehículo, IC20 (55.2 μ M) DL20 (1 Gy), combinación de IC20 más Radiación ionizante DL20, IC50 (141 μ M) , DL50 (2.6 Gy) y la combinación de la IC50 más la radiación ionizante DL50 correspondientemente). Como control de carga se utilizó a la proteína β -actina. Se realizó en un gel de acrilamida al 12%.

Discusión

En este estudio se analizó el efecto del RSV como posible radiosensibilizador en las líneas celulares de cáncer cervicouterino SiHa, HeLa y C33a.

Nuestros resultados demostraron que la línea celular SiHa es la más resistente a RSV. Este resultado podría asociarse con investigaciones previas en donde se ha reportado que la proteína NF-kB (factor de transcripción nuclear kappa-B) se encuentra sobre expresada en células SiHa, y se sabe que esta proteína es capaz de regular genes involucrados en la sobrevivencia celular y también en la inhibición de apoptosis. Otro estudio reportó que el tratamiento con RSV sensibiliza a las células NCI-H838 de cáncer de pulmón a radiación ionizante, de manera dependiente de la inhibición de NF-kB, así como también el arresto del ciclo celular en la fase S (Hui-Fen Liao et al., 2005). Por lo que este mecanismo podría ser una de las razones por las que se observó la resistencia a radiación ionizante y RSV en células SiHa (García *et al.*, 2013).

Previamente se ha reportado que las células SiHa son resistentes a apoptosis debido a la baja expresión de la caspasa 8, así como de la proteína Bid que recae en la falta de activación de la caspasa 9 (Brigitte M T Hougardy et al; 2006), lo cual también podría ayudar a explicar porque esta línea celular es más resistente al tratamiento con RSV y a la radiación ionizante

Con respecto a la disminución de la viabilidad celular con RSV observada en las tres líneas celulares de cáncer cervicouterino se podría relacionar con algunos de los siguientes mecanismos. Uno de los principales mecanismos que podría explicar

el efecto del RSV sobre la viabilidad celular fue reportado en células de cáncer de mama y cáncer colorrectal y se asocia con la inhibición de los marcadores de supervivencia, p38-MAPK / c-Myc y la detención del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S; sin embargo, hacen falta más experimentos para demostrar si estas proteínas están implicadas en la disminución de la viabilidad celular en nuestro modelo (Justin Lucas et al., 2018).

Por otro lado, también se observó que el RSV tiene la capacidad de inhibir la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl, en células HeLa y por consiguiente es capaz de inducir apoptosis. También se observó que RSV induce los niveles de P53 y con ello desencadenar la apoptosis celular mediante la activación de la caspasa 9. (Lin Li; et al 2018) lo cual podría explicar el efecto radiosensibilizante del RSV en la línea celular HeLa en nuestros resultados, no obstante, quedaría por analizar los niveles de estas proteínas en nuestro modelo de estudio.

Otros autores han reportado que un compuesto vegetal derivado de la planta *Annona coriácea* el cual es un polifenol al igual que el RSV, fue capaz de disminuir la viabilidad de células SiHa y HeLa mediante el aumento de p21 y por ende la detención del ciclo celular G2/M. Este compuesto también induce un incremento en los niveles de fosforilación de H2AX y por lo tanto en el induce de daño al DNA (Izabela N Faria Gomes et al., 2019). Sin embargo, en nuestro estudio está pendiente analizar los niveles de daño al DNA mediante la activación de H2AX para poder asociar este antecedente con nuestros resultados.

Con respecto a las células C33a se ha reportado que son más sensibles a la radiación ionizante que las células HeLa y SiHa, estos autores han reportado una DL50 de 2 Gy, similar a la que determinamos en nuestros resultados. En este estudio sugieren que este efecto podría deberse a los niveles basales de AKT, los cuales son más bajos en las líneas celulares resistentes a la radiación como SiHa y HeLa. AKT es una serina/treonina quinasa con un papel clave en la vía de señalización PI3K/AKT que regula diversas funciones como la supervivencia celular, proliferación y apoptosis (Saxena et al., 2009 y Ya-Hui Chen., et al 2021).

Por otro lado, uno de los mecanismos propuestos para tratar de explicar la radiorresistencia en células de cáncer cervicouterino es la sobreexpresión del receptor de hormona tiroidea (TRIP4) la cual ejerce efectos pro-tumorigénicos, y se ha visto que su silenciamiento es capaz de aumentar la sensibilidad a la radiación ionizante, por lo que sería interesante analizar si el RSV es capaz de inhibir a TRIP4 (Yilin Che et al., 2019)

Estos antecedentes podrían explicar las diferencias en la tasa de supervivencia celular que observamos en las líneas celulares SiHa, HeLa y C33a después del tratamiento con RSV.

Finalmente, en este trabajo también se observó una disminución en los niveles de la proteína KU80 con el tratamiento RSV IC50+RI DL50 en células SiHa., lo cual podría sugerir que RSV está inhibiendo a la proteína KU80, la cual a su vez puede bloquear su actividad en la vía de reparación NHEJ favoreciendo la acumulación de

daño al DNA y finalmente la muerte celular; sin embargo, más estudios son necesarios para comprobar este mecanismo.

De manera interesante, se ha reportado que la sobreexpresión de KU80 está asociada con radiorresistencia en células tumorales; además se ha reportado la sobreexpresión de KU80 hasta en el 70% de las células tumorales de pacientes con cáncer cervicouterino, por lo que esta proteína puede estar involucrada en la radioresistencia de este tipo de neoplasia y podría ser un blanco terapéutico, donde el RSV puede ser un candidato para sensibilizar a las células del CaCu (Vallín-Delgado et al., 2019).

Cabe resaltar que es posible que la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga también este involucrada en la radiosensibilización mediada por el RSV ya que un trabajo previo demostró que el RSV disminuye los niveles de las proteínas ATM y RAD51 (León I., et al. 2013).

Conclusión

Nuestros resultados demuestran que las células de cáncer cervicouterino a pesar de tener similitudes entre sí responden de manera diferente al RSV y la radiación ionizante. A pesar de ello, el RSV mostro un efecto sensibilizador a la radiación ionizante en todas las líneas de cáncer cervicouterino.

A su vez, la disminución de la proteína KU80 en la línea celular SiHa nos sugiere que la vía NHEJ puede estar involucrada en el efecto radiosensibilizador del RSV. Sin embargo, no se descarta que la vía de reparación por recombinación homologa también este involucrada en este proceso.

REFERENCIAS

1. American Cancer Society (2017, 30 junio). Cervical Cancer. What is cervical cancer? American Cancer Society.
2. Aparicio T., Richard Baer, Jean Gautier. (2014). DNA double-strand break repair pathway choice and cancer, *DNA Repair*. 19, 169-175.
3. Araldi, I. C ,Isabel Cristina da Costa., Bordin, F., Cadoná, F. C., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Teixeira, C. F., Baumhardt, T., da Cruz, I., Duarte, M., & Bauermann, L. F. (2018). The in vitro radiosensitizer potential of resveratrol on MCF-7 breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, 282, 85–92.
4. Arévalo B., Arturo Raúl, Arévalo Salazar, Dory E., & Villarroel Subieta, Carlos J.. (2017). Cervical Cancer. *Revista Médica La Paz*, 23(2),
5. Arianna Yglesias-Rivera, Hermis Rodríguez-Sánchez, Alexis Díaz-García. (2019) Synergistic effect of *Rhopalurus junceus* scorpion venom combined with conventional cytostatics in cervical cancer cell line HeLa. Research Department, Laboratories of Biopharmaceuticals and Chemistries Productions. 56, 175.
6. Ashrafizadeh, M., Taeb, S., Haghi-Aminjan, H., Afrashi, S., Moloudi, K., Musa, A. E., Najafi, M., & Farhood, B. (2020). Resveratrol as an Enhancer of Apoptosis in Cancer: A Mechanistic Review. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, .
7. Assad, D. X., Borges, G. A., Avelino, S. R., & Guerra, E. (2018). Additive cytotoxic effects of radiation and mTOR inhibitors in a cervical cancer cell line. *Pathology, research and practice*, 214(2), 259–262.

8. Atienzar N., Camacho-Alonso, F., & Lopez-Jornet, P. (2014). Effects of resveratrol and irradiation upon oral squamous cell carcinoma cells. *Acta odontologica Scandinavica*, 72(7), 481–488
9. Baatout, S., Derradji, H., Jacquet, P., Ooms, D., Michaux, A., & Mergeay, M. (2004). Enhanced radiation-induced apoptosis of cancer cell lines after treatment with resveratrol. *International journal of molecular medicine*, 13.
10. Centro Nacional de Equidad de Género y Salud reproductiva (2018, 21 julio). Introducción al Cáncer de Cuello Uterino. Gobierno de México.
11. Cetina, Talia Wegman¹, Alicia García-Arias¹, Myrna Candelaria¹, Alfonso Dueñas-González. (2006). Radiosensitizers in cervical cancer. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. 1-5.
12. Chen YA, Lien HM, Kao MC, Lo UG, Lin LC, et al. (2017) Sensitization of radioresistant prostate cancer cells by resveratrol isolated from stems of *Arachis hypogaea*, 18,19.
13. Chauhan, N., Maher, D. M., Hafeez, B. B., Mandil, H., Singh, M. M., Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2019). Ormeloxifene nanotherapy for cervical cancer treatment. *International journal of nanomedicine*, 14, 7107–7121.
14. Ganguly, N., & Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of biosciences*, 34(1), 113–123.

15. Gambini, J., Grueso- López, R., González- Olaso, G., Inglés, M., Abdelazid, K., Alami, M. E., Costa- Bonet, V., Borrás, C., Viña J. (2013). Resveratrol: distribution, properties and perspectives. *Revista Española de Geriátria y Gerontología* 48 (2): 79-88.
16. García-Zepeda, S. P., García-Villa, E., Díaz-Chávez, J., Hernández-Pando, R., & Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(6), 577–584.
17. Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 a012740.
18. Kakarougka eTan., Wei, X., Zhang, W., Wang, X., Wang, K., Du, B., & Xiao, J. (2017). Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1. *Oncology reports*, 37(3), 1833–1841.
19. Kma L. (2013). Synergistic effect of resveratrol and radiotherapy in control of cancers. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 14(11), 6197–6208.
20. Kristoffer Davidson, K. T., Zhu, Z., Bai, Q., Xiao, H., Wakefield, M. R., & Fang, Y. (2019). Blueberry as a Potential Radiosensitizer for Treating Cervical Cancer. *Pathology oncology research: POR*, 25(1), 81–88.
21. León-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., 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 prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 22(1), 11–20.

22. Martin, OA y Martin, RF (2020). Cancer radiotherapy: understanding the Price of tumor eradication. *Frontiers in cell and developmental biology*. 261.
23. Mikami, S., Ota, I., Masui, T., Uchiyama, T., Okamoto, H., Kimura, T., Takasawa, S., & Kitahara, T. (2019). Resveratrol-induced REG III expression enhances chemo- and radiosensitivity in head and neck cancer in xenograft mice. *Oncology reports*, 42, 436–442.
24. Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer*, 10(8), 550–560.
25. Rassool, F. V., & Tomkinson, A. E. (2010). Targeting abnormal DNA double strand break repair in cancer. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(21), 3699–3710.
26. Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition* 130 (supl (S): 2073S-2085S.
27. Tak, J. K., Lee, J. H., & Park, J. W. (2012). Resveratrol and piperine enhance radiosensitivity of tumor cells. *BMB reports*, 45(4), 242–246.
28. Tan, Y., Wei, X., Zhang, W., Wang, X., Wang, K., Du, B., & Xiao, J. (2017). Resveratrol enhances the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by downregulating E2F1. *Oncology reports*, 37(3), 1833–1841.
29. Vendrely, V., Amintas, S., Noel, C., Moranvillier, I., Lamrissi, I., Rousseau, B., Coulibaly, S., Bedel, A., Moreau-Gaudry, F., Buscail, E., Chiche, L., Belleannée, G., Dupin, C., & Dabernat, S. (2019). Combination treatment of resveratrol and capsaicin radiosensitizes pancreatic tumor cells by unbalancing DNA repair response to radiotherapy towards cell death. *Cancer letters*, 451, 1–10.

30. Lucas, J., Hsieh, T., Halicka, H., Darzynkiewicz, Z., & Wu, J.M. (2018). Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs through HDAC3/p300- mediated NF- κ B signaling. *International Journal of Oncology*, 53, 1469-1480.
31. Benedetti, Inés, & Reyes, Niradiz. (2015). Epithelial – Mesenchymal Transition in the progression of prostatic adenocarcinoma. *Iatreia*, 28(4), 420-433.
32. Filippova, M., Filippov, V., Williams, V. M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkirova, S., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Cellular levels of oxidative stress affect the response of cervical cancer cells to chemotherapeutic agents. *BioMed research international*, 2014, 574659
33. Hougardy BM, van der Zee AG, van den Heuvel FA, Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Sensitivity to Fas mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship to Fas, Caspase-8, and Bid. *Gynecol Oncol*. 2005 May ;97(2):353-64.
34. Liao, H. F., Kuo, C. D., Yang, Y. C., Lin, C. P., Tai, H. C., Chen, Y. Y., & Chen, Y. J. (2005). Resveratrol enhances radiosensitivity of human non-small cell lung cancer NCI-H838 cells accompanied by inhibition of nuclear factor-kappa B activation. *Journal of radiation research*, 46(4), 387–393.
35. Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., & Weinstein, I. B. (2002). Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(3), 893–903.

36. Jiang, Y., Luo, W., Wang, B., Wang, X., Gong, P., & Xiong, Y. (2020). Resveratrol promotes osteogenesis via activating SIRT1/FoxO1 pathway in osteoporosis mice. *Life sciences*, 246, 117422.
37. Elshaer, M., Chen, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2018). Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life sciences*, 207, 340–349.
38. Koraneekit, A., Limpaboon, T., Sangka, A., Boonsiri, P., Daduang, S., & Daduang, J. (2018). Synergistic effects of cisplatin-caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells via the mitochondrial pathways. *Oncol Lett*, 15(5), 7397–7402.
39. Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón-Andalón, V., & Aguilar-Lemarrroy, A. (2015). Modulation of apoptosis by human papillomavirus. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53 Suppl 2, S200–S205.
40. Chen, Y. H., Yang, S. F., Yang, C. K., Tsai, H. D., Chen, T. H., Chou, M. C. y Hsiao, Y. H. (2021). Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. 23(1), 88.
41. Mingxin Zhang, Chao Zhou, Wei Wang, Haihua Yang, Wenguang Ye, The role of epithelial-mesenchymal transition in regulating radioresistance, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, Volume 150, 2020.
42. Zhang, L., Zhou, J., Qin, X., Huang, H. y Nie, C. (2019). Astragaloside IV inhibits the invasion and metastasis of SiHa cervical cancer cells via the TGF- β 1-mediated PI3K and MAPK pathways. *Oncology Reports*, 41, 2975-2986.

43. Delgado, Eder & Martínez, Sara & Cabral, Alejandro. (2020).. Review: Radioresistance genes in locally advanced cervical-uterine cancer. *Lux Medical*.15. 35-47. 10.33064/43lm20202498.
44. León-Galicia, I., Díaz-Chávez, J., García-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., Álvarez-Ríos, E., García-Mena, J., & Gariglio, P. Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention: January 2013 - Volume 22 - Issue 1*.
45. Filippova, M., Filippov, V., William, V, M., Zhang, K., Kokoza, A., Bashkirova, 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.
46. Li, L., Qiu, R. L., Lin, Y., Cai, Y., Bian, Y., Fan, Y., & Gao, X. J. (2018). Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncology Letters* 15, 9845-9851.
47. Gomes, I., Silva-Oliveira, R. J., Oliveira Silva, V. A., Rosa, M. N., Vital, P. S., Barbosa, M., Dos Santos, F. V., Junqueira, J., Severino, V., Oliveira, B. G., Romão, W., Reis, R. M., & Ribeiro, R. (2019). *Annona coriacea* Mart. Fractions Promote Cell Cycle Arrest and Inhibit Autophagic Flux in Human Cervical Cancer Cell Lines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(21), 3963.

48. Lim, J. W., Kim, H., & Kim, K. H. (2002). Expression Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and ciclooxigenase-2 is related to la proliferation of human gastric cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), 46093–46100.
49. Saxena, A., Yashar, C., Taylor, D. D. & Gercel-Taylor, C. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 1399–1403 (2005).
50. Che, Y., Li, Y., Zheng, F., Zou, K., Li, Z., Chen, M., Hu, S., Tian, C., Yu, W., Guo, W., Luo, M., Deng, W., & Zou, L. (2019). TRIP4 promotes tumor growth and metastasis and regulates radiosensitivity of cervical cancer by activating MAPK, PI3K/AKT, and hTERT signaling. *Cancer Letters*, págs. 452, págs. 1–



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00047

Matrícula: 2202800620

Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño a DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ
DRA. SAE MUÑIZ HERNANDEZ
DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANDREA TORRES ACOSTA

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

Aprobado

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



ANDREA TORRES ACOSTA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ

VOCAL

DRA. SAE MUÑIZ HERNANDEZ

VOCAL

DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ

SECRETARIO

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 09/08/2022

Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL de la alumna ANDREA TORRES ACOSTA, matrícula 2202800620, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha diez de agosto del 2022 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

Efecto del resveratrol como radiosensibilizador en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la inhibición de las vías de reparación de daño a DNA por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ)

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

Aprobar

JURADO

Presidente

DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ

Secretario

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

Vocal

DRA. SAE MUÑOZ HERNANDEZ

Vocal

DR. CARLO CESAR CORTES GONZALEZ