

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis del efecto del resveratrol como quimiosensibilizador
en líneas celulares de cáncer cervicouterino a través de la
inhibición de la vía de reparación NHEJ”**

T E S I S

Que presenta

BIÓL. EXP. AQUETZALLI MARINA ARENAS HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis

DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL

DR. JOSÉ DE LA LUZ DÍAZ CHÁVEZ

Ciudad de México

JUNIO, 2023

ASESORES

DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ CRUZ

Investigador CINEVESTAV 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINEVESTAV-IPN, Zacatenco

roberm@cinvestav.mx

DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

Investigador CINEVESTAV 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINEVESTAV-IPN, Zacatenco

egarrido@cinvestav.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto (CVU: 830539).

Al Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, Zacatenco por permitirme realizar mis estudios de maestría dentro del programa; y a todos mis profesores por sus enseñanzas y colaboración para mi formación.

De igual manera, agradezco a mis tutores, los doctores José De La Luz Díaz Chávez y Patricio Gariglio por todas sus enseñanzas, la asesoría brindada, su paciencia y comprensión; así como el apoyo y tiempo dedicado a mí y al proyecto.

A mis asesores, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y al Dr. José Efraín Garrido Guerrero por sus consejos y recomendaciones durante el desarrollo del proyecto, así como el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A la Unidad de Microscopía del Instituto Nacional de Cancerología - INCan Mexico, RAI, UNAM - Advanced Microscopy Applications Unit (ADMIRA), RRID:SCR_022788 y al Dr. Alejandro López Saavedra por sus enseñanzas, apoyo y paciencia.

A la Dra. Guadalupe Domínguez por abrirme las puertas de su laboratorio y siempre estar dispuesta a ayudarme.

A Enrique García Villa por todos sus enseñanzas, consejos y recomendaciones.

A la maestra Clementina Castro por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A Gabriela Mora Macías en la coordinación académica por su buena disposición y todo el apoyo brindado durante la maestría.

A mi familia, amigos y compañeros de laboratorio por todo su apoyo durante la realización de este proyecto, sus enseñanzas y estar siempre para mí cuando los necesitaba.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN.....	18
El cuello uterino	18
Cáncer cervicouterino	20
VPH y cáncer cervicouterino	21
Prevención y detección de cáncer cervicouterino	27
Tratamiento contra cáncer cervicouterino	30
Cisplatino.....	35
Resistencia a cisplatino	37
Reparación de aductos causados por cisplatino	40
Reparación de Rupturas de Doble Hebra.....	41
Reparación por unión de extremos no homólogos	42
Resveratrol	44
ANTECEDENTES.....	52
JUSTIFICACIÓN	55
OBJETIVO GENERAL.....	55
OBJETIVOS PARTICULARES.....	55
HIPÓTESIS.....	55
METODOLOGÍA	56
Cultivo Celular	56
Curva de crecimiento celular en placas adherentes de 24 pozos.....	56
Comprobación de las ICs de resveratrol y cisplatino en placas adherentes de 24 pozos.....	57
Determinación de las ICs de cisplatino en placas adherentes de 24 pozos.....	58
Determinación de la IC50 de resveratrol para la línea celular CaSki en placas adherentes de	58
Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de cristal violeta	59
Tratamientos.....	59
Tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino.....	60
Western blot para medir los niveles de las proteínas Ku70 y Ku80	61

Extracción de ARN.....	62
Tratamiento con DNAsa I al ARN extraído.....	64
Síntesis de cDNA.....	64
qPCR.....	65
Inmunofluorescencia.....	66
Toma de imágenes por microscopía confocal.....	67
Sistema reportero para detección de reparación mediante NHEJ.....	67
Preparación de bacterias competentes.....	70
Transformación de bacterias Escherichia coli DH5alpha.....	70
Elaboración de banco de bacterias transformadas con el plásmido.....	71
Purificación de plásmidos a partir de bacterias transformadas.....	71
Comprobación de la identidad de los plásmidos mediante patrones de restricción.....	72
Purificación a mayor escala de plásmidos a partir de bacterias transformadas.....	74
Congelación de bacterias transformadas.....	75
RESULTADOS.....	76
Comprobación de las ICs de resveratrol y cisplatino en placas adherentes de 24 pozos.....	76
Determinación de las nuevas ICs de cisplatino.....	77
Determinación de las ICs de resveratrol y cisplatino en Células CaSki.....	80
Efecto del resveratrol sobre la expresión de las proteínas Ku70 y Ku80.....	83
Efecto del resveratrol y cisplatino sobre los niveles de mRNA y proteína de Ku70/Ku80 en células HeLa.....	85
Efecto del resveratrol sobre la localización de las proteínas de Ku70/Ku80 en células HeLa.....	89
Purificación y comprobación de la identidad de plásmidos del sistema reportero.....	92
DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIÓN.....	102
PERSPECTIVAS.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación esquemática del cuello uterino	18
Figura 2.	Ilustración microscópica del cérvix	20
Figura 3.	Infección por VPH a las células del cérvix	23
Figura 4.	Representación esquemática del genoma del VPH16	24
Figura 5.	Estructura del cisplatino	35
Figura 6.	Aductos que el cisplatino puede formar en el ADN.....	37
Figura 7.	Mecanismos de resistencia a cisplatino.....	40
Figura 8.	Vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).....	43
Figura 9.	Estructura de los dos isómeros de resveratrol	45
Figura 10.	Estructura general del sistema reportero.....	68
Figura 11.	Representación esquemática del funcionamiento del sistema reportero.. ...	69
Figura 12.	Comprobación de las ICs de resveratrol	77
Figura 13.	Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular C-33A	78
Figura 14.	Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular HeLa.....	79
Figura 15.	Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular SiHa.....	80
Figura 16.	Determinación de las ICs de cisplatino en la línea celular CaSki.....	81
Figura 17.	Determinación de la IC50 de resveratrol en la línea celular CaSki.	82
Figura 18.	Efecto del resveratrol sobre la expresión de proteína Ku70.	84
Figura 19.	Efecto del resveratrol sobre la expresión de proteína Ku80.	85
Figura 20.	Efecto del resveratrol sobre los niveles de mRNA de Ku70 en células HeLa ..	86
Figura 21.	Efecto del resveratrol sobre los niveles de mRNA de Ku80 en células HeLa ..	87
Figura 22.	Efecto del resveratrol sobre la proteína Ku70 en células HeLa	88
Figura 23.	Efecto del resveratrol sobre la proteína Ku80 en células HeLa.	89
Figura 24.	Efecto del resveratrol en combinación con la IC20 de cisplatino sobre la localización de Ku70 en células HeLa.....	90
Figura 25.	Efecto del resveratrol en combinación con la IC50 de cisplatino sobre la localización de Ku70 en células HeLa.....	91
Figura 26.	Efecto del resveratrol en combinación con la IC20 de cisplatino sobre la localización de Ku80 en células HeLa.....	91
Figura 27.	Efecto del resveratrol en combinación con la IC50 de cisplatino sobre la localización de Ku80 en células HeLa.....	92
Figura 28.	Purificación de plásmidos del sistema reportero	93

Figura 29. Comprobación de la identidad del plásmido con sistema
reportero. 94

Figura 30. Comprobación de la identidad del plásmido con la enzima para cortar al
sistema reportero. 95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Dosis reportadas previamente como IC50 de resveratrol y las IC20 e IC50 de cisplatino	58
Tabla 2.	Cantidad de cajas sembradas para cada experimento	60
Tabla 3.	Condiciones utilizadas para la síntesis de cDNA	65
Tabla 4.	Condiciones utilizadas para la qPCR	65
Tabla 5.	Primers utilizados para la PCR en tiempo real	66
Tabla 6.	Enzimas utilizadas para la digestión de los plásmidos purificados	73
Tabla 7.	Componentes para la digestión de plásmidos	73
Tabla 8.	Resumen de las ICs de resveratrol y cisplatino en las cuatro líneas celulares	83

RESUMEN

El cáncer cervicouterino es uno de los de los cánceres con mayor incidencia y letalidad en todo el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo como México. El cisplatino es uno de los fármacos más comúnmente utilizados para el tratamiento de este tipo de cáncer; sin embargo, es un fármaco no selectivo, es decir, elimina células cancerosas y sanas, por lo que los efectos secundarios que produce son graves y algunos irreversibles para los pacientes; además, muchos de los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento, por lo que necesitan dosis mayores. Dentro de los mecanismos moleculares que producen la resistencia a cisplatino, se encuentra la sobre activación de las vías de reparación de ADN, como la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés). En esta vía las proteínas Ku70 y Ku80 juegan un papel clave para la activación de la vía y el reclutamiento de las demás proteínas que participan en esta vía de reparación del ADN. Además, en diversos trabajos se ha reportado que Ku70/80 se encuentran sobre expresadas en varios tipos de cáncer, favoreciendo la resistencia a la terapia.

Por otro lado, el resveratrol es un compuesto natural que ha demostrado tener propiedades anticancerígenas; por ejemplo; el resveratrol ha demostrado funcionar como quimio y radio sensibilizador, en varios tipos de cáncer.

Por lo que, en este trabajo se planteó evaluar el efecto quimiosensibilizador del resveratrol al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de cáncer cervicouterino y si este efecto estaba relacionado con la actividad del fármaco sobre las proteínas Ku70/80 de la vía de reparación del ADN "NHEJ". De las 4 líneas celulares evaluadas, nosotros encontramos que, la más sensible a ambos fármacos fue la línea celular CaSki, seguida de C-33A, posteriormente HeLa y finalmente SiHa. También encontramos que resveratrol disminuye la expresión de Ku70 en C-33A y SiHa, y la de Ku80 en C-33A y HeLa. Además, en las células HeLa disminuye los niveles de ARN mensajero y proteína después del tratamiento de resveratrol solo y en combinación con cisplatino. Esto indicaría que resveratrol puede intervenir en la reparación del daño al DNA mediante la vía NHEJ en células de CaCu.

Palabras clave: Cáncer cervicouterino, Ku70/80, NHEJ, resveratrol, cisplatino.

ABSTRACT

Cervical cancer is one of the cancers with the highest incidence and lethality worldwide, especially in developing countries such as Mexico. Cisplatin is one of the most commonly used drugs for the treatment of this type of cancer; however, it is a non-selective drug; that is, cisplatin eliminates healthy and cancer cells, so the side effects it produces are serious, and some of them are irreversible for patients; in addition, many patients develop resistance to treatment, so they need higher doses. Between molecular mechanisms that produce cisplatin resistance, DNA repair pathways are over-activated, such as the Non-homologous end joining (NHEJ). In NHEJ, Ku70 and Ku80 proteins play a key role in activating the pathway and recruiting the other proteins of this mechanism. In addition, several studies have reported that Ku70/80 proteins are overexpressed in several cancer types favoring therapy resistance. On the other hand, resveratrol is a natural compound that has been demonstrated to have anti-cancer qualities, for example, resveratrol has been demonstrated to be a good chemosensitizer and radiosensitizer in several cancer type.

In this study, we propose to evaluate the chemosensitizer effect of resveratrol on cisplatin treatment in cervical cancer cell lines and whether this effect was related to the activity of resveratrol on Ku70/80 proteins of the NHEJ pathway. We found that of the four cell lines evaluated, the most sensitive cell line to both drugs was CaSki, followed by C-33A, HeLa, and SiHa. We also found that resveratrol treatment decrease the expression of Ku70 protein in C-33A and SiHa cell lines and the Ku80 expression in C33A and HeLa. Furthermore, in HeLa cells, there produces a dismiss in mRNA and protein levels after the treatment of resveratrol alone and in combination with cisplatin. This would indicate that resveratrol is able to intervene in the repair of DNA damage through the NHEJ pathway in cervical cancer cells.

Keywords: Cervical cancer, NHEJ, Ku70/80, resveratrol, cisplatin.

ABREVIATURAS

53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1 / Proteína de unión p53 supresora de tumores 1
AAHS	Amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate / Sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Alt-NHEJ	Alternative Non-homologous end joining pathway / Vía de reparación por unión de extremos no homólogos alternativa
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor / Receptor de hidrocarburos de Arilo
AP-1	Activator Protein 1 / Proteína activadora-1
APLF	Aprataxin And PNKP Like Factor / Factor similar a aprataxina y PNKP
AS04	Adjuvant System 04 / Sistema adyuvante 04
ASCT2	Neutral amino acid transporter 2 / Transportador de aminoácidos neutros 2
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated / Gen de la Ataxia-Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein / Proteína relacionada con ataxia-telangiectasia y Rad3
BAK1	BCL2 antagonist/killer 1 / Antagonista de BCL-2/Asesino 1
BamHI	Restriction endonuclease, type II, BamHI from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / Endonucleasa de restricción tipo II, BamHI de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BAX	BCL2 associated X / Proteína X asociada a BCL2
BCL2	B-cell lymphoma 2 / Célula B de Linfoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large / Célula B de Linfoma extragrande
BCRP	Breast cancer resistance protein / Proteína resistente al cáncer de mama
BER	Base excision repair pathway / Vía de reparación por escisión de bases
BglII	Restriction endonuclease, Type II, BglII from <i>Bacillus subtilis</i> / Endonucleasa de restricción tipo II, BglII de <i>Bacillus subtilis</i>

BIM	Bcl-2-like protein 11 / Proteína similar a Bcl-2 11
BRCA1/2	Breast Cancer Type 1/2 susceptibility protein / Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama 1/2
BSA	Bovine serum albumin / Albúmina de suero bovino
CaCu	Cáncer cervicouterino
CD4	Cluster of quadruple differentiation / Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cluster of differentiation / Cúmulo de diferenciación 8
CDK	Cyclin-dependent kinases / Cinasas dependientes de ciclinas
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2 / Cinasa dependiente de ciclina 2
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4 / Cinasa dependiente de ciclina 4
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5 / Cinasa dependiente de ciclina 5
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6 / Cinasa dependiente de ciclina 6
cDNA	complementary DNA / ADN complementario
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene /Oncogén de la mielomatosis celular
COX2	Ciclooxigenase-2 / Ciclooxigenasa-2
CtIP	CTBP-interacting protein / Proteína que interactúa con CTBP
CTR1	High affinity copper uptake protein 1 / Proteína de captación de cobre de alta afinidad 1
DICER	Endoribonuclease Dicer / Endoribonucleasa Dicer
DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2 / Helicasa/nucleasa de replicación de ADN 2
DNA-PKC	DNA-dependent protein kinase catalytic / Proteína cinasa catalítica dependiente de ADN
DNASA	Desoxirribonucleasa
Dnmt1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 / ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1
DREAM	Dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B complex

DRR	Double-strand break Repair Reporter / Reportero de reparación de rupturas de doble hebra
E2F	E2 (Adenoviral Transcription) Factor / Factor (de transcripción adenoviral) E2
E5	Earlier 5 protein / Proteína temprana 5
E6	Earlier 6 protein / Proteína temprana 6
E7	Earlier 7 protein / Proteína temprana 7
E-cadherina	Epithelial Cadherin / Cadherina Epitelial
EcoRV	Restriction endonuclease, type II, EcoRV from <i>Escherichia coli</i> / Endonucleasa de restricción tipo II, EcoRV de <i>Escherichia coli</i>
ERE	Estrogen Response Elements / Elementos de Respuesta a Estrógenos
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor / Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT / TEM	Epithelial-mesenchymal transition / Transición epitelio-mesénquima
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation group 1 protein / Proteína de Reparación por Escisión del Grupo de Complementación Cruzada 1
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2 / Cinasa regulada por señal extracelular 1/2
EROS	Especies reactivas de oxígeno
EXO1	Exonuclease 1 / Exonucleasa 1
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit / Potenciador de la subunidad 2 del complejo represivo Polycomb Zeste 2
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein / Proteína del Dominio de Muerte Asociada a Fas
Fas	Fas cell surface death receptor / Receptor de muerte de la superficie celular Fas

FEN1	Flap Structure-Specific Endonuclease 1 / Endonucleasa 1 de estructura específica de nucleótidos protuberantes
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2 / Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2
GFP	Green Fluorescence Protein / Proteína Verde Fluorescente
GLI-1	GLI Family Zinc Finger 1 / Familia GLI de dedo de zinc 1
GRIM-19	Gene Associated with Retinoid-IFN-Induced Mortality 19 / gen asociado con la proteína de mortalidad inducida por retinoide-IFN 19
H2AX	H2A histone family member X / Miembro X de la familia de histonas H2A
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor 1 α / Factor inducible por hipoxia 1 α
HOX	Homeobox gene / Genes Homeóticos
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 / Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa
HPV 16	Human Papilloma Virus type 16 / Virus del Papiloma Humano tipo 16
HPV 18	Human Papilloma Virus type 18 / Virus del Papiloma Humano tipo 16
HR	Homologous Repair pathway / Vía de reparación por recombinación homóloga
Hsc70	Heat shock cognate 71 kDa protein / Proteína de choque térmico de 71 kDa
hTERT	Human Telomerase Reverse Transcriptase / Transcriptasa Reversa de la Telomerasa Humana
IC20	Inhibitory Concentration 20 % / Concentración Inhibitoria del 20 %
IC50	Inhibitory Concentration 50 % / Concentración Inhibitoria del 50 %
IL-1β	Interleukin-1 β / Interleucina-1 β
IL-6	Interleukin-6 / Interleucina-6
JNK1	c-Jun N-terminal Kinase 1 / Cinasas c-Jun N-terminal 1
KDM6A/B	Lysine-specific demethylase 6A/B / Desmetilasa específica de Lisina 6A/B

Ku70	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU70 / Subunidad KU70 de la ADN helicasa 2 dependiente de ATP
Ku80	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit KU80 / Subunidad KU80 de la ADN helicasa 2 dependiente de ATP
LAPTM4b-35	Lysosomal Protein Transmembrane 4 β -35 / Proteína Transmembranal Lisosomal 4 β -35
LncRNA	Long non-coding RNA / ARN largo no codificante
MALAT	Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 / Transcrito 1 de Adenocarcinoma de Pulmón Asociado a Metástasis
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase / Proteína Cinas Activada por Mitógeno
MDR-1	Multidrug resistance 1 / Resistencia a Múltiples fármacos 1
MHC-I	Major Histocompatibility Complex class I / Complejo de Mayor Histocompatibilidad clase I
miRNA	microRNA / microARN
MME-NHEJ	Microhomology mediated Non-homologous end joining pathway / Reparación por unión de extremos no homólogos mediada por microhomología
MMP-13	Matrix Metallopeptidase 13 / Metaloproteinas de Matriz 13
MMP-2	Matrix Metallopeptidase 2 / Metaloproteinas de Matriz 2
MMP-3	Matrix Metallopeptidase 3 / Metaloproteinas de Matriz 3
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9 / Metaloproteinas de Matriz 9
MMR	Mismatch repair pathway / Vía de reparación de apareamientos erróneos
MRE11	Meiotic Recombination 11 homolog A / Homólogo A de la Recombinación Meiótica 11
MRN	Complejo formado por MRE11, RAD50 y NBS1
mRNA	Messenger RNA / ARN mensajero

MRP	Multidrug resistance-associated protein / Proteínas de resistencia a múltiples fármacos
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin / Blanco de la Rapamicina de Mamíferos
NANOG	Nanog Homeobox / Homeobox Nanog
NBS1	Nibrin / Nibrina
N-cadherina	Neutral Cadherin / Cadherina Neutral
NER	Nucleotide Excision Repair pathway / Vía de Reparación por Escisión de Nucleótidos
NESTIN	Neuroepithelial Stem Cell Protein / Proteína de Células Madre Neuroepiteliales
NF-κB	Nuclear Factor kappa B / Factor Nuclear kappa B
NHEJ	Non-homologous end joining pathway / Vía de reparación por unión de extremos no homólogos
OCT4	Octamer-binding Transcription factor 4 / Factor de Transcripción 4 de unión a Octámero
p16	Protein 16 / Proteína 16
p21	Protein 21/ Proteína 21
p27	Protein 27 / Proteína 27
p38	Protein 38 / Proteína 38
p53	Protein 53 / Proteína 53
p-AKT	Phospho-Protein Kinase B / Proteína Cinasa B Fosforilada
Pb	Pares de bases
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen / Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR	Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1 / Proteína de Muerte Celular Programada
PD-L1	Programmed Death Ligand 1 / Ligando de muerte programada

p-ERK	Phosphorilated ERK / ERK fosforilado
p-FOXO1	Phospho-Forkhead box protein O1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase / Fosfatidilinositol 3-Fosfato Cinasa
PKC	Protein Kinase C / Proteína Cinasa C
PNPK	Polynucleotide Phosphatase/Kinase / Plonucleótido Fosfatasa/Cinasa
pRb	Retinoblastoma Protein / Proteína del Retinoblastoma
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RAD51	RAD51 recombinase / Recombinasa RAD51
ER-α/β	Estrogen Receptor α/β / Receptor de Estrógenos α/β
RIP	Receptor-Interacting Protein / Proteína de Interacción con el Receptor
RNASE	Ribonucleasa
I-SceI	Intron-encoded endonuclease I-SceI from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / Endonucleasa codificada por intrones I-SceI, de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCJ	Squamocolumnar Junction / Unión Escamoso-Columnar
SET 7/9	Histone-lysine N-methyltransferase 7/9 / Histona-lisina N-metiltransferasa 7/9
siRNA	Silencing RNA / RNA de silenciamiento
SIRT1	Sirtuin 1 / Sirtuina 1
SLUG	Zinc finger protein SNAI2 / Proteína de dedos de zinc SNAI2
SMADS	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic / Supresor de Madre contra Decapentaplejia
SNAIL	Zinc finger protein SNAI1 / Proteína de dedos de zinc SNAI1
SSA	Single Strand Annealing Pathway / Vía de recocido de una sola hebra
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 / Transductor de señales y activado de transcripción 3
TGFα	Transforming Growth Factor- α / Factor de Crecimiento Transformante- α

TNF	Tumor Necrosis Factor/ Factor de necrosis tumoral
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor / Receptor del Factor de necrosis tumoral
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand / Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF
TRBP2	Trans-activation Response (TAR) RNA Binding Protein 2 / Proteína de unión a ARN de respuesta a transactivación (TAR) 2
TWIST	Twist-related protein 1
UBE3A	Ubiquitin Protein Ligase E3A / Proteína Ubiquitina Ligasa E3A
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor / Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
VPH	Virus del Papiloma Humano
WNT	Wingless-related integration site / Sitio de integración relacionado con Wingless
XLF	XRCC4-Like Factor / Factor similar a XRCC4
XRCC1	X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1 / Proteína de Complemento Cruzado de reparación de rayos X
XRCC4	X-ray Repair Cross-Complementing Protein 4 / Proteína 4 de Complemento Cruzado de reparación de rayos X
ZEB1/2	Zinc finger E-box-binding homeobox 1/2 / Homeobox 1 /2 de unión a E-box con dedos de zinc
ZO-1	Zonula Occludens-1 / Zónula Ocluyente-1
βFGF	β-Fibroblast Growth Factor / Factor de Crecimiento de Fibroblastos β
β-catenina	Catenin β1 / Catenina β1
γH2AX	Phospho-H2A histone family member X / Miembro X de la familia de histonas H2A Fosforilada

INTRODUCCIÓN

El cuello uterino

El útero se divide en cuerpo, istmo y cuello uterino o cérvix. El cérvix es la parte inferior del útero que, al terminar conecta con la vagina. Este a su vez se divide en endocérvix y ectocérvix, siendo el primero la parte superior del cuello uterino, que conecta con el cuerpo del útero, mientras que el exocérvix es la parte inferior del cuello uterino que, como se menciona anteriormente, conecta con la vagina¹ (ver *figura 1*)².

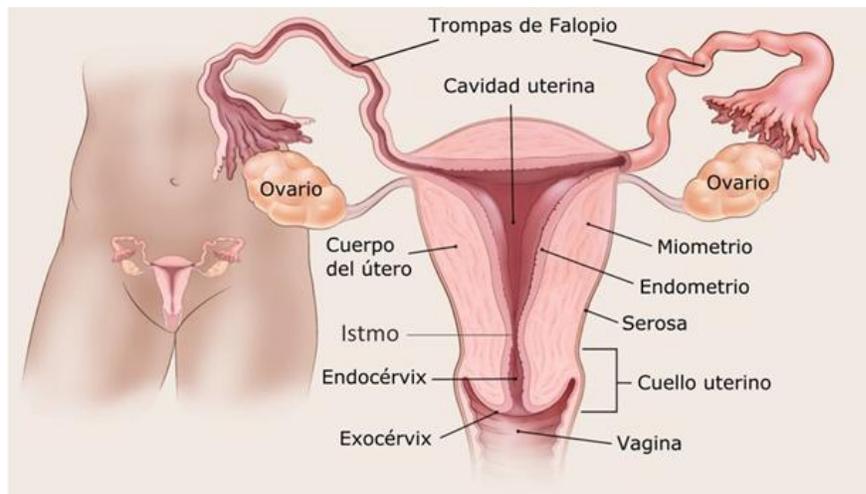


Figura 1. Representación esquemática del cuello uterino (tomada y modificada de American Cancer Society²)

El cérvix mide entre 2.5 y 4 cm de largo y aproximadamente 3 cm de diámetro en mujeres adultas, y posee una ligera inclinación^{1,3}. Se compone de tejido conectivo fibroso, tejido muscular liso, así como tejido epitelial columnar y escamoso. El ectocérvix está formado principalmente por epitelio escamoso dividido en tres zonas: la zona de las células germinales, compuesta de células basales que se diferencian en parabasales, y son las que se renuevan continuamente. Posteriormente sigue la zona media, que es la porción dominante, donde migran las células que se diferenciaron de la capa anterior y donde continúan madurando para alcanzar la tercer y última zona, la superficial, correspondiente a las células más diferenciadas y maduras (ver *figura 2*). Este proceso de remodelación epitelial es dinámico y se renueva

aproximadamente cada 5 días, sin embargo, la administración de compuestos estrogénicos puede acelerar este proceso a 3 días. Por el contrario, si faltan estrógenos, como después de la menopausia, las células no maduran más allá de células parabasales^{1,3}.

Por otro lado, el endocérvix tiene una capa única de células epiteliales columnares que secretan mucina para proteger la superficie, en ella se encuentran también las glándulas endocervicales, por eso se dice que está formado por epitelio glandular. Estos dos epitelios se encuentran en la unión escamoso-columnar (SCJ por sus siglas en inglés), una región dinámica que se “mueve” por el alargamiento del canal endocervical a medida que la mujer crece y se desarrolla. La unión original está en el canal endocervical y se recorre hasta quedar sobre el ectocérvix. A la región de epitelio que queda entre la unión escamosa-columnar original y la nueva se le llama zona de transformación o transición y su posición también puede variar dependiendo de la edad de la mujer. Este cambio de posición es debido a la modificación y recambio de las células de la zona de transformación, ya que esta es muy dinámica, por lo que se sugiere que esta es la razón por la que muchas de las células en recambio son infectadas por Virus de Papiloma Humano (VPH) y en el futuro pueden convertirse en células precancerosas (ver figura 2)³.

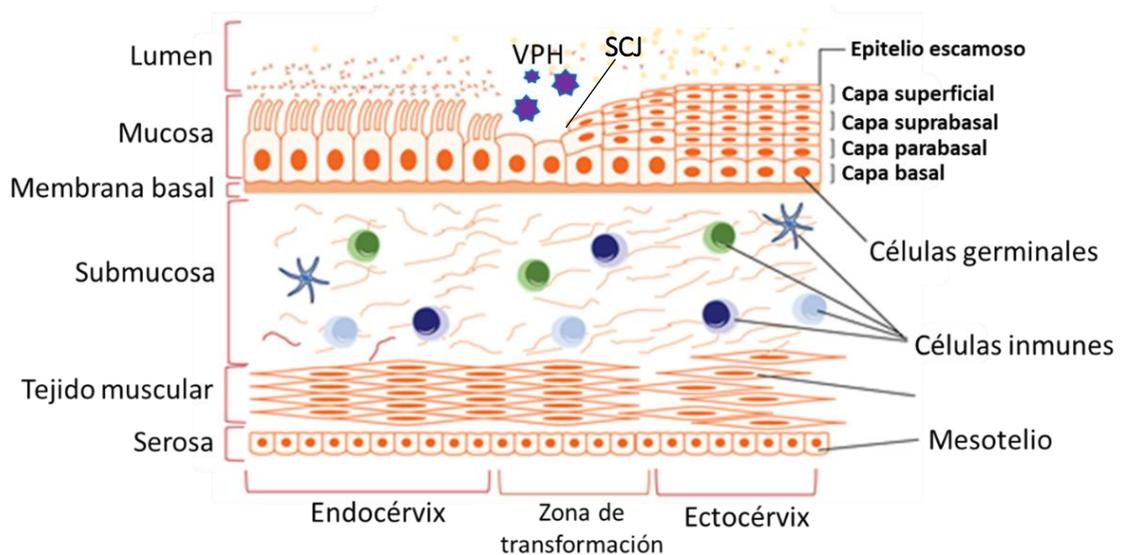


Figura 2. Ilustración microscópica del cérvix. De abajo hacia arriba se muestra la capa más superficial del cérvix, que es el mesotelio, el cual recubre a la capa serosa, una capa de tejido que recubre todo el exterior del útero. A continuación, se encuentra el tejido estromal, el cual se compone de fibroblastos y musculo liso. A través de este tejido fibromuscular pasan los suministros vasculares, linfáticos y nerviosos al cérvix. En la imagen se observan células inmunes dispersas, incrustadas en una matriz extracelular rica en colágeno. Posteriormente, la membrana basal separa el epitelio del estroma y es la membrana que proporciona el soporte para la primera capa del epitelio. En el caso del endocérvix se observa una única capa de epitelio columnar glandular, mientras que en el exocérvix son las células de la capa basal, que se diferencian en células parabasales, posteriormente suprabasales y superficiales, formando el epitelio escamoso (tomada y modificada de Barrios De Tomasi, J.⁴).

Cáncer cervicouterino

Se llama cáncer de cuello uterino o cáncer cervicouterino (CaCu) a aquel que se desarrolla en esta parte del útero, en el endocérvix o en el ectocérvix, y dependiendo de la localización y el tipo de células que sean transformadas puede ser de dos tipos principalmente. El tipo más común de CaCu es el carcinoma de células escamosas, que se desarrolla en el ectocérvix. En segundo lugar, están los adenocarcinomas, desarrollados a partir de las células glandulares del endocérvix; aunque en menor frecuencia también se presentan cánceres con características de ambos y se denominan carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos^{5,6}.

Al igual que en muchos otros tipos de cáncer, existen diversos factores de riesgo que pueden favorecer el desarrollo de CaCu, entre estos se incluyen el nivel socioeconómico, edad, inicio de vida sexual a edad temprana, elevado número de parejas sexuales, múltiples embarazos, infecciones de transmisión sexual (clamidia, infección por herpes o citomegalovirus), deficiencias nutricionales, consumo de tabaco, alcohol, uso prolongado de anticonceptivos orales y cualquier factor que afecte al sistema inmunológico como el VIH/SIDA o los medicamentos inmunosupresores que se usan para evitar el rechazo de un trasplante de órganos⁷. Sin embargo, es bien sabido que el mayor factor de riesgo para desarrollar este tipo

de cáncer es la infección persistente por VPH de alto riesgo^{5,8-10}. Aunado a esto, los niveles hormonales, el tipo de VPH presente, la coinfección con más de un tipo de VPH, la frecuencia de reinfección y la carga viral se relacionan directamente con la gravedad de esta enfermedad, además se ha demostrado que la predisposición genética también es un factor de riesgo, pues de ella puede depender la susceptibilidad a la infección por VPH, la capacidad para eliminar la infección o el tiempo de desarrollo de la enfermedad⁸.

VPH y cáncer cervicouterino

Existen varios tipos de VPH y dependiendo de su naturaleza se han dividido en VPH de alto y bajo riesgo, el VPH de alto riesgo se ha asociado principalmente a CaCu, pero también a cánceres anogenitales^{11,12}, de cabeza y cuello^{13,14}, de pulmón (células escamosas, adenocarcinoma y células pequeñas)^{15,16}, cáncer de piel^{17,18} y en menor medida con cáncer colorectal^{19,20} y cáncer renal²¹. Sin embargo, los resultados con cáncer de mama y vejiga aún no son concluyentes^{22,23}. Por otro lado, aunque los VPH de bajo riesgo no están asociados directamente al desarrollo de cáncer, sí es bien sabido que pueden causar varios tipos de verrugas incluidas las genitales²⁴, las cuales usualmente pueden ser tratadas y eliminadas. Sin embargo, los VPH de bajo riesgo también se han asociado con la transformación maligna como en el caso de la papilomatosis respiratoria recurrente y la epidermodisplasia verruciforme²⁵.

En este sentido, los VPH más comunes y por ende los más estudiados son el VPH de tipo 16 y 18, que además están altamente asociados con el desarrollo de CaCu invasivo²⁶. Interesantemente, se ha demostrado que el tipo de VPH puede estar relacionado con un tipo de cáncer en particular, por ejemplo, el VPH16 se asocia con el desarrollo de tumores en las células escamosas del ectocérvix y la zona de transformación, mientras que el VPH18 está más asociado con adenocarcinomas provenientes del endocérvix²⁷⁻²⁹. Esto cobra sentido si recordamos que los tipos de CaCu más frecuentes son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, y que el VPH16 y 18 son los más comunes relacionados con estas enfermedades. Es importante mencionar, que el VPH16 provoca una infección persistente más

prolongada que otros tipos de VPH de alto riesgo, y es por eso por lo que se considera el más peligroso para el desarrollo de cáncer³⁰. Curiosamente, se ha mencionado que la prevalencia de estos dos tipos de VPH disminuye conforme aumenta la edad en pacientes con ciertos tipos de cáncer, a diferencia de otros como el 33, 39, 52 y 58, cuya prevalencia aumenta en personas mayores, donde se ha visto un aumento de hasta el 4% con respecto a personas más jóvenes^{28,29}.

La infección por VPH es un factor necesario para el desarrollo de CaCu, pero no es suficiente dado que tener la infección no es sinónimo de que una mujer desarrollará CaCu además de que existen otros factores que intervienen en el desarrollo del cáncer³¹. De hecho, sólo un pequeño porcentaje de las mujeres infectadas con VPH desarrollarán cáncer en algún momento de su vida. Esto se debe a que la mayoría de las mujeres se infectan de VPH oncogénico durante los primeros años de su vida sexual, pero la infección es eliminada poco después por el sistema inmunológico sin dejar ningún daño residual, aunque en ocasiones las infecciones transitorias pueden causar lesiones leves con bajo potencial oncogénico^{10,32}. Sin embargo, un pequeño porcentaje de mujeres no logra eliminar el virus y se convierte en una infección persistente. EL VPH puede entrar a las células a través de pequeñas abrasiones en el tejido, o en la capa de la SCJ entre el endo y ectocérvix. Una vez ahí, las proteínas de la cápside se unen a los receptores celulares; posteriormente, el virus ingresa a la célula por endocitosis y viaja por el citoplasma hasta el núcleo, al cual ingresa a través de los poros nucleares o cuando la membrana nuclear se rompe durante la mitosis; una vez ahí, la cápside se desintegra y queda el material genético del virus al descubierto³³, lo cual le permite integrarse en el material genético de las células de la capa basal, donde se mantiene latente. Cuando las células que integraron el genoma del virus se diferencian, el material genético viral se replica y se expresa para formar viriones maduros y garantizar su propia supervivencia, de esta manera pasa de infección latente a infección en transformación (ver *figura 3*). Sin embargo, aún no se sabe de qué depende que el virus se integre al material de las células huésped o

permanezca en estado episomal, ya que esto también puede depender del tipo de virus^{10,27,34}.

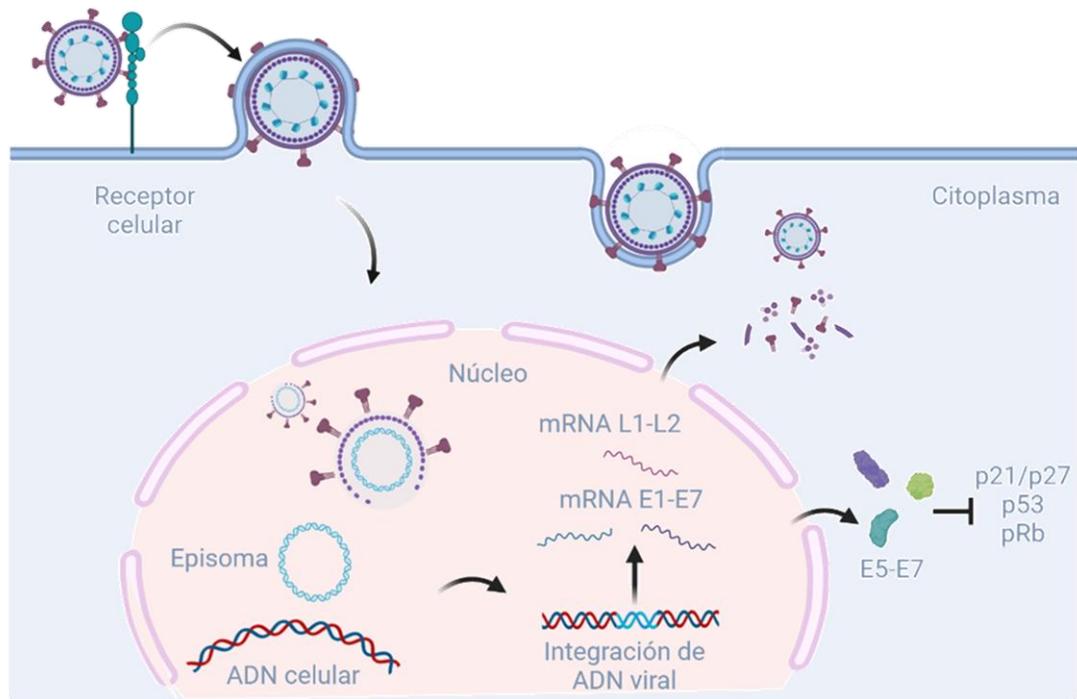


Figura 3. Infección por VPH a las células del cérvix. El VPH se une a receptores en la superficie celular e ingresa a la célula, una vez ahí, integra su genoma en el ADN de la célula huésped para que cuando esta célula se replique transcriba los mRNA de sus genes. Los genes de expresión temprana como E5-E7 garantizan la supervivencia de la célula huésped al inhibir a los oncosupresores p21, p27, p53 y pRb, esto permite que las proteínas de expresión tardía formen la cápside viral.

El genoma del VPH está formado por una región de genes de expresión temprana (E), que codifica para 6 proteínas, una región de expresión tardía (L) que codifica para las 2 proteínas estructurales, y la región larga de control (LCR), la cual contiene sitios reguladores para la replicación y transcripción del material (ver *figura 4*)³³. Los oncogenes virales E6 y E7 son los más estudiados porque al expresarse pueden inducir proliferación, inhibir apoptosis, alterar la estructura cromosomal, provocar inestabilidad cromosómica y además modificar la expresión de los genes en la célula

hospedadora. Asimismo, el gen E5 también se considera un oncogen aunque su potencial oncogénico es menor^{10,27}.

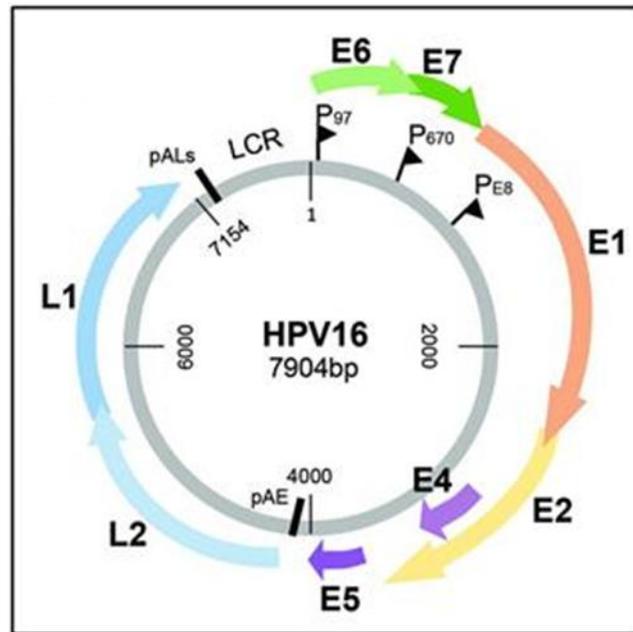


Figura 4. Representación esquemática del genoma del VPH16 (tomada y modificada de Graham, S. V.³³)

Múltiples estudios de microarreglos han demostrado que la infección por VPH de alto riesgo provoca cambios en la expresión de más de 300 genes celulares, ya sea disminuyendo o aumentando su expresión. Estos cambios de expresión se han relacionado con las 3 oncoproteínas mencionadas anteriormente, E5, E6 y E7, que han demostrado ser capaces de modificar importantes procesos celulares como el crecimiento celular, la diferenciación y la evasión inmunológica^{8,35}.

La oncoproteína E5 de los VPH de alto riesgo ha demostrado tener distintas funciones, se ha reportado que es capaz de provocar cambios morfológicos en el epitelio cervical, interferir en el tráfico de proteínas celulares y la evasión del sistema inmune al inducir la pérdida de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) de las células infectadas³⁶. La expresión de E5 también se ha asociado con una proliferación celular sostenida de las células infectadas al inhibir a los supresores tumorales p21/p27^{37,38} y también se ha demostrado que la expresión de esta

oncoproteína permite a las células evadir la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno exógeno al favorecer la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2)³⁹. E5 también es capaz de interactuar con diversos receptores celulares, entre ellos los receptores de muerte, evitando así la apoptosis por esa vía⁴⁰. Adicionalmente, es capaz de provocar la diferenciación de queratinocitos mediante el receptor de crecimiento epidérmico (EGF-R) y la vía de las MAPK⁴¹. En este sentido, los queratinocitos son células que tienen una vida corta y si están infectados pueden ayudar a progresar la infección sin ser detectados por el sistema inmune³⁹. En etapas más avanzadas, a través de la regulación de EGFR, MEK/ERK1/2 y PI3K/AKT, E5 promueve invasión y metástasis al promover la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{36,42}.

Por otro lado, las oncoproteínas E6 y E7 tienen una gran cantidad de blancos celulares, pero los más importantes son los supresores de tumores p53 y pRb respectivamente. p53 es uno de los genes supresores de tumores más importante en nuestro organismo, se le ha llamado el guardián del genoma debido a que se activa ante una gran variedad de estímulos que inducen daño al ADN participando en una diversidad de procesos celulares como la regulación del ciclo celular, apoptosis, reparación del ADN, actividades metabólicas, entre otros⁴³. Mientras tanto, pRb, también llamada proteína del retinoblastoma es la responsable de secuestrar al factor de transcripción E2F, evitando que la progresión del ciclo celular avance de la fase G1 a S, cuando la célula está preparada para avanzar, pRb libera a E2F permitiendo que el ciclo celular continúe⁴⁴. Se ha demostrado que E6 provoca la degradación de p53 al interactuar con la ubiquitina ligasa UBE3A (también conocida como E6AP), cuando p53 es marcada por ubiquitinación y degradada, la división celular se descontrola, se acumulan mutaciones y toda la maquinaria celular se ve afectada⁴⁵. De manera similar, la oncoproteína E7 se une a la proteína conocida como μ -calpaína (cisteína-proteasa dependiente de calcio), la cual ubiquitina a pRb evitando el secuestro de E2F, provocando que el ciclo celular continúe, dejando a las células en fase S permanentemente⁴⁶. Por si esto fuera poco, E7 también modula el ciclo celular a

través del supresor de tumores p16 y el complejo DREAM, el cual también es blanco de E6^{47,48}. Por otro lado, cuando el genoma del VPH se integra en el del huésped, a menudo lo hace en el locus de c-Myc, lo cual curiosamente induce la sobre expresión de este gen⁴⁹ provocando que este promueva la progresión del ciclo celular y active constitutivamente a la enzima hTERT con colaboración de E6 y otras proteínas como UBE3A^{50,51}. La transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) es la encargada del alargamiento de los telómeros, por lo que su activación contribuye a la inmortalización de las células transformadas⁵². Adicionalmente, al igual que E5 ambas proteínas pueden intervenir en la vía de las MAPK pero en este caso para promover la proliferación celular cooperando con proteínas como Ras oncogénico e interactuar con mTOR induciendo así la proliferación y crecimiento celular, por ejemplo, mediante el mantenimiento de la síntesis de proteínas, aún en ausencia de factores de crecimiento⁵³.

Además de alterar el ciclo celular, estas oncoproteínas pueden evadir la muerte celular programada. E6 evita la apoptosis con el secuestro de p53, pero también puede hacerlo de manera independiente, por ejemplo, degradando proteínas importantes para este proceso. Se ha demostrado que E6 puede interactuar con la proteína proapoptótica BAK1, al igual que con FADD y la caspasa 8, provocando así su degradación y frenando el proceso de apoptosis⁵⁴; por otro lado, E6 también puede obstaculizar la vía del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), que provoca apoptosis por vía extrínseca⁵⁵. Interesantemente, E7 también ha demostrado tener una función antiapoptótica, pero no tan importante como la de E6, por ejemplo, se ha visto que en células transformadas con E7, hay una disminución en la activación de la caspasa 8 en respuesta al tratamiento con TNF (Factor de necrosis tumoral), además de un retraso en la escisión de la caspasa 3 y el dominio de muerte RIP⁵⁶.

Otro de los efectos de la inhibición de p53 mediada por E6 del VPH de alto riesgo es el cambio en la expresión de genes de angiogénesis, es decir, aquellos que regulan la formación de vasos sanguíneos nuevos. El VEGF es un promotor de la angiogénesis que se sobre expresa cuando se pierde la expresión de p53 y al igual que este, otros

genes pro-angiogénesis como la IL-8 también aumentan, en presencia de E6 y E7⁵⁷. Además, E7 es capaz de inducir angiogénesis activando a VEGF por dos mecanismos, el primero mediante la activación de los sitios AP1 del promotor de VEGF y el segundo a través de la vía de ERK1/2 que es activada cuando E7 secuestra a pRb y libera a E2F, promoviendo la expresión de RRM2. La sobre expresión de este factor, promueve producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), las cuales activan la vía ERK1/2-HIF-1 α -VEGF^{58,59}.

Al igual que E5, las oncoproteínas E6 y E7 pueden inducir la migración celular al activar factores de transición epitelio-mesénquima (TEM) como Twist, Slug y ZEB1/2⁶⁰. Además, se ha reportado que la expresión de E6 y E7 disminuyen la expresión de E-cadherina, que es un marcador de células epiteliales, mientras aumenta la expresión de la N-cadherina, un marcador mesenquimal. Es muy importante recalcar que, para modificar la expresión de genes, estas oncoproteínas forman complejos con moduladores epigenéticos, tales como la desmetilasa KDM6B, que puede favorecer la expresión de p16⁴⁷ o Dnmt1, una ADN metil-transferasa que puede inhibir la transcripción del gen de E-cadherina^{58,61}, además, se ha reportado que el aumento en la expresión de la histona metiltransferasa EZH2 y las desmetilasas KDM6A y B pueden favorecer la expresión de los genes HOX en queratinocitos, ayudando a su reprogramación⁶².

Prevención y detección de cáncer cervicouterino

Actualmente existen varias vacunas profilácticas contra varios tipos de VPH de alto riesgo. Por ejemplo, Cervarix [GSK] es una vacuna bivalente dirigida contra el VPH de tipo 18 y 16, consiste en un vector de expresión de baculovirus que usa como adyuvante AS04; mientras que Gardasil [Merck & Co], es una vacuna tetravalente que se dirige contra VPH 6, 11, 16 y 18; Gardasil 9 [Merck & Co], es una vacuna nonavalente de más reciente desarrollo que protege contra VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58, esta vacuna utiliza un sistema de expresión producido en *Saccharomyces cerevisiae* y como adyuvante AAHS⁶³, pero a diferencia de las 2 primeras Gardasil 9 no está disponible en México. Estas vacunas pueden ser aplicadas a menores de entre 9

y 14 años para evitar que estos se contagien de estos tipos de VPH. Las desventajas de estas vacunas son de varios tipos, la primera es que no protegen contra todos los tipos de VPH, por lo que hay una probabilidad de infectarse con ellos, tampoco pueden ser aplicadas a personas que ya tengan una infección activa/avanzada. Otro problema es que las campañas en la mayoría de los países son enfocadas a las mujeres, aunque los hombres son portadores del VPH y una parte importante en el proceso de infección. En países subdesarrollados hay poca disponibilidad de vacunas, y algunos autores mencionan que la mayor incidencia de algunos tipos de VPH específicos en ciertas áreas geográficas debería ser un factor importante que considerar para la vacunación^{9,10,29}.

Además de las vacunas, la infección por VPH puede evitarse con el uso de preservativos, sin embargo, este método tampoco es 100% eficaz ya que el contacto piel con piel es suficiente para adquirir la infección, por lo tanto, los labios, el escroto o el ano son áreas infectivas^{5,8}.

Considerando que las medidas profilácticas contra la infección por VPH no logran ser 100% seguras, las revisiones periódicas para detectar morfología anormal en las células del cuello uterino o infección por VPH son la única medida para detectar a tiempo los cambios en el tejido que pueden desencadenar en el desarrollo de cáncer. Para la revisión de tejido se puede realizar una prueba de Papanicolau, que es básicamente un “frotis” de la región cervical, y aunque es la prueba más utilizada, aún hay casos en los que esta prueba arroja falsos negativos, por ejemplo, si las células transformadas recogidas son tan pocas que pasen desapercibidas al revisar la tinción. Es por esto por lo que se ha tratado de perfeccionar la técnica, pero, muchos especialistas optan por hacer una observación del tejido interno no tejido micro invasor, por lo tanto, también se puede realizar una biopsia dirigida por colposcopia, la cual permitirá observar las características patológicas del tejido^{5,8,9}.

Además de las pruebas histopatológicas antes mencionadas, recientemente se ha planteado también el uso de biomarcadores para la detección temprana de CaCu, por

ejemplo, algunos miRNAs, muestran cambios en los niveles de expresión en sangre en personas con CaCu⁶⁴. En un estudio sistemático se observó que de 33 miRNAs analizados 17 de ellos (miR-9, miR-15b, , miR-16-2, miR-21, miR-34a, miR-92a, miR-152, miR-155-5p, miR-192, miR- 196a, miR-199a-5p, miR-205, miR-218, miR-425-5p, miR-497, hsa-miR-1266 y miR-1290) tuvieron una mayor expresión en mujeres con lesiones precancerosas y cáncer, mientras que los otros 16 (let-7d-3p, miR -30d-5p, miR-34a, miR-100, miR-125b, miR-145, miR-195, miR-200a, miR-203a-3p, miR-214, miR-218, miR-370, miR-521, miR-638, miR-1914-5p y miR-2861) mostraron niveles de expresión disminuidos en comparación con los de mujeres sanas⁶⁵. Sabiendo esto, midiendo los niveles de estos miRNAs, se podría ayudar a un diagnóstico temprano con una prueba menos invasiva que las anteriores⁶⁴.

Adicionalmente, las pruebas de detección de VPH pueden ser cruciales para detectar el CaCu a tiempo. En este sentido, existen pruebas de PCR para detectar VPH de tipo específico, utilizando primers para las proteínas E6 y E7 o para detectar VPH en general, utilizando primers que reconocen regiones conservadas, como los genes que codifican para las proteínas de la cápside⁶⁶. Una variante de estos estudios es la detección de carga viral de mRNA de VPH de alto riesgo, estos ensayos se pueden realizar en muestras de citología de base líquida o en los frotis de prueba de Papanicolau, donde a través de fluorescencia de una hibridación *in situ* se detecta la presencia del mRNA de E6 y E7⁸.

Es importante recalcar que, aunque exista una variedad de pruebas para detectar las lesiones cervicales en etapas tempranas, el CaCu es el cuarto cáncer más común en mujeres del mundo, y el segundo en países en desarrollo, solo después del cáncer de mama; y su prevalencia es mayor en países subdesarrollados^{67,68}. Esto podría deberse a la falta de educación sexual sobre el uso de anticonceptivos como el preservativo y el riesgo que suponen algunos anticonceptivos orales, la desinformación que tanto hombres como mujeres tienen con respecto al tema, la inaccesibilidad a revisiones médicas periódicas que permitan un diagnóstico temprano o la falta de acceso a tratamientos adecuados y eficientes. Con respecto a esto, se ha reportado que

muchas mujeres que llegan a tratarse por CaCu en etapas avanzadas, nunca se realizaron una prueba de Papanicolau⁶⁹. Adicionalmente, los sectores menos favorecidos también son más susceptibles a otros factores de riesgo además del VPH, como poca higiene, mala alimentación, tabaquismo, sistema inmunológico deficiente y uso de anticonceptivos orales, solo por mencionar algunos. Por lo tanto, no es de sorprenderse que muchos de los diagnósticos de este tipo de cáncer se hagan hasta etapas avanzadas⁷⁰.

Tratamiento contra cáncer cervicouterino

El tratamiento contra el cáncer cervicouterino puede ser muy variable, y para la elección más acertada hay que considerar la etapa y tipo de tumor, así como las características particulares de cada caso, por ejemplo, la edad del paciente, su estado de salud en general e incluso sus proyectos de vida, ya que algunos procedimientos podrían afectar la vida sexual o la capacidad de tener hijos. Los tratamientos actuales para este tipo de cáncer son cinco: la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia, ya sea solas o en combinación, aunque las más comunes son las tres primeras^{70,71}. A continuación, se describen brevemente los tratamientos antes mencionados.

Con la cirugía se elimina mediante “extracción” el tejido tumoral. Si se trata de un tumor in situ, bastará con una microcirugía que elimine solo la porción de células transformadas, sin embargo, si se trata de un tumor que ha comenzado a diseminarse, podría requerir una cirugía donde se extirpe parte del útero, los ganglios o el útero completo e incluso el aparato reproductor completo y, en casos extremos, donde el tumor se ha diseminado demasiado o vuelve de manera recurrente, se podría hacer la resección del aparato reproductor completo, el ano y la vejiga. Este tipo de prácticas pueden tener consecuencias de por vida, donde se incluye incapacidad de tener hijos^{71,72}.

Por otro lado, la radioterapia consiste en dar dosis altas de radiación con rayos X, al paciente para reducir las células tumorales o evitar que se diseminen, pero también

se puede utilizar esta terapia como un paliativo que otorgue mejor calidad de vida al paciente. Se puede suministrar de manera externa, que es similar a realizarse una radiografía, donde con una máquina se aplica radiación al paciente por un periodo corto de tiempo. Este tipo de radioterapia puede aplicarse después de una cirugía, donde el objetivo es eliminar cualquier célula cancerosa que pudiera quedar después de la cirugía. Pero la radioterapia externa puede usarse como tratamiento principal en algunas etapas de CaCu o en el caso donde el tumor sea inoperable. Por ejemplo, mediante radioterapia 3D se modela tridimensionalmente el tumor y se envían rayos de radiación de distintos ángulos, a modo de atacar el tumor completo protegiendo los tejidos sanos cercanos^{71,73}. Además de la radioterapia externa existe la radioterapia interna, que consiste en introducir en el paciente una fuente de radiación cerca o dentro del tumor. Este tipo de terapia suele utilizarse en conjunto con radioterapia externa como terapia principal. Aunque con este tipo de tratamiento se suelen obtener buenos resultados, los pacientes pueden presentar efectos secundarios como sangrado rectal, debilidad en los huesos o problemas urinarios, entre otros^{70,71}.

Por otro lado, la quimioterapia consiste en administrar uno o varios fármacos al paciente, ya sea de manera oral o por vía intravenosa. Esta terapia es sistémica, por lo que llega prácticamente a todo el cuerpo, por lo que es ideal para tratar casi cualquier tipo de cáncer. En el caso del CaCu muchas veces se utiliza para reducir el tamaño del tumor para después realizar cirugía o sensibilizarlo para tratar con radiación, pero también es común utilizar quimioterapia como tratamiento principal de ciertas etapas tumorales, muchas veces esta quimioterapia va en conjunto con radioterapia, adquiriendo el nombre de quimiorradioterapia. Para la cual, los fármacos más comunes son los compuestos de platino como el cisplatino o el carboplatino con o sin 5-fluorouracilo, es decir, uno o dos quimioterapéuticos más radiación. Pero en el caso de tumores con riesgo de recurrencia o cuyo tratamiento local es imposible, los tratamientos comunes consisten en una combinación de quimioterapéuticos como paclitaxel/cisplatino/bevacizumab, paclitaxel/cisplatino,

paclitaxel / topotecán / bevacizumab, paclitaxel / topotecán, paclitaxel / carboplatino^{70,71,74,75}.

La quimioterapia también puede usarse como paliativo en tumores de grado muy avanzado, recurrentes o persistentes para disminuir los síntomas del paciente y que tenga una mejor calidad de vida. En este sentido, los quimioterapéuticos que más se usan por sus tasas de respuesta son: cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, irinotecán o combinaciones que presentan mejores tasas de respuesta, entre las cuales destacan ifosfamida/cisplatino, paclitaxel/cisplatino, cisplatino/gemcitabina y cisplatino/topotecán. Al igual que la radioterapia, los quimioterapéuticos tiene efectos secundarios que pueden ser variables dependiendo del medicamento y la dosis, así como el tiempo de tratamiento. En ese sentido, hay efectos secundarios que son de corto plazo, tales como caída del cabello, úlceras en la boca, pérdida del apetito, náuseas, vómito, anemia, entre otros. Estos efectos secundarios pueden verse agravados si la quimioterapia se combina con radiación. También existen efectos secundarios de largo plazo que incluyen nefrotoxicidad, neuropatías o cambios en los periodos menstruales^{70,71,76}.

Uno de los principales problemas con la quimio y radioterapia es que muchas veces al tratar de eliminar el tumor se afectan también células sanas, esto debido a que tanto la radiación como los quimioterapéuticos no son selectivos en cuanto a qué tipo de células dañan. Es por esto, que se ha buscado el uso de terapias dirigidas, las cuales hacen uso de moléculas que sean capaces de identificar marcadores específicos en las células cancerosas y eliminarlas sin dañar a las sanas. Además, aunque el tratamiento basado en paclitaxel/cisplatino para el CaCu en estado avanzado o recurrente en general da buenos resultados, se ha descubierto que su combinación con terapia dirigida aumenta la supervivencia⁷⁷.

Las terapias dirigidas usan muchas veces anticuerpos monoclonales que reconocen ciertas moléculas en la célula cancerosa, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal Bevacizumab se dirige a VEGF, mencionado anteriormente, lo inactiva y evita la unión

a su receptor VEGF-R inhibiendo la señalización que favorece la angiogénesis, que es un factor importante en el avance de la carcinogénesis; por lo tanto, el tratamiento con este anticuerpo solo o en combinación con quimioterapia ha alargado la esperanza de vida de los pacientes, aunque con algunos efectos secundarios severos^{77,78}. Además de este anticuerpo monoclonal han sido probados otros, pero los resultados no han sido tan buenos como el anterior; sin embargo, algunos autores mencionan que este tipo de terapia es el futuro en el tratamiento de CaCu⁷⁵. También, se ha planteado la idea de utilizar otras moléculas biológicas distintas a los anticuerpos, tales como ARN interferentes, ribonucleótidos antisentido y ribozimas, los cuales más que dirigirse a las células cancerosas se encargarían de silenciar a las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH de alto riesgo, que como sabemos, juegan un papel muy importante en este tipo de cáncer; sin embargo, este tipo de moléculas aún no están disponibles para la población en general, pues se encuentran en fase de estudio. Desafortunadamente, la terapia que usa anticuerpos monoclonales, que ya es usada actualmente es demasiado costosa; por ejemplo, se ha reportado que la terapia con bevacizumab cuesta aproximadamente 13 veces más que la quimioterapia sola, por lo que la mayoría de la población de países en desarrollo no podría tener acceso a ella^{70,75,79}.

Adicionalmente, existen las terapias inmunológicas que consisten en estimular de alguna manera al sistema inmunológico para que se encargue de eliminar a las células cancerosas. Para ello se han utilizado vacunas terapéuticas que han pasado a la etapa clínica, cuya función consiste en utilizar vectores bacterianos vivos atenuados que son dirigidos a las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Estos vectores se replican y logran que los antígenos producidos sean reconocidos por el complejo mayor de histocompatibilidad I y II activando a las células T CD4 y CD8. Este tipo de terapia se ha aplicado sola o en combinación con cisplatino dando buenos resultados en pacientes con tumores en grados avanzados o recurrentes que fueron tratados previamente con quimioterapia o radioterapia^{75,80}.

Otro tipo de terapia inmunológica ha sido dirigida a la molécula PD-1, que en condiciones normales es una proteína de superficie en las células T, cuya función es controlar las respuestas inmunitarias al reconocer a PD-L1 en otras células; sin embargo, se ha observado que las células tumorales de CaCu sobre-expresan a PD-L1 por lo que pueden evadir a las células T. Por lo que, se han desarrollado inhibidores de PD-1 y PD-L1 tales como nivolumab, ipilimumab y pembrolizumab que han demostrado en estudios experimentales y de fase clínica II que pueden estimular una eficiente respuesta en las células T para la eliminación de células tumorales de CaCu en etapas avanzadas, tumores metastásicos o aquellos que sean persistentes o recurrentes tratados previamente con otros tratamientos como la quimioterapia basada en cisplatino^{75,81-83}.

Además de las opciones mencionadas anteriormente, se han desarrollado otras moléculas estimuladoras del sistema inmune, pero aún se encuentran en fase experimental. En ese sentido, también se ha hablado de la manipulación genética, tanto del sistema inmune, para que reconozca a VPH como de las células infectadas. Sin embargo, no hace falta mencionar que estos tratamientos también son muy costosos por lo que es necesario buscar tratamientos más accesibles para toda la población⁷⁵.

Con respecto a lo anteriormente mencionado, se han encontrado compuestos naturales que han demostrado ser capaces de eliminar a las células cancerosas. Esto no es de sorprenderse, dado que anticancerígenos utilizados actualmente como los taxanos provienen de plantas y algunos aceites de semillas o extractos de plantas han demostrado tener actividad proapoptótica en células tumorales de CaCu, así como reducir la expresión de las oncoproteínas E6 y E7^{84,85}. Otros compuestos naturales han demostrado inhibir la degradación de p53 y pRb o suprimir la expresión de la hTERT, entre otras funciones anticancerígenas⁸⁶⁻⁸⁸. Ejemplos de estos compuestos son la curcumina, la berberina, jaceosidina, wogonina, aceite de semillas de lino, látex de *Ficus carica*, los extractos de tallo de *Cudrania tricuspidata*, tanshionona IIA, witaferina A y el ácido nordihidroguaiaretico. Todos estos compuestos prometen

proporcionar una terapia menos costosa y por lo tanto más accesible a poblaciones de bajos recursos económicos⁷⁵.

Cisplatino

Como se mencionó en el apartado anterior, el cisplatino es uno de los compuestos más comúnmente utilizados para el tratamiento de CaCu, ya sea solo o en combinación con otros compuestos o tipos de terapia, por lo que a continuación se describen de manera más detallada sus características generales y su mecanismo de acción.

El cisplatino, también llamado cis-diaminedicloroplatino (II), es un compuesto derivado del platino y a simple vista se puede ver que es una molécula sencilla y plana que consiste en un átomo de platino unido a dos amidas y dos cloruros (ver *figura 5*)⁸⁹, su peso molecular es de 301.1 g/mol y debido a su naturaleza es poco soluble en agua, pero muy soluble en otros compuestos como la dimetilprimanida. El cisplatino fue descubierto en los años 40's por Michele Peyrone⁹⁰, pero fue hasta la década de los 60's que el Dr. Barnett Rosenberg notó que el cisplatino era capaz de inhibir la división celular⁹¹, por lo que se planteó la idea de que podría ser un buen agente anticancerígeno. Desde entonces ha sido uno de los tratamientos más utilizados para muchos tipos de cáncer además del CaCu^{89,92,93}.

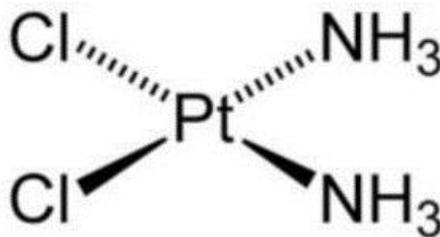


Figura 5. Estructura del cisplatino, donde se muestra el átomo de Platino al centro flaqueado por dos cloros y dos amidas (tomada de Dasari, S.⁸⁹)

El cisplatino es administrado a los pacientes por vía intravenosa y una vez que entra al torrente sanguíneo se mantiene estable, pero a menudo se une fuertemente a

algunas proteínas plasmáticas como la albúmina. Incluso se estima que del 70-90% del cisplatino que se aplica en quimioterapia puede “perderse” por su unión con dichas proteínas. Cuando llega a las células cancerosas, el cisplatino entra en estas mediante difusión pasiva, pero también existen algunos transportadores membranales como la proteína transportadora de cobre CTR1 que puede introducir al cisplatino en la célula⁹⁴. Una vez dentro, el fármaco es “activado” en un proceso que se llama mono o diacuación de cisplatino donde los cloruros son susceptibles a ser desplazados por moléculas de agua, volviéndolo un electrófilo altamente reactivo capaz de reaccionar con nucleófilos como los grupos tiol de las cisteínas en las proteínas o los grupos donadores de nitrógeno de los ácidos nucleicos. En ese sentido, los ácidos nucleicos son el blanco favorito del cisplatino, y el Nitrógeno 7 (N7) del anillo imidazol de la guanina es el más susceptible a ataques de cisplatino, seguida del N7 de la adenina. El cisplatino se une covalentemente a estos sitios formando aductos en el ADN, por lo que si reacciona en dos sitios distintos de la misma hebra puede producir aductos intracatenarios (65% de las veces), mientras que, si las uniones se dan entre bases de dos hebras, se formarán aductos intercatenarios, también conocidos como reticulación de hebras (5% de las veces); estos aductos también pueden incluir un solo aducto por cadena así como la unión entre una cadena de ADN y una proteína (ver *figura 6*)⁹². Dichos enlaces crean una contorsión en la cadena e imposibilitan el avance de la maquinaria transcripcional y/o replicación lo que provoca la activación de múltiples cascadas de señalización en la célula tumoral, frenando al ciclo celular y reclutando a las proteínas de los mecanismos de reparación de ADN para evitar la muerte^{89,92,93}.

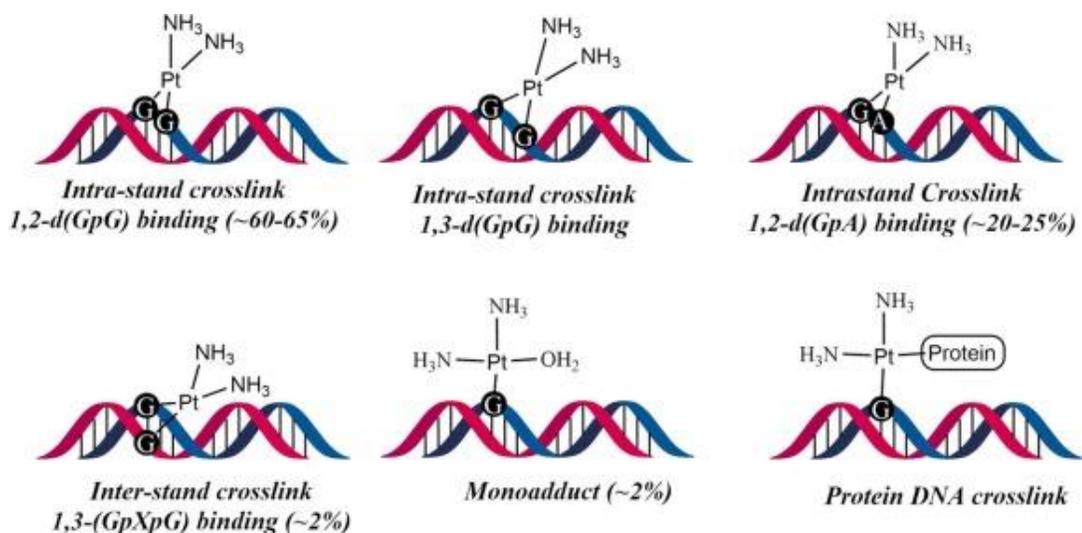


Figura 6. Aductos que el cisplatino puede formar en el ADN (tomada de Ghosh, S.⁹²)

Adicionalmente, con la unión de las moléculas de agua, el cisplatino va dejando a su paso una gran cantidad de EROS, cuya presencia es dependiente de la cantidad de cisplatino y el tiempo de exposición; sin embargo, este aumento desencadena un estrés oxidativo donde las EROS atacan a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando más daño al ADN y facilitando la muerte celular, además de que estas especies pueden inducir apoptosis mediante la vía intrínseca y extrínseca, así como provocar necrosis y autofagia. Por si eso fuera poco, el cisplatino también ataca a las mitocondrias y sus biomoléculas de manera dependiente e independiente de EROS, por lo que puede interferir en la fosforilación oxidativa, los niveles de calcio celulares y facilita la salida del citocromo C, favoreciendo aún más la apoptosis^{89,92}.

Resistencia a cisplatino

Una de las grandes desventajas que ha presentado el tratamiento con cisplatino es que muchos de los tumores se vuelven resistentes a este fármaco o simplemente no reaccionan al tratamiento en ningún momento. Este fenómeno puede explicarse de varias maneras (ver figura 7)⁹⁵: La primera está relacionada con la cantidad de cisplatino que se acumula en la célula durante el tratamiento. En ese sentido, se sabe que el cisplatino puede entrar a la célula tumoral por difusión pasiva; sin embargo, el transportador de cobre CTR1 también ayuda a la entrada del cisplatino, por lo que, si

su expresión disminuye, la entrada de cisplatino se verá afectada también. Con respecto a esto, hay autores que sugieren que la cantidad de aductos generados en el ADN por cisplatino puede ser proporcional a los niveles de expresión de CTR1; no obstante, otros autores afirman que esto podría variar entre tipos celulares^{93,95}.

La acumulación de cisplatino no solo se ve influenciada por la entrada, sino también por la salida. Existen varios transportadores celulares que son capaces de excretar el cisplatino, incluidas varias proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) y algunas ATPasas transportadoras de cobre (ATP7A y ATP7B). Por lo tanto, si estos transportadores se sobre-expresan en las células, el cisplatino será excretado de manera muy eficiente. Además, se ha reportado que la proteína transmembranal 4β-35 asociada al lisosoma (LAPTM4b-35) es capaz de interactuar con la glicoproteína P (también conocida como MDR1), activando la vía de PI3K/AKT que provoca la resistencia a múltiples fármacos incluido el cisplatino, gracias a que facilita su excreción^{95,96}.

El siguiente mecanismo de resistencia ocurre cuando el cisplatino que entra es metabolizado rápidamente por moléculas intracelulares. Por ejemplo, el glutatión es una proteína que tiene grupos tiol, capaces de reaccionar con moléculas como las EROS y el cisplatino, lo que provoca su neutralización. Si eso ocurre, aunque haya suficiente concentración de cisplatino intracelular, este es incapaz de reaccionar con su blanco; además, al unirse glutatión-cisplatino, el cisplatino es excretado mediante bombas de exportación conjugadas. Existen otras moléculas con grupos tiol, como las metalotioneínas, que pueden neutralizar al cisplatino evitando daño, por lo que algunos autores mencionan que, si estas proteínas o el glutatión son abundantes en la célula, contribuyen a la resistencia al cisplatino^{92,95,97}.

Otros autores han reportado que la sobre expresión de genes relacionadas con la transición epitelio mesénquima como TWIST1, SNAIL, y N-cadherina en las células tumorales está relacionada con la resistencia a cisplatino. TWIST1 ha demostrado favorecer la expresión de proteínas como la glicoproteína P, que ayuda a la exclusión

del cisplatino. Mientras que SNAIL y N-cadherina podrían ayudar a la supervivencia celular favoreciendo la migración y malignidad en presencia de grandes cantidades del fármaco, lo que permite a las células cancerosas escapar del fármaco en las etapas tardías del tratamiento ayudando a la resistencia^{95,98}.

También se ha mencionado que algunas familias de miRNAs pueden colaborar en la respuesta a cisplatino. Por ejemplo, se ha relacionado la sobre expresión del miR-181 con la evasión de apoptosis en las células tumorales tratadas con cisplatino, así como con el silenciamiento de proteínas como DICER y TRBP2, lo cual evita la maduración de otros miRNAs^{92,95}. La sobre expresión de miR-155, por su parte, ha demostrado favorecer la resistencia al cisplatino en varios tipos celulares, incluidos de cabeza y cuello⁹⁹, de colon¹⁰⁰ y pulmón¹⁰¹; interesantemente, se reportó que en células de CaCu, la sobre expresión de miR-155 disminuía la resistencia al cisplatino¹⁰². De manera similar, la expresión ectópica de miR-214 indujo apoptosis y aumentó la sensibilidad al cisplatino inhibiendo la expresión de proteínas anti-apoptóticas en células de CaCu¹⁰³.

El siguiente mecanismo de resistencia se observa cuando los niveles de cisplatino intracelular son suficientes para dañar el ADN. En este caso, el cisplatino cumple su cometido y forma aductos, los cuales, si no son reparados adecuadamente, se acumulan, provocando la muerte de la célula. Sin embargo, se ha reportado que las células tumorales resistentes a cisplatino tienen una capacidad mejorada para tolerar un alto nivel de lesiones no reparadas o para reparar dichos aductos, por lo que los daños causados por el cisplatino prácticamente no afectan a estas células. En ese sentido, se ha visto que algunas proteínas de la vía de reparación de apareamientos erróneos (MMR por sus siglas en inglés) se encuentran expresadas a la baja en células tumorales resistentes a cisplatino mientras que otras pertenecientes a la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés) se encuentran sobre expresadas, ayudando en la reparación eficiente de los aductos^{93,95}.

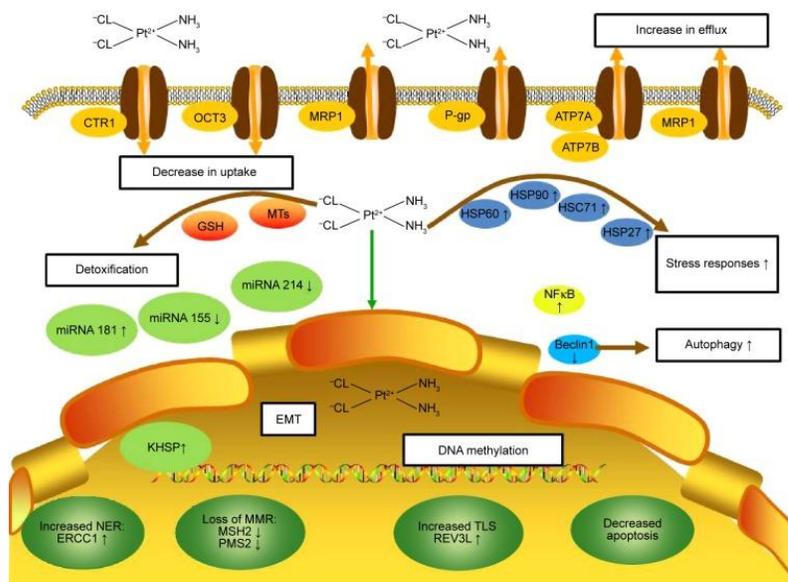


Figura 7. Mecanismos de resistencia a cisplatino (tomada de Zhu, H.⁹⁵)

Reparación de aductos causados por cisplatino

Los aductos en el ADN causados por el cisplatino son reparados principalmente por la vía de NER, mencionada anteriormente, que como su nombre lo indica, elimina daños producidos en los nucleótidos por mutágenos o citotoxicidad. Esta vía de reparación elimina los dímeros de pirimidinas, enlaces cruzados y aductos. Para ello, este mecanismo cuenta con proteínas que son capaces de reconocer el daño, cortar la región varios nucleótidos alrededor de la región dañada y “rellenar” el espacio. De esta manera, los aductos son eliminados y los procesos celulares continúan¹⁰⁴. Estos aductos también pueden ser reconocidos por el mecanismo de MMR, pero este mecanismo solo puede reparar errores como inserciones o deleciones postreplicativas, que causan apareamientos erróneos formando un aducto por la falta de complementariedad en las bases. Entonces, aunque puede reconocer lesiones causadas por agentes como el cisplatino, esta vía no puede reparar las lesiones, pues al ser un mecanismo postreplicativo, únicamente elimina la base de la hebra recién sintetizada, que en este caso es la base correcta y el aducto está formado por cisplatino, por lo que el mecanismo de MMR tratará de reparar el daño

“indefinidamente” sin conseguirlo. Este proceso de cortes indefinidos puede causar más daño en el ADN y colaborar en la activación de apoptosis¹⁰⁵.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los aductos formados por cisplatino pueden producir indirectamente rupturas de doble hebra al atascar la maquinaria transcripcional. Estas rupturas de doble hebra deben ser reparadas por los mecanismos de reparación de ruptura de doble hebra como la vía de reparación por recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) o por la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés)⁹³.

Reparación de Rupturas de Doble Hebra

Los dos mecanismos principales de reparación de ruptura de doble hebra son la HR y NHEJ. La principal diferencia entre estos dos radica en que la recombinación homóloga es un mecanismo de reparación de rupturas de doble hebra que se considera libre de errores y que es fundamental para la meiosis y durante las fases S y G2 del ciclo celular, porque necesita de una plantilla homóloga para rellenar el espacio eliminado sin ningún error, para ello utiliza la cromátida hermana y la toma de molde, por lo que no puede estar activa en las demás fases del ciclo celular. Por otro lado, la reparación por unión de extremos no homólogos se considera una vía susceptible a errores, pues no utiliza una plantilla, esto le permite estar activa prácticamente durante todo el ciclo celular¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, salvo en la fase M, para asegurar la división celular adecuada, ambas vías están suprimidas¹⁰⁹.

Aunque estos son los dos mecanismos principales, existen otros submecanismos que pueden utilizar maquinaria de ambas vías como la vía de recocido de una sola hebra (SSA por sus siglas en inglés)¹¹⁰ o de una sola vía, como la vía de reparación por unión de extremos no homólogos alternativa (Alt-NHEJ por sus siglas en inglés) también conocida como reparación por unión de extremos no homólogos mediada por microhomología (MME-NHEJ por sus siglas en inglés)¹¹¹. Estos dos submecanismos, al igual que la reparación por recombinación homóloga comparten una característica: las 3 requieren un grado de homología entre las 2 hebras. Se ha reportado que la vía

de HR requiere grandes regiones de homología, de alrededor de 100 pb, mientras que la vía de SSA requiere regiones de homología mayores a 20 pb y la vía MME-NHEJ requiere entre 2 y 20 pb, aunque generalmente son regiones menores a 4 pb, de ahí el nombre de microhomología^{110,112}. Considerando lo anterior, para localizar las regiones con diferentes grados de homología que requieren estas 3 vías para funcionar, es necesario que otras proteínas reconozcan el daño y procesen los extremos hasta dejar al descubierto las regiones homólogas, este paso es determinante para la elección de la vía^{111,113}.

La elección entre una vía y la otra para reparar el daño es dependiente de varios factores; por ejemplo, como ya se mencionó anteriormente, la reparación por recombinación homóloga es funcional durante las fases S y G2 del ciclo celular, cuando hay una cromátida hermana para usar de plantilla; además, las CDK de estas fases modulan la fosforilación de proteínas necesarias para el funcionamiento de HR y NHEJ, tal es el caso de 53BP1, CtIP, BRCA2, NBS1, Exo1 y DNA2, solo por mencionar algunas^{109,114}. Lo anterior es importante ya que de estas proteínas depende la resección de los extremos de ADN que dejará al descubierto los sitios homólogos y, por ende, la elección de la vía¹⁰⁹.

Reparación por unión de extremos no homólogos

El mecanismo de esta vía puede resumirse en 4 pasos principales: 1. Reconocimiento del extremo del ADN roto y ensamblaje del complejo NHEJ en el sitio dañado; 2. Formación del puente entre los extremos del ADN y estabilidad; 3. Procesamiento final de los extremos de ADN; y 4. Unión y ligación de los extremos y disolución del complejo de NHEJ^{115,116}. Estos pasos se muestran en la *figura 8* y a continuación se describen más detalladamente.

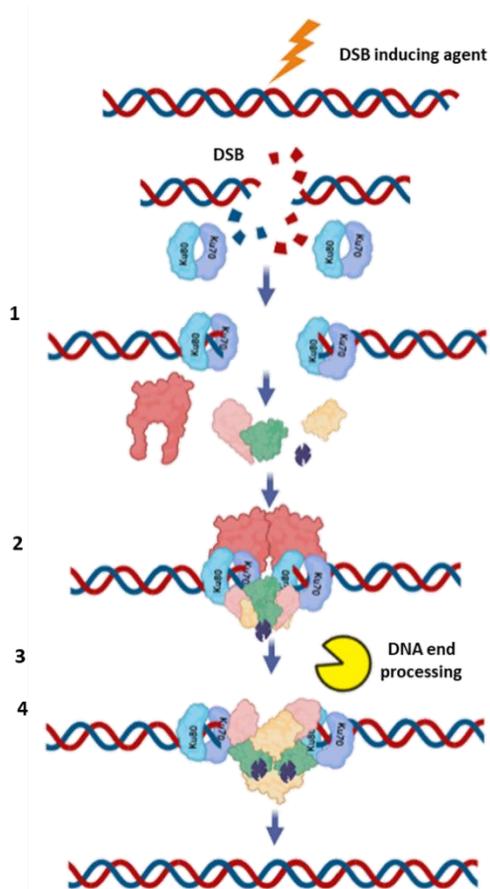


Figura 8. Vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).

El primer paso, y según muchos autores el más importante, es el reconocimiento del daño por el heterodímero Ku70/Ku80, que tiene una alta afinidad a los extremos de ADN, gracias a que se une a la columna vertebral de desoxirribosas en el ADN, y nunca interactúa con las bases, por lo que su afinidad es independiente de la secuencia. Además, es un heterodímero altamente expresado en la mayoría de las células, lo que favorece su unión a los extremos del ADN a la vez que evita la unión de proteínas pertenecientes a otras vías, como el complejo MRN, de esta manera, favorece la reparación por NHEJ y mantiene la estabilidad de las hebras, evitando que sufran un procesamiento inespecífico por otras nucleasas celulares^{115,117}.

El heterodímero, Ku70/80, además de ser el encargado del reconocimiento de daño, funciona también como andamio para reclutar al resto de proteínas de la maquinaria de la vía de reparación NHEJ y ayudar en la activación de algunas de ellas. Por ejemplo,

el complejo Ku70/80 debe unirse a DNA-PKC para que la DNA-PKC se vuelva activa, ya que el complejo Ku-ADN activa a la subunidad catalítica de la cinasa; sin embargo, para que esto ocurra, Ku debe sufrir un cambio conformacional que sólo ocurre en presencia de ADN¹¹⁸. De igual manera, Ku70/80 recluta directamente a la proteína XRCC4, a la Ligasa IV y a los factores XLF y APLF al sitio de daño¹¹⁹⁻¹²¹. Indirectamente Ku70/80 recluta a la nucleasa Artemis, al activar a DNA-PKC, de manera similar, otras proteínas como la polimerasa μ , la helicasa WRN, entre otras, se unen al estar Ku en presencia de XRCC4 y Ligasa IV. Posteriormente, para el segundo paso, que es la formación del puente, se ha planteado que las proteínas XRCC4 y XLF pueden formar un filamento helicoidal que une ambos extremos y los mantiene estables. Adicionalmente, se ha mencionado que la proteína DNA-PKcs también podría mantener unidos los extremos en colaboración con Ku70/Ku80¹²².

El siguiente paso, que se considera el tercero, es requerido sólo en algunas lesiones, pues consiste en el procesamiento de los dos extremos de ADN para que sean ligables. Para ello pueden requerirse diferentes enzimas como las polimerasas μ y λ , nucleasas como Artemis, Aprataxina y APLF, quinasas/fosfatasas como PNKP, entre otras, según sea el caso. Por ejemplo, si se requiere una resección, la eliminación de grupos (OH o fosfatos), o relleno de huecos, estas proteínas son las que garantizan que los extremos sean ligables¹²³⁻¹²⁷.

Finalmente, el cuarto paso es la ligación de los extremos, para lo que se requiere una ligasa, en este caso, es la ADN ligasa IV estabilizada por XRCC4 y otras proteínas accesorias como XLF, que son las encargadas de que todos los tipos de extremos queden ligados¹²⁸. Una vez que ha finalizado este proceso de manera adecuada y el daño ha sido reparado, toda la maquinaria se disocia del sitio recién reparado, dejando a la doble hélice intacta^{115,116}.

Resveratrol

El resveratrol (3,4', 5-trihidroxiestilbeno) es un compuesto polifenólico de origen natural cuya estructura consiste en dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace

de metileno. Los anillos tienen unidos tres grupos hidroxilo, cuya posición confiere a este compuesto su actividad biológica. Debido a la posición del enlace de metileno se generan dos formas isoméricas: cis-resveratrol y trans-resveratrol. La forma trans es naturalmente la forma principal, además de que posee mayor estabilidad y potencia, por lo que es la más estudiada y a la que nos referimos en este trabajo (ver *figura 9*)^{129,130}.

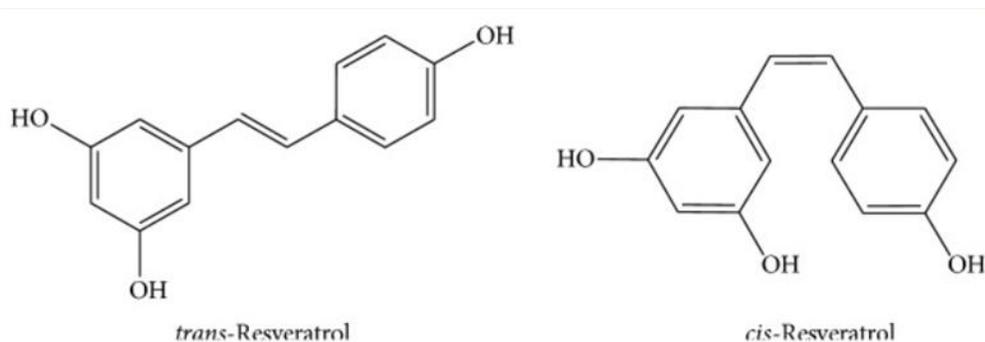


Figura 9. Estructura de los dos isómeros de resveratrol (tomada de Gambini, J.^{130,131})

El resveratrol es una fitoalexina producida por diferentes especies de plantas como respuesta a agentes estresores tales como infecciones microbianas y fúngicas, rayos UV, y lesiones mecánicas. Dentro de las plantas que lo producen, una gran variedad de ellas se encuentran incorporadas en nuestra dieta, como lo son los cacahuates, bayas, arándanos y moras, piña, soya, granada, uvas rojas y el vino^{129,131}. Debido a esto, el resveratrol ha sido ampliamente estudiado en los últimos años y se ha demostrado que tiene muchas cualidades y puede participar en diferentes procesos biológicos mediante varios mecanismos de acción.

Una de las funciones más importantes del resveratrol es la antioxidante, y debido a que el estrés oxidativo es causa de una gran cantidad de padecimientos de todo tipo, el resveratrol puede inhibir la progresión de varias enfermedades que incluyen procesos oxidativos, como las cardiovasculares, neurodegenerativas y el cáncer^{129,130}. Además, también se considera un agente natural preventivo para enfermedades como diabetes, síndrome metabólico, entre otras; Así mismo se ha descrito que el resveratrol presenta actividad anti-viral y microbiana, anti-hisquémica, anti-

inflamatoria, inmunomoduladora y anti-envejecimiento^{129,132,133}. Además, diferentes estudios han demostrado que el resveratrol tiene propiedades analgésicas, y que puede reducir lesiones en órganos¹³⁴ como el riñón (nefropatía diabética, fibrosis renal, lesión renal inducida por fármacos, entre otras)^{135,136}, médula espinal (isquemia de médula espinal, lesión causada por neuroinflamación)¹³⁷, hígado (esteatosis, fibrosis hepática, daño hepático colestásico, hepatocarcinoma, entre otros)¹³⁸, pulmones (lesión pulmonar aguda, EPOC)^{139,140}, intestino y colon (enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, cáncer colorrectal, entre otros)¹⁴¹.

El enfoque de este trabajo está centrado en las cualidades del resveratrol como un compuesto anticancerígeno. En ese sentido, actualmente se sabe que el resveratrol puede inhibir el inicio y la progresión del cáncer en diferentes etapas debido a que puede interactuar con una variedad de dianas celulares.

El resveratrol tiene una estructura similar al estrógeno, una hormona femenina, por lo que es considerado un fitoestrógeno¹⁴², esto le permite unirse a receptores celulares como el receptor de estrógenos (ER) alfa y beta y actuar como agonista/antagonista, aunque no posee una afinidad comparable al estradiol. Al unirse a estos receptores, el resveratrol puede tanto favorecer como bloquear su unión a elementos de respuesta a estrógeno (ERE) dependiendo el elemento, así como el funcionamiento de coactivadores y correpresores y de esta forma intervenir en la transcripción de genes¹⁴³ tal es el caso de la interleucina 6 (IL-6), cuya expresión se ve inhibida de manera dependiente de resveratrol a través del ER α ¹⁴⁴. También se ha planteado que el resveratrol puede intervenir en el desarrollo de tumores que sean dependientes de estrógeno como algunos tumores de mama, inhibiendo su crecimiento. En ese sentido, se ha reportado que el resveratrol puede disminuir la expresión de genes como BRCA1/2 en líneas celulares de cáncer de mama dependiendo del estado de los receptores de estrógeno y el contexto celular¹⁴⁵. De manera similar, se ha visto que resveratrol puede interactuar con integrinas¹⁴⁶, y mediante esta interacción, induce apoptosis dependiente de p53, gracias a la

activación de ERK1/2 y cPKC¹⁴⁷. Adicionalmente, funciona como un antagonista del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR por sus siglas en inglés) inhibiendo la expresión de genes como el citocromo P-450 1A1 y la interleucina-1 β ¹⁴⁸. Por otro lado, como la mayoría de los polifenoles, el resveratrol puede ser absorbido pasivamente y una vez en el organismo, es capaz de interactuar con biomoléculas tales como lipoproteínas, ácidos grasos y proteínas de suero que lo ayudan en el transporte *in vivo*; adicionalmente, resveratrol puede asociarse con glucurónidos y sulfatos que le permiten atravesar transportadores celulares como MRP2/3 y BCRP¹⁴⁹. Esto podría explicar el hecho de que el resveratrol tiene un efecto pleiotrópico.

Los mecanismos de inhibición del resveratrol en cáncer incluyen el arresto del ciclo celular, la muerte celular, inhibición de angiogénesis y metástasis; esto gracias a que es capaz de modular a diversos factores de transcripción, cinasas y genes directamente implicados. Por ejemplo, resveratrol puede arrestar el ciclo celular mediante la regulación de varios genes que participan en este proceso, tal es el caso de p53, cuya activación por resveratrol puede ocurrir a través de la lisina metil transferasa 7/9 (SET 7/9)¹⁵⁰, esta activación induce a p21, lo que provoca la detención del ciclo celular en la fase G1¹⁵¹; además, la activación de estas proteínas genera la reducción de otras proteínas como la ciclina D, la ciclina B y las cinasas dependientes de ciclina 2 y 4 (CDK2 y CDK4) causando el arresto del ciclo celular^{152,153}. También se ha demostrado que resveratrol suprime a la ciclina D a través de la inhibición de STAT3, reduciendo la proliferación celular¹⁵⁴. Resveratrol también es capaz de inhibir directamente a ciclina D1/CDK4, lo cual provoca el arresto del ciclo celular en la fase G0 / G1 y el aumento de las ciclinas A y E, favoreciendo la acumulación de las células en las fases G2/M y S¹⁵⁵. Resveratrol también detiene el ciclo celular en G0/G1 al inhibir directamente a ciclina D1, CDK4 y CDK6 a la vez que aumentaba los niveles de las proteínas p21 y p27¹⁵⁶.

Por otro lado, se sabe que el resveratrol no tiene efectos citotóxicos en células normales¹⁵⁷; sin embargo, se ha reportado que en varios tipos de células cancerosas es capaz de inducir varios tipos de muerte celular. Resveratrol es capaz de inducir

apoptosis a través de diferentes vías¹⁵⁸, por ejemplo, en la vía extrínseca, que es dependiente de los receptores de muerte Fas y TNF, el resveratrol puede redistribuir a Fas y activar a las caspasas intracelulares desencadenando apoptosis¹⁵⁹. Resveratrol también puede activar la vía intrínseca al causar una pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células cancerosas, lo que provoca la producción de EROS, la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular, la activación de caspasas y la fragmentación del ADN¹⁵⁸. Resveratrol también puede estimular la fosforilación oxidativa y reducir los niveles de calcio mitocondrial¹⁶⁰, provocando la liberación del citocromo y la activación de Smac/DIABLO¹⁶¹. Adicionalmente, resveratrol puede inhibir la actividad de PI3K y de esta manera disminuir la actividad de las vías PI3K/AKT/mTOR y PI3K/AKT/FOXO lo que potencia la inducción de apoptosis¹⁶². En esta misma vía, resveratrol disminuye la fosforilación de Akt, que es necesaria para evitar la traslocación de la proteína proapoptótica Bax a la mitocondria y la fragmentación del ADN celular¹⁶³. Además, resveratrol es capaz de modular factores maestros como p53, STAT3 y NF- κ B de manera que inhiben a proteínas como la proteína antiapoptótica Bcl-2^{150,162,164}.

Además de apoptosis, resveratrol ha demostrado favorecer otros tipos de muerte celular, como lo son la autofagia, al favorecer la expresión de genes relacionados con este proceso como lo son el factor relacionado con la autofagia 5 (ATG5 por sus siglas en inglés) y Beclin-1¹⁶⁵, y aumentar la fosforilación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), lo que genera una reducción en los niveles de fosforilación de mTOR, un gen muy importante en este proceso¹⁶⁶. De igual manera, resveratrol favorece la necrosis al favorecer la expresión de IFN- γ a la vez que inhibe a TGF- β ¹⁶⁷.

En el caso de la angiogénesis, se sabe que resveratrol es capaz de inhibir genes como el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), cuya acumulación se reduce después del tratamiento con resveratrol¹⁶⁸. HIF-1 α es un factor de transcripción que induce la expresión de otros genes que favorecen la formación de vasos sanguíneos, tal es el caso del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Además de inhibir directamente a HIF-1 α , resveratrol puede inhibirlo indirectamente al inhibir por

ejemplo a COX-2, CDK5, p42/p44 MAPK y p70S6K genes cuya sobre activación favorece a HIF-1 α y por ende, la angiogénesis¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Además de suprimir la actividad de los factores anteriormente mencionados, resveratrol también ha demostrado inhibir la angiogénesis mediante la inhibición de VEGF¹⁷¹; adicionalmente, resveratrol también inhibe la angiogénesis al aumentar la actividad de p53 y trombospondina-1 (TSP1), una proteína río abajo de p53, que bloquea directamente los efectos de VEGF en las células endoteliales¹⁷². De igual manera, se ha reportado que resveratrol interfiere en la angiogénesis al inhibir la activación de factores angiogénicos como EGFR y FGF-2, además de inhibir a HIF-1 α y VEGF de manera dependiente de la inhibición de las vías PI3K/Akt y MAPK¹⁵⁷.

Por otro lado, se sabe que resveratrol puede inhibir la transición epitelio mesénquima (TEM) el proceso previo a la metástasis, y también la metástasis al inhibir genes que participan en este proceso, tal es el caso de la vía PI3K/AKT que como se ha mencionado, la cual es inhibida por el tratamiento con resveratrol; en ese sentido se ha planteado que este compuesto causa aumento en la expresión de Sirt-1, lo cual podría ser clave en la supresión de la vía PI3K/AKT y el debilitamiento de la EMT¹⁷³. Adicionalmente, resveratrol demostró frenar la mitosis y revertir la TEM mediante la inhibición de la vía AKT/GSK-3 β /Snail en un modelo de cáncer de colon, favoreciendo además la expresión de E-cadherina y disminuyendo la expresión de N-cadherina¹⁷⁴. Los cambios en los niveles de cadherinas causados por resveratrol también fueron asociados con la disminución de la expresión de los factores metastásicos Slug y vimentina, lo que favorece la sobreexpresión de claudina-2, una proteína medular en las uniones estrechas y gap¹⁷⁵. Adicionalmente, resveratrol también puede regular a la baja Snail y vimentina, a la vez que favorece la expresión de E-cadherina al intervenir en la vía de TGF- β 1/Smads en el cáncer de colon¹⁷⁶. De manera similar, en un modelo de cáncer de vejiga, resveratrol demostró promover la expresión de E-cadherina y ZO-1, y reducir la expresión de N-cadherina y vimentina de manera dependiente de STAT3/Twist¹⁷⁷. Algo similar se observó en modelos de cáncer gástrico, donde se vió que resveratrol es capaz de inhibir la vía hedgehog al reducir la

expresión del factor de transcripción Gli-1, así como de Snail y N-cadherina, mejorando la expresión de E-cadherina¹⁷⁸. En este tipo de cáncer, resveratrol también puede frenar TEM al inactivar la vía de Wnt/ β -catenina¹⁷⁹. Por otro lado, resveratrol también ha demostrado disminuir la expresión de factores de pluripotencia como Oct4, Nanog y Nestin, cuya disminución, trae como consecuencia la inhibición de los marcadores de TEM Slug, ZEB1, N-cadherina y vimentina en un modelo de cáncer de cabeza y cuello¹⁸⁰. Adicionalmente, resveratrol ha demostrado disminuir la expresión de algunas metaloproteinasas de matriz como la 2 y la 9 (MMP-2 y MMP-9)¹⁷⁶ así como del lncRNA MALAT1 (Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis)¹⁸¹, factores muy importantes en la TEM y que favorecen la metástasis¹⁸².

En CaCu el resveratrol es capaz de regular positivamente a p53, con lo que detiene a las células en la fase G2 del ciclo celular. Además de aumentar la permeabilidad lisosomal, promoviendo autofagia^{183,184}. De igual manera, induce apoptosis mediante la activación de las caspasas-3 y -9, y al favorecer la expresión de Bax, a la vez que disminuye la expresión de Bcl-2 y Bcl-xl; adicionalmente, aumentó la expresión de p53¹⁸⁴. En este mismo tipo de cáncer, resveratrol demostró inhibir la activación de ERK2, p38 y JNK1¹⁸⁵; sin embargo, el contexto celular y la concentración de resveratrol puede tener distintos efectos, ya que es bien sabido que bajas concentraciones de resveratrol inducen la activación de ERK1/2 en varios tipos celulares^{186–188}.

Adicionalmente, se ha reportado que el resveratrol es capaz de reducir el tamaño de los xenoinjertos de tumores subcutáneos provenientes de células HeLa en ratones e inhibir la proliferación de las células tumorales así como el desarrollo de la carcinogénesis cervical al inhibir los niveles de ARN mensajero de las oncoproteínas de VPH E6 y E7, y de esta manera, restaurar la función de p53 y pRB que las oncoproteínas virales mantienen inactivas, lo cual ayuda a la regulación del ciclo celular y promueve apoptosis dependiente de p53¹⁸⁹.

Además de inhibir la progresión del CaCu el resveratrol ha demostrado tener actividad anti-metastásica al inhibir proteínas como las metaloproteinasas de matriz, específicamente a MMP-9, mediante la activación de JNK y la inhibición de NF- κ B, AP-1 y PKC¹⁹⁰. También se ha reportado que disminuye la expresión de MMP-3 y MMP-13 y otros marcadores como N-cadherina y vimentina de TEM, mientras que induce aumento en el nivel de E-cadherina y disminuye la fosforilación de STAT3, cuya fosforilación y activación promueve metástasis en CaCu¹⁹¹.

Por otro lado, al combinarse con cisplatino o doxorrubicina, el resveratrol tiene un efecto más marcado de la inhibición del crecimiento en células tumorales de CaCu^{192,193}.

ANTECEDENTES

Es importante mencionar, que el resveratrol, al igual que otros compuestos naturales, ha demostrado tener un efecto quimiosensibilizador en combinación con varios tipos de fármacos, incluido el cisplatino, con lo cual se ha demostrado que el tratamiento combinado puede lograr efectos sinérgicos o aditivos en varios tipos de cáncer, esto gracias a la intervención del resveratrol en una gran cantidad de vías celulares¹⁵⁷.

Se ha demostrado que el tratamiento combinado inhibe más eficazmente la proliferación y crecimiento celular, mientras que favorece la inducción de apoptosis y autofagia^{194,195}. Además, si se usa resveratrol, la cantidad de cisplatino que se necesita para ver un efecto citotóxico es menor que si se usa el cisplatino solo, porque se aumentan los niveles intracelulares de cisplatino, lo que indica que el resveratrol puede tener un efecto potenciador, que en un modelo in vivo puede aumentar la supervivencia del organismo, a la vez que favorece la captación del fármaco y disminuye los efectos citotóxicos de usar dosis altas de cisplatino¹⁹⁶. Interesantemente, el uso de resveratrol puede hacer “selectivo” el daño del cisplatino afectando a las células cancerosas, pero no a las células sanas¹⁹⁶⁻¹⁹⁸, por ejemplo, se demostró que el tratamiento con resveratrol potencia el efecto del cisplatino en células de hepatoma, lo cual no ocurrió en células hepáticas normales; esto ocurrió ya que resveratrol demostró promover la apoptosis y disminuir la expresión del transportador de glutamina ASCT2, este transportador favorece la entrada de glutamina en la célula, la cual se convierte en glutatión y ayuda a la rápida eliminación del cisplatino¹⁹⁸. Por otro lado, en otro estudio se mencionó que en células de cáncer de ovario que se cultivaron en contacto permanente con resveratrol y posteriormente empezaron a ser tratadas con cisplatino, el resveratrol pudo prevenir el desarrollo de resistencia a cisplatino; sin embargo, una vez que se ha desarrollado la resistencia, el tratamiento con resveratrol es incapaz de revertirla¹⁹⁹, mientras que otros estudios han demostrado que el resveratrol sí es capaz de sensibilizar a las células de cáncer de mama resistentes a cisplatino, por ejemplo de manera dependiente de p53 a la vez que favorece apoptosis^{200,201}. El resveratrol también ha demostrado sensibilizar a las

células cancerosas de ovario^{199,202}, mama²⁰⁰, glioblastoma²⁰³, cáncer gástrico²⁰⁴ y pulmón¹⁹⁴ al tratamiento con cisplatino favoreciendo el daño al ADN y la apoptosis²⁰¹. En ese sentido, existen algunos reportes donde se ha demostrado que el resveratrol en combinación con cisplatino o solo, es capaz de intervenir en las vías de reparación de ADN mediante la modificación de los patrones de expresión de genes que forman parte de ellas²⁰⁵, tal es el caso de la proteína ERCC1, de la vía de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés) y en la reparación de enlaces cruzados, cuya expresión disminuye tras el tratamiento con resveratrol²⁰⁶, lo mismo ocurrió con la proteína XRCC1 de la misma vía²⁰⁷. De igual manera, resveratrol disminuye la expresión de FEN1 y PCNA de BER de parche largo o evita su interacción de manera dependiente de p21^{208,209}, y es capaz de disminuir la eficiencia de la vía de recombinación homóloga al inhibir a sus componentes NBS1, MRE11, RAD51 y ATM²¹⁰⁻²¹³. Adicionalmente, la fosforilación de la histona H2AX también disminuye, evitando la reparación del daño en el ADN²¹¹.

Además, en el estudio de Sánchez-Vizcarra, realizado en nuestro grupo de trabajo, se determinaron las concentraciones de la combinación de resveratrol y cisplatino, para conocer si existía un efecto sinérgico en las líneas de células derivadas de CaCu C-33A, HeLa y SiHa. Además en este trabajo se demostró que el resveratrol puede disminuir la expresión de la proteína ATM y RAD51 de forma dependiente de la dosis, aunque el efecto sobre RAD51 fue dependiente de la línea celular²¹⁴.

En otro estudio se ha revelado que el resveratrol también puede intervenir en otras vías de reparación de rotura de doble hebra como la vía de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), específicamente la vía de reparación por micro-homología de una manera dependiente de la vía de ATM/ATR²¹⁵. Lo anterior podría indicar que el tratamiento con resveratrol interfiere en los mecanismos de reparación de roturas de doble hebra y que muy probablemente podría sensibilizar a las células de CaCu al tratamiento con cisplatino gracias a la disminución de la reparación del daño al ADN por estas vías de reparación. Esto es importante porque ambas vías han sido relacionadas con la carcinogénesis. Por ejemplo, en varios tipos de cáncer, la

expresión de la proteína Rad51 de la RH está sobre expresada, y se le ha asociado con una pobre respuesta al tratamiento y, por ende, a un mal pronóstico²¹⁶.

Es importante mencionar que la vía de NHEJ si bien es propensa a errores, es fundamental para mantener la integridad genómica ya que su funcionamiento adecuado evita traslocaciones y aberraciones cromosómicas que pueden terminar en algo más grave²¹⁷. Por lo que, la expresión diferencial de las proteínas que participan en esta vía puede tener efectos diversos. Por ejemplo, la eliminación de las proteínas Ku70 y Ku80 en ratones ha demostrado radiosensibilidad, traslocaciones, aneuploidía e inestabilidad genómica, envejecimiento prematuro y defectos linfocitarios, además de una mayor predisposición al desarrollo de tumores como linfomas y varios tipos de tumores hepáticos. Y aunque en humanos no se han encontrado individuos con Ku70/Ku80 mutada o inexistente, se ha encontrado una sobre-expresión del heterodímero Ku70/Ku80 en varios tipos de cáncer y se les ha asociado con un mal pronóstico, pues han demostrado favorecer proliferación, progresión y metástasis, así como una menor probabilidad de supervivencia en pacientes con varios tipos de cáncer, incluidos, el cáncer colorrectal, gástrico, de mama, de endometrio, de pulmón y piel²¹⁸⁻²²¹. Adicionalmente, la sobre-expresión de estas proteínas ha demostrado favorecer la resistencia a la terapia, ya sea mediante radiación o mediante quimioterapéuticos^{221,222}. En ese sentido, un estudio demostró que la sobre-expresión de Ku80 favorece la resistencia al tratamiento con cisplatino en pacientes con adenocarcinoma pulmonar^{217,222}. Mientras que la baja expresión del heterodímero ha demostrado una mayor sensibilidad a la radio y quimioterapia en pacientes con cáncer de ovario, CaCu y próstata²¹⁷.

Debido a esto, existe un gran interés en tratar de inhibir la expresión de proteínas participantes en esta vía, con la intención de sensibilizar a los pacientes al tratamiento con quimio o radioterapia en cáncer²¹⁷.

JUSTIFICACIÓN

El cisplatino es un fármaco de primera elección en el tratamiento del CaCu; sin embargo, sus efectos no son específicos y ocasiona varios efectos adversos en las pacientes, por lo que es importante encontrar un compuesto que permita disminuir la dosis necesaria para el tratamiento con cisplatino, lo cual podría mejorar considerablemente la calidad de vida de los pacientes. En este sentido, se ha reportado que el resveratrol puede funcionar como quimiosensibilizador y disminuir la expresión de genes y proteínas de diferentes vías de reparación del ADN. Por lo que, en este trabajo se propone evaluar al resveratrol como una molécula que posiblemente pueda sensibilizar a las células de CaCu y si este efecto es dependiente de la inhibición de la vía de reparación NHEJ.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efecto quimiosensibilizador a cisplatino del resveratrol en células de cáncer cervicouterino es dependiente de la inhibición de la vía de reparación NHEJ.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comprobación y determinación de ICs de resveratrol y cisplatino en líneas celulares de cáncer cervicouterino.
2. Determinar el efecto del resveratrol sobre el nivel de las proteínas clave de NHEJ (Ku70/Ku80).
3. Estudiar el efecto del resveratrol sobre el daño al ADN inducido por cisplatino.
4. Purificación y comprobación de la identidad de plásmidos con un sistema reportero específico de la vía NHEJ

HIPÓTESIS

El resveratrol funciona como un agente quimiosensibilizador mediante la inhibición de la vía de reparación del ADN NHEJ.

METODOLOGÍA

Cultivo Celular

Cuatro líneas de CaCu con diferentes características fueron utilizadas para la elaboración de este proyecto:

C-33A: Línea celular con morfología epitelial, proveniente de un carcinoma de cuello uterino humano. Esta línea celular no tiene infección por VPH pero tiene sobreexpresada una p53 mutante de tipo R273C²²³.

HeLa: Línea celular con morfología epitelial proveniente de adenocarcinoma de cuello uterino humano. Esta línea celular está infectada por VPH de tipo 18 y tiene secuencias del virus integradas²²⁴.

SiHa. Línea celular con morfología epitelial proveniente de un carcinoma de células escamosas de cuello uterino humano. Esta línea celular está infectada por VPH de tipo 16 y tiene secuencias del virus integradas²²⁵.

CaSki: Línea celular con morfología epitelial proveniente de un carcinoma epidermoide de cuello uterino humano. Esta línea celular tiene integrado el genoma de VPH de tipo 16 y secuencias relacionadas con VPH de tipo 18²²⁶.

Las líneas celulares C-33A, HeLa y SiHa fueron cultivadas en medio DMEM (1195-065) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), sin antibiótico. Mientras que la línea celular CaSki se cultivó en medio RPMI (11875-093) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), sin antibiótico. El cultivo se realizó a 37°C con 5% de CO₂ en condiciones de humedad.

Curva de crecimiento celular en placas adherentes de 24 pozos

Para determinar el número de células necesarias para los siguientes experimentos se realizaron curvas de crecimiento celular de acuerdo con lo siguiente.

C33-A: se sembraron 8,000, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000 y 30,000 células por triplicado en una placa de 24 pozos con 800 µL de medio por pozo, y se dejaron crecer por 4 días en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. De acuerdo con

lo observado, se determinó sembrar 30,000 células para los experimentos posteriores.

HeLa: se sembraron 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000 y 9,000 células por triplicado en una placa de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo, y se dejaron crecer por 3 días en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. De acuerdo con lo observado, se determinó sembrar 9,000 células para los experimentos posteriores.

SiHa: se sembraron 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, 30,000 y 35,000 células por triplicado en una placa de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo, y se dejaron crecer por 3 días en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. De acuerdo con lo observado, se determinó sembrar 18,000 células para los experimentos posteriores.

CaSki: se sembraron se sembraron 16,000, 18,000, 20,000, 22,000, 24,000, 26,000, 28,000 y 30,000 células por triplicado en una placa de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo, y se dejaron crecer por 3 días en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. De acuerdo con lo observado, se determinó sembrar 16,000 células para los experimentos posteriores.

Al terminar los tiempos de tratamientos la viabilidad celular se evaluó por el método de cristal violeta, el cual se describe más adelante.

Comprobación de las ICs de resveratrol y cisplatino en placas adherentes de 24 pozos

Para comprobar las ICs previamente reportadas por Sánchez-Vizcarra, se sembraron las 3 líneas celulares en placas de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo y fueron tratadas con las concentraciones mostradas en la *tabla 1*, dependiendo de la línea celular. El resveratrol (R5010 Sigma-Aldrich) fue disuelto en etanol absoluto (EtOH), el cual fue utilizado como control de vehículo; adicionalmente, se usó también un control de medio, para evaluar el efecto del vehículo sobre las células; este tratamiento duró 48 h.

Por otro lado, el cisplatino (479306 Sigma-Aldrich) fue disuelto en solución salina (4000393 PiSA, 0.9% de cloruro de sodio) la cual también fue utilizada como control de vehículo y se usó además un control de solo medio. El tratamiento con cisplatino fue dado por 24 h y pasado ese tiempo se adicionó medio fresco por otras 24 h. Todos estos experimentos se realizaron por triplicado y al pasar los tiempos de tratamiento, la viabilidad celular se evaluó por el método de cristal violeta, el cual se describe más adelante.

Resveratrol			
	C-33A	HeLa	SiHa
IC50	90.9 μ M	123.2 μ M	164.7 μ M
Cisplatino			
	C-33A	HeLa	SiHa
IC20	1.3 μ M	15.2 μ M	6.9 μ M
IC50	5.0 μ M	31.6 μ M	25.7 μ M

Tabla 1. Dosis reportadas previamente como IC50 de resveratrol y las IC20 e IC50 de cisplatino²¹⁴

Determinación de las ICs de cisplatino en placas adherentes de 24 pozos

Para la determinación de las ICs de cisplatino en las líneas celulares, estas fueron sembradas en placas de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo y posteriormente tratadas con dosis de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ M de cisplatino disuelto en solución salina. Para este experimento se consideró un control de vehículo (solución salina) y uno de medio. El tratamiento con cisplatino duró 24 h, posteriormente, se dejó a las células con medio fresco durante 24 h más. Finalmente, la viabilidad celular se evaluó por el método de cristal violeta y se utilizó el software sigma plot para determinar las nuevas ICs.

Determinación de la IC50 de resveratrol para la línea celular CaSki en placas adherentes de 24 pozos

Para la determinación de la IC50 de resveratrol en la línea celular CaSki, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos con 800 μ L de medio por pozo y posteriormente tratadas con dosis de 50, 100, 150, 200 y 250 μ M de resveratrol disuelto en EtOH, el cual también se usó de control de vehículo; adicionalmente también se usó un control de medio. El tratamiento con resveratrol fue durante 48 h. Posteriormente, la viabilidad celular se evaluó por el método de cristal violeta y se utilizó el software sigma plot para determinar la IC50.

Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de cristal violeta

Para medir la viabilidad celular se utilizó una tinción con cristal violeta, el cual, es un colorante capaz de unirse a las proteínas y ácidos nucleicos de las células adheridas a la placa, es decir las células que quedaron vivas al finalizar el tiempo de tratamiento²²⁷.

Al terminar el tratamiento se retiró el medio de la placa de 24 pozos y se realizó un lavado con PBS para retirar los restos de medio y células flotantes. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de cristal violeta (etanol al 50%, NaCl al 0.25%, formaldehído al 1.75 % y cristal violeta al 0.75%) por pozo y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de incubación se decantó la solución y se realizaron lavados con agua hasta eliminar el exceso de colorante. Se dejó secar la placa completamente (aproximadamente 24-48 h). Una vez que la placa estuvo completamente seca, se adicionaron 600 μ L de SDS 2 % para solubilizar el colorante y se dejó en agitación hasta que la placa se destiñó por completo (40 min aproximadamente). A continuación, se tomaron 200 μ L de SDS 2% + cristal violeta de cada pozo y se colocaron en una placa de 96 pozos. Se leyó la densidad óptica a 570 nm en lector de ELISA (Accuris SmartReader 96).

Tratamientos

Para determinar el efecto del resveratrol sobre la expresión de las proteínas Ku70 y Ku80, así como su efecto en la reparación mediante NHEJ, se sembró por triplicado a las tres líneas celulares de acuerdo con lo siguiente: 332,000 células por pozo (C-33A),

111,000 células por pozo (HeLa), y 199,000 células por pozo (SiHa) en placas adherentes de 60 mm con 3 mL de medio. Posteriormente fueron tratadas con las concentraciones correspondiente a la IC50 de resveratrol para cada línea celular (ver *tabla 1*). El resveratrol fue disuelto en EtOH, el cual fue utilizado como control de vehículo ya que ha demostrado no interferir en la expresión génica y funcionar como un buen control; este tratamiento duró 48 h y el experimento se realizó por triplicado.

A partir de este tratamiento se obtuvieron los extractos celulares para realizar la extracción de proteínas que se utilizaron después para hacer western blot.

Tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino

Para evaluar el efecto del resveratrol en combinación con la IC20 y la IC50 de CP sobre la expresión de las proteínas Ku70 y Ku80 se planteó sembrar las células en panel de acuerdo con la *tabla 2*. Debido a que todos los tratamientos matan un gran número de células se sembraron varias cajas para cada tratamiento para juntarlas y obtener una cantidad suficiente de extractos celulares.

Tratamiento	Experimento	
	Western Blot	RT-qPCR
EtOH	2 cajas	2 cajas
Res	3 cajas	3 cajas
IC20 CP	3 cajas	3 cajas
IC50 CP	3 cajas	3 cajas
IC20 CP + Res	3 cajas	3 cajas
IC50 CP + Res	5 cajas	5 cajas

Tabla 2. Cantidad de cajas sembradas para cada experimento

Los tratamientos anteriores se pusieron como se describe a continuación.

EtOH: Se utilizó para disolver el resveratrol, por lo que se usó la cantidad correspondiente a la dosis más alta de resveratrol. El tratamiento duró 48h.

Resveratrol: se utilizó la concentración correspondiente a la IC50 de resveratrol para cada línea celular (ver tabla 1) y se trató a las células durante 48 h.

IC20 CP: Se utilizó la concentración correspondiente a la nueva IC20 de cisplatino. El fármaco fue disuelto en solución salina y se dio tratamiento por 24 h, enseguida se colocó medio fresco y se dejó a las células con este por 24 h más.

IC50 CP: Se utilizó la concentración correspondiente a la nueva IC50 de cisplatino. El fármaco fue disuelto en solución salina y se dio tratamiento por 24 h; posteriormente, se colocó medio fresco y se dejó a las células con este por 24 h más.

IC20 CP + Res: Se dio tratamiento con la concentración correspondiente a la IC50 de resveratrol durante 24 h y luego se adicionó la concentración correspondiente a la IC20 de cisplatino disuelto en solución salina durante otras 24 h. Posteriormente, se adicionó medio fresco, donde se quedaron las células por 24 h más. Esto debido a que se requiere al menos una replicación celular para que los daños por cisplatino, ya sea acumulación de daño o muerte celular, sean visibles y medibles.

IC50 CP + Res: Se trataron las células con la concentración correspondiente a la IC50 de resveratrol durante 24 h, enseguida se adicionó la concentración correspondiente a la IC50 de cisplatino disuelto en solución salina durante otras 24 h. Finalmente se adicionó medio fresco, donde se quedaron las células por 24 h más. Esto debido a que se requiere al menos una replicación celular para que los daños por cisplatino, ya sea acumulación de daño o muerte celular, sean visibles y medibles.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se recolectaron las células para hacer la extracción de RNA y proteínas como se describe más adelante.

Western blot para medir los niveles de las proteínas Ku70 y Ku80

Al terminar los tiempos de tratamientos, se realizó la extracción de proteínas de las tres líneas celulares usando el buffer de lisis RIPA. Una vez finalizada la extracción se realizó la cuantificación de proteínas totales en cada muestra mediante el método de Lowry. Posteriormente, para verificar la integridad y pureza de las proteínas extraídas

se corrió un gel de poliacrilamida 10% durante aproximadamente 3 horas de corrida a 100 V, luego se tiñó el gel con azul de coomasie

Una vez que se verificó la pureza e integridad de las proteínas se realizó otro gel de poliacrilamida 10% y se dejó correr por aproximadamente 3 h a 100 V. Al finalizar la corrida se realizó la transferencia húmeda en frío por 1 h y 30 min a 100 V, hacia una membrana de PVDF de 0.45 mm. A continuación, para verificar la calidad de la transferencia, se tiñó la membrana con rojo de ponceau durante 5 minutos. Se realizó un lavado con TBS-Tween durante 10 minutos y se dejó bloqueando la membrana durante una hora con 30 mL de leche 5% disuelta en TBS-Tween. Al terminar el tiempo de bloqueo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween y se dejó incubando la membrana con el anticuerpo primario para Ku70 (ab83501 abcam) usando una dilución 1:1000 en BSA (A3059 Sigma Aldrich) 3%, o Ku80 (ab119935 abcam) dilución 1:1000 en BSA 3%, según sea el caso, durante toda la noche a 4° C. Después, se dieron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween y se incubó a temperatura ambiente por 1 h la membrana con el anticuerpo secundario para Ku70 (goat anti-rabbit NB7187) dilución 1:25,000 en BSA 3% o para Ku80 (M-IgGk BP-HRP sc-516102 Santa Cruz) dilución 1:5,000 en BSA 3%, según sea el caso. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween y se revelaron las proteínas utilizando el kit de quimioluminiscencia Immobilon western chemiluminescent hrp substrate (WBKLS0500 Millipore) usando placas fotográficas. Enseguida se realizó stripping para retirar los anticuerpos antes mencionados utilizando una solución de Tris-HCl 50 mM dando dos lavados de 30 minutos. A continuación, se incubó la membrana con leche 5% durante 5 minutos. Finalmente, se incubó nuevamente a la membrana durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo contra β -actina (A3854 Sigma) dilución 1:50,000 en BSA 3%, la cual fue utilizada como control de carga. La densitometría fue realizada mediante el software Image J.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el RNeasy Mini Kit de Qiagen (74106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación.

Se complementó el buffer RLT con 10 μL de β -mercaptoetanol por cada 1mL de buffer. Se añadieron 600 μL de buffer RLT completo a cada caja con células y se raspó perfectamente la caja para retirar todas las células de su superficie, posteriormente, el buffer + células se pasó a un microtubo de 1.5 mL previamente etiquetado, y a ese tubo se añadió 1 volumen de EtOH 70% (preparado en agua libre de RNAsas) para homogeneizar el lisado. A continuación, se mezcló fuertemente la mezcla usando micropipeta y se dio vórtex por 1 minuto. Posteriormente, se transfirieron 600 μL de la mezcla a la columna (RNeasy spin column) colocada adecuadamente en el tubo colector y se centrifugó durante 20 s a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se añadieron los siguientes 600 μL a la misma columna y se repitió el procedimiento anterior. Después se añadieron 700 μL de buffer RW1 a la columna y se centrifugó por 20 s a 12,000 rpm para lavar la membrana de la columna, se desechó el sobrenadante y se añadieron 500 μL de buffer RPE a la columna y se centrifugó por 20 s a 12,000 rpm para lavar la membrana de la columna. Se desechó el sobrenadante y se añadieron otros 500 μL de buffer RPE, esta vez se centrifugó la columna por 2 minutos a 12,000 rpm para que el lavado sea más largo. A continuación, se cambió la columna a un nuevo tubo colector limpio y se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad, para eliminar cualquier resto de los buffers colocados. Posteriormente, se desechó el tubo colector con los desechos y se pasó la columna a un microtubo de 1.5 mL limpio (viene en el kit) y previamente etiquetado. Se añadieron 30 μL de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y se dejó incubar por 2 minutos, después se centrifugó durante 1 minuto a 12,000 rpm para eluir el RNA de la columna, posteriormente, el volumen eluído se volvió a pasar por la columna y se repitió el procedimiento. El ARN eluído se cuantificó con nanodrop y se llevó a una concentración de 500 ng/ μL . Posteriormente, para verificar la integridad y pureza del ARN extraído se corrieron las muestras en un gel de agarosa 1.5%. Las muestras de ARN se alicuotaron y se conservaron a -80°C . En caso de ser necesario, las muestras se trataron con DNasa I como se describe a continuación. Finalmente, una vez libres de ADN este ARN se utilizó como templado para la síntesis de cDNA.

Tratamiento con DNAsa I al ARN extraído

Para este tratamiento se utilizó el kit DNase I, RNase-free (#EN0521 Thermo Scientific) y se siguieron las instrucciones del fabricante, tal como se describe a continuación.

En un tubo libre de RNAsas se añadieron 1 µg de ARN, 1 µL de buffer de reacción 10X con MgCl₂, 1 µL (1 Unidad) de la DNAsa I, Libre de RNAsa y lo necesario de agua DEPC para alcanzar 10 µL de volumen final. Posteriormente, se incubaron las muestras a 37°C durante 30 minutos, a continuación, se añadió 1 µL del quelante EDTA 50 mM a cada tubo, y se incubaron a 65°C por 10 minutos.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814 Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, tal como se describe a continuación.

Todos los componentes del kit se descongelaron en hielo, salvo la enzima, la cual se sacó del congelador hasta ser usada. En un tubo limpio y libre de nucleasas se preparó un Master Mix que, para cada reacción contenía 2 µL de Buffer RT 10X, 0.8 µL de la mezcla de dNTPs 25X (100 mM), 2 µL de los RT Random Primers 10X, 1 µL de enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de inhibidor de RNAsas y 3.2 µL de agua libre de nucleasas (no incluida en el kit). Al tener todos los componentes en el tubo se mezcló vigorosamente. A continuación, para cada muestra se utilizaron 10 µL de Master Mix y 10 µL de cada muestra de ARN y se homogeneizó perfectamente con la pipeta. Los tubos, que hasta este momento se habían mantenido en hielo, se pusieron en el termociclador previamente configurado con las siguientes temperaturas y para un volumen final de 20 µL

Condición	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	---

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la síntesis de cDNA

Estos cDNAs se almacenaron a -20°C y se utilizaron para la realización de qPCR como se describe a continuación.

qPCR

Para la realización de esta técnica se utilizó el Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (#K0221 Thermo Scientific) como se describe a continuación.

Todos los componentes del kit se descongelaron en hielo y el master mix que contenía el SYBR green se mantuvo cubierto con aluminio ya que es fotosensible. En un tubo limpio y libre de nucleasas se preparó un master mix que, para cada reacción contenía 12.5 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 10.5 µL del agua que contenía el kit, 0.5 µL del primer forward y 0.5 µL del primer reverse de cada gen y se añadió 1µL de cDNA de cada muestra. Se colocaron en placas de 96 pozos y se corrieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit, con las condiciones que se describen a continuación

Condición	No. de ciclos			
	1 ciclo	40 ciclos		
Temperatura	95°C	95°C	59°C	72°C
Tiempo	10 minutos	15 segundos	1 minutos	30 segundos

Tabla 4. Condiciones utilizadas para la qPCR

Para este ensayo se utilizó como control el gen HPRT, que codifica para la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa y es un gen constitutivo cuya expresión no se ve modificada por el tratamiento con resveratrol.

Gen	Secuencia
HPRT (Forward)	5'-GAA CCT CTC GGC TTT CCC G-3'

HPRT (Reverse)	5'-GAA CCT CTC GGC TTT CCC G-3'
Ku70 (Forward)	5'-TGG GTT TCA AGC CGT TGG TA-3'
Ku70 (Reverse)	5'-CAG GGT TGA GCT CCC AAT CA-3'
Ku80 (Forward)	5'-ATG CAC TAA TCG TGA GCA TGG A-3'
Ku80 (Reverse)	5'-AAT CGG CTG CTG AGG TCA GT-3'

Tabla 5. Primers utilizados para la PCR en tiempo real

Inmunofluorescencia

Para evaluar la localización de las proteínas Ku70 y Ku80 después del tratamiento con resveratrol se usó la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para dichas proteínas, para ello se sembraron las células sobre cubreobjetos estériles y se pusieron los tratamientos en set como se describió anteriormente. Después se lavó cada pozo con PBS estéril y se fijaron las células con Paraformaldehído (PFA) 4% incubándolas por 10 minutos. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos cada uno. Después se permeabilizaron las células dejándolas en una solución de tritón-100 al 1% durante 20 minutos. A continuación, se realizaron otros tres lavados de PBS durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó el bloqueo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, para ello se utilizó una solución de SFB 1% en PBS y se dejó incubando por 40 minutos a temperatura ambiente. Al terminar el tiempo de bloqueo se pusieron 40 µL de anticuerpo primario cubriendo el cubreobjetos con Parafilm. Se utilizaron los anticuerpos Ku70 (ab83501 abcam) dilución 1:300 en SFB 1% o Ku80 (ab119935 abcam) 1:300 en SFB 1% + γH2AX (560443 BD), dependiendo el caso, y se dejaron durante toda la noche a 4° C en una cámara fría. Al siguiente día, se retiró el anticuerpo primario añadiendo 2 mL de PBS, lo cual permite que el Parafilm se levante y se pueda retirar con las pinzas. A continuación, se hizo un lavado con PBS por 5 minutos y se permeabilizó nuevamente con tritón-100 1% durante 5 minutos más. Posteriormente se realizaron 2 lavados más con PBS y se añadieron 40 µL de anticuerpo secundario, usando Parafilm para distribuir mejor. Las diluciones de los anticuerpos secundarios fueron las siguientes: 1:250 de goat-anti

rabbit - Alexa Fluor 488, goat-anti-mouse – Alexa Fluor 488 y goat-anti-mouse – Alexa Fluor 568 para Ku70, Ku80 y γ H2AX, respectivamente.

Toma de imágenes por microscopía confocal

Las inmunofluorescencias realizadas se analizaron primero por microscopía de epifluorescencia con el microscopio AxioVert 200M Carl Zeiss (AG), utilizando el software Axiovision 4.9.2; sin embargo, las imágenes obtenidas (no mostradas) no fueron concluyentes, por lo tanto, se decidió evaluar las laminillas nuevamente por microscopía confocal. Para ello se utilizó el LSM 710 Duo, AxioObserver Carl Zeiss (AG) y el software Zen2009. Se utilizó el objetivo Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27. Se usaron dos fuentes de láser, una de 488 nm y otra de 720 nm (2 fotones, coherente); con un porcentaje de transmisión de 5% para Ku70 y 4% de transmisión para Ku80. Se obtuvieron imágenes panorámicas de 3584x3584 píxeles en tres diferentes planos para abarcar la mayor cantidad de células posibles. A continuación, se procesaron las imágenes utilizando el Software especializado FIJI donde se fusionaron los tres planos en uno solo a través de la proyección de intensidad máxima. A todas las imágenes se les aplicó el filtro Gaussian Blur con un radio de sigma de 1 y se eliminó el background considerando un radio de 25 píxeles. Asimismo, se realizó el análisis de imagen con el mismo software para obtener la intensidad de fluorescencia de cada célula en el canal verde (Ku70/Ku80) y azul (DAPI), la diferencia de fluorescencia obtenida se graficó utilizando el Software Graphpad Prism 8.

Sistema reportero para detección de reparación mediante NHEJ

El sistema reportero fue desarrollado por Arnoult y colaboradores²²⁸ y consiste en un casete reportero de NHEJ (ver *figura 9*) que cuenta con un promotor de citomegalovirus (morado), seguido de un gen de GFP truncado (verde) que codifica una proteína no activa, debido a que tiene un intrón modificado del gen Pem1 de rata (amarillo), el cual no tiene homología con el modelo de estudio. Este intrón es interrumpido por un exón adenoviral (rojo) que evita la continuidad en el gen, por lo que la GFP no es activa, el exón adenoviral está flanqueado por sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción HindIII/I-SceI invertidos (tijeras).

Adicionalmente, posee un gen de resistencia a neomicina/kanamicina (azul) que cuenta con su propio promotor de SV40 (melón) (ver *figura 10*).

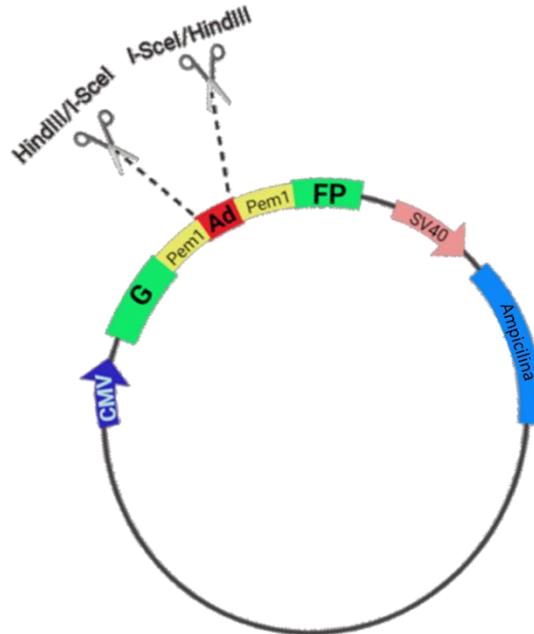


Figura 10. Estructura general del sistema reportero

Para la detección de la actividad de la vía de reparación NHEJ se transfecta de manera transitoria un segundo plásmido con el gen que codifica para la endonucleasa I-SceI la cual inducirá la rotura de doble hebra, permitiendo la liberación del exón adenoviral que mantiene interrumpida la continuidad en el gen de GFP. Una vez que ese exón es liberado los dos extremos de Pem1 pueden ser unidos, por lo tanto, si la maquinaria de NHEJ funciona adecuadamente, la rotura es reparada y la continuidad del gen de GFP se recupera, obteniendo un gen de GFP funcional que al traducirse es capaz de emitir fluorescencia (*Figura 11A*), la cual será detectada mediante citometría de flujo. Por otro lado, si el resveratrol evita la reparación del ADN mediada por NHEJ, a través de la inhibición de Ku70/Ku80, aunque el exón adenoviral se libere el daño no será reparado y la GFP no emitirá fluorescencia (*Figura 11B*).

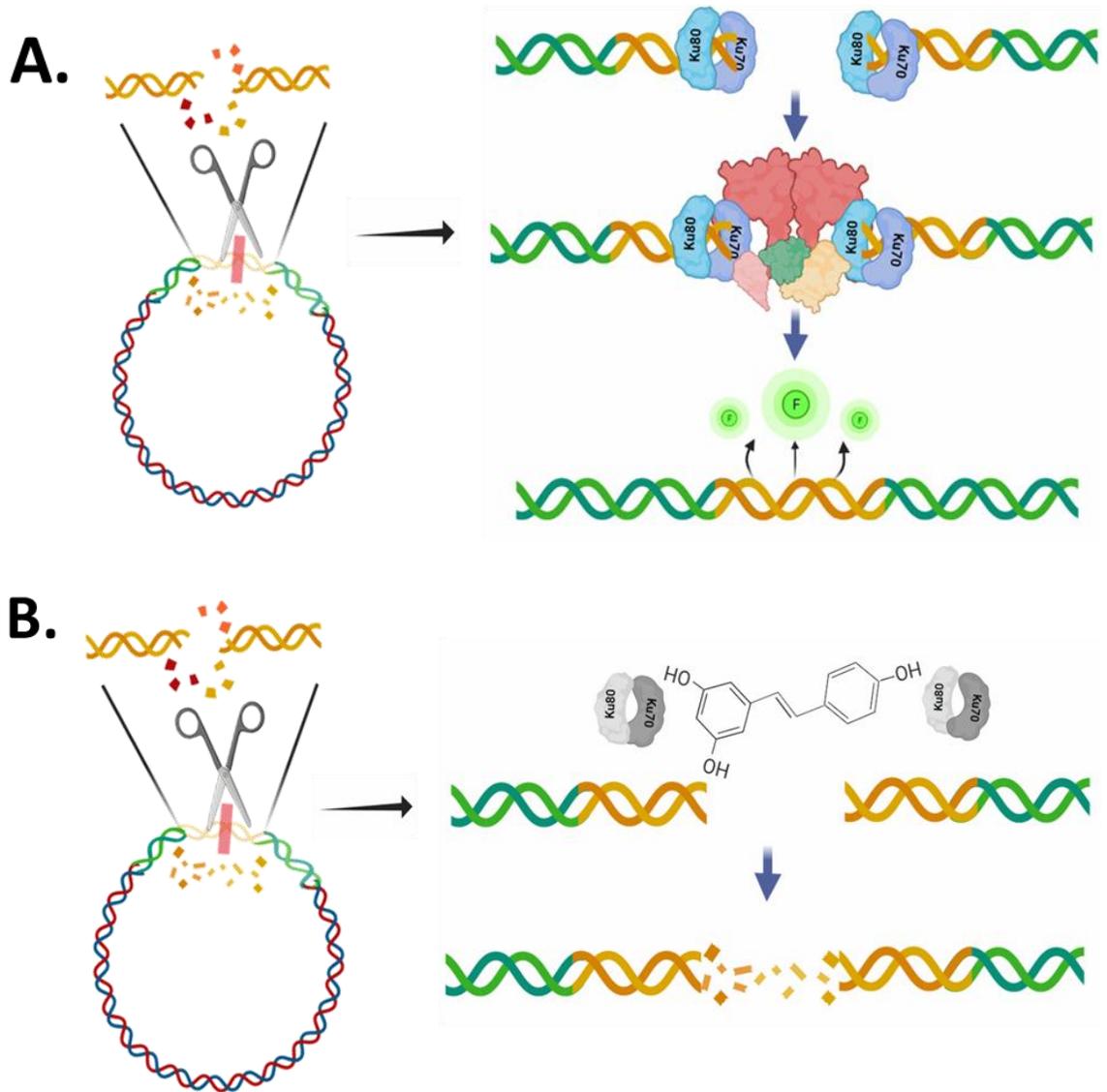


Figura 11. Representación esquemática del funcionamiento del sistema reportero. Las enzimas de restricción I-SceI (tijeras) eliminan el exón adenoviral (rojo), lo cual permite que el exón de Pem1 (amarillo) otorgue continuidad reparable al gen truncado de GFP (verde). **A.** La rotura de doble hebra de ADN realizada por las enzimas de restricción es reparada por NHEJ, por lo que el gen de GFP se vuelve activo y se traduce en una proteína fluorescente. **B.** El resveratrol inhibe la vía de NHEJ de manera dependiente de Ku70/Ku80 y evita la reparación del daño, por lo que GFP permanece inactiva.

Para el estudio con este sistema reportero se realizó la siguiente metodología.

Preparación de bacterias competentes

De una alícuota de bacterias *Escherichia coli* DH5alpha conservadas en glicerol se tomaron 50 uL y se sembraron en 50 mL de medio LB tibio sin antibiótico, posteriormente se dejaron creciendo en agitación (250 rpm) a 37°C durante toda la noche en un recipiente de al menos 5 veces el volumen de medio.

Al día siguiente, se tomó 1 mL de las bacterias que crecieron y se pusieron en 40 mL de medio LB tibio sin antibiótico, se dejaron en agitación (250 rpm) a 37°C durante 2-3 h en un recipiente de al menos 5 veces el volumen de medio, hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6. A continuación, se centrifugaron esas bacterias a 2,50 rpm durante 10 minutos.

Posteriormente, se resuspendió el pellet en 25 mL de buffer de CaCl₂ (CaCl₂ 100 mM/Tris 10 mM) pH 7.5. Se dejaron en hielo durante 30 minutos y al pasar el tiempo se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 3.3 mL del buffer de CaCl₂. Esas bacterias se dejaron toda la noche a 4°C y al día siguiente se transformaron como se describe a continuación.

Transformación de bacterias Escherichia coli DH5alpha

Se tomaron 50 uL de bacterias competentes y se pusieron en un tubo de 1.5 mL previamente enfriado en hielo. Se agregaron de 300 ng/uL de plásmido y se resuspendieron suavemente con la pipeta, posteriormente se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos agitando el tubo levemente con el dedo cada 5 minutos. Al pasar los 30 minutos se pusieron en baño maría a 42°C durante 2 minutos y posteriormente en hielo durante 2 minutos más. A continuación, se añadieron 300 uL de medio LB tibio sin antibiótico y se dejó en agitación (250 rpm) a 37°C por una hora. Después se centrifugó el tubo a 1,200 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se decantó el sobrenadante, pero no por completo, y con el sobrenadante que quedó se resuspendió el pellet de bacterias sin picarlo directamente con la punta. Se tomó todo el volumen del tubo y se sembró en cajas petri de agar LB + Ampicilina utilizando perlas de vidrio estériles para dispersar el volumen por toda la caja. Posteriormente

se dejaron crecer las bacterias en la caja petri en incubación a 37°C durante no más de 16 horas. Al pasar el tiempo mencionado se comprobó el crecimiento de colonias en la caja y se guardó a 4°C.

Una vez que se tuvieron las colonias transformadas (creciendo en el medio con antibiótico de selección) se procedió a hacer un banco de colonias aisladas, esto debido a que a veces el crecimiento es tanto que es difícil diferenciar una colonia de la otra.

Elaboración de banco de bacterias transformadas con el plásmido

De las colonias obtenidas anteriormente se seleccionaron las colonias que se encontraban separadas del resto y se tomó a cada una con asa bacteriológica para ser estriadas en una caja de agar LB + Ampicilina identificando el estriado perteneciente a cada colonia. Se dejaron crecer durante no más de 16 h a 37°C. De esta manera se obtuvieron bancos de monoclonias transformadas con cada plásmido.

Purificación de plásmidos a partir de bacterias transformadas

Una vez que obtuvimos las bacterias transformadas aisladas se realizó la purificación de los plásmidos para corroborar la identidad de cada uno. Para ello se realizó inicialmente una miniprep, la cual permite aislar baja cantidad de ADN plasmídico de las bacterias transformadas utilizando lisis alcalina.

Para este procedimiento se sembraron colonias aisladas de cada plásmido en 1 mL de medio LB + 1 µL de Ampicilina en tubos de 15 mL (volumen al menos 5 veces mayor al medio colocado) y se dejaron creciendo en agitación (250 rpm) a 37°C durante no más de 16 h. A continuación, los tubos con el crecimiento bacteriano se centrifugaron a 2,500 rpm durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante. A partir del pellet de bacterias se realizó la purificación de los plásmidos, para lo cual se utilizó el Kit QIAprep® Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación.

Se resuspendió el pellet de bacterias en 250 μ L de buffer P1 y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 250 mL de buffer P2 y se mezcló por inversión 4-6 veces (sin pasar 5 minutos de reacción) hasta que la solución se tornó clara y después azul. A continuación, se añadieron 350 μ L de buffer N3 y se mezcló por inversión 4-6 veces hasta que la solución se volvió incolora, una vez ocurrido esto, se centrifugaron los tubos durante 10 min a 13,000 rpm en microcentrífuga. Del sobrenadante resultante se tomaron 800 μ L y se aplicaron a la columna QIAprep 2.0 y se centrifugó por 30s y se desechó el sobrenadante. A continuación, se lavó la columna adicionando 750 μ L del buffer PE, se centrifugó por 30s y se descartó el sobrenadante. Se cambió la columna a otro tubo colector y se centrifugó nuevamente durante 60s para retirar cualquier residuo del buffer de lavado. A continuación, la columna se puso sobre un microtubo de 1.5 mL limpio donde se eluyó el ADN plasmídico añadiendo 50 μ L de buffer EB a la columna y se dejó reposar durante 60s, para posteriormente centrifugar nuevamente por 60s. Una vez eluido el material, se cuantificó con Nanodrop y se corrieron 500 ng de las muestras en un gel de agarosa 0.7% para verificar la integridad de este.

Comprobación de la identidad de los plásmidos mediante patrones de restricción

Una vez que se tuvo el ADN plasmídico purificado, se realizaron digestiones con distintas enzimas de restricción para corroborar la identidad del plásmido con base en el patrón de bandeo de cada uno. Lo anterior se realizó como se describe a continuación.

Para conocer el patrón de bandeo del plásmido con el sistema reportero específico para el mecanismo NHEJ, pLCN DSB Repair Reporter (DRR) (Plasmid #98895) y el plásmido con la enzima específica que corta al anterior pCBASceI (Plasmid #26477) se evaluó la secuencia de cada uno en el servidor de NEB (New England Biolabs) y usando la herramienta NEB cutter Vol. 3.0 (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>) se eligieron las enzimas de restricción más apropiadas para cada plásmido, así como el buffer con el que mejor funciona cada enzima. Además, una vez elegidas las enzimas de restricción,

de acuerdo con las que se tenía en el laboratorio, esta herramienta permitió modelar *in silico* el patrón que se debía obtener al realizar las restricciones de cada plásmido.

Para la digestión de los dos plásmidos se utilizaron las siguientes enzimas y buffers:

pLCN DSB Repair Reporter (DRR) (98895)		
Enzima	Numero de cortes	Buffer
BamHI	1 (Linearización)	3.1
BamHI/EcoRV	2 (Patrón de bandeo)	3.1
pCBAScel (26477)		
Enzima	Numero de cortes	Buffer
BgIII	1 (Linearización)	3.1
EcoRI HF	2 (Patrón de bandeo)	CS

Tabla 6. Enzimas utilizadas para la digestión de los plásmidos purificados

Las digestiones se realizaron como se detalla a continuación.

En microtubos de 1.5 mL estériles puestos en hielo, se añadieron agua, buffer de reacción para cada enzima, ADN y enzima de restricción (en ese orden), como se describe en la *tabla 7*. Se homogeneizaron todos los componentes por pipeteo y se llevaron los tubos al termoblock a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente, se corrió 1 µg de muestra en un gel de agarosa 0.7% hasta que se observó el patrón obtenido en el análisis *in silico*.

Componente	Cantidad
ADN	1.0 µg
Enzima*	1.0 µL
Buffer	5.0 µL
H₂O	c.b.p 50 µL

Tabla 7. Componentes para la digestión de plásmidos

*En los casos donde se usaron 2 enzimas, se utilizó 1 µL de cada una y se redujo la cantidad de agua.

Purificación a mayor escala de plásmidos a partir de bacterias transformadas

Una vez que se corroboró la identidad de los plásmidos se realizó la purificación a mayor escala de los dos plásmidos, para lo cual se realizó una midiprep, la cual permite obtener mayor rendimiento de ADN plasmídico que la miniprep. Este procedimiento también utiliza lisis alcalina para la purificación.

Para las midipreps se utilizó el QIAGEN Plasmid Midi Kit (12143) y se siguió el procedimiento señalado por el fabricante, el cual se describe a continuación. Se picaron colonias aisladas de las que se tenían en el banco de bacterias transformadas y se sembraron en 5 mL de medio LB + Ampicilina en tubos de 50 mL y se dejaron crecer por aproximadamente 8 h en agitación (250 rpm) a 37°C. Después se realizó una dilución del cultivo, sembrando 150 µL del cultivo inicial en 100 mL de medio LB + Ampicilina en matraces de 500 mL y se dejaron creciendo por no más de 16 h en agitación (250 rpm) a 37°C. Posteriormente, se tomaron 500 µL de cultivo de bacterias para congelarlos y preservar las bacterias, este procedimiento se describirá más adelante. El resto del cultivo se pasó a tubos de centrifuga y se centrifugó a 6,000 xg por 15 min a 4°C. A continuación, se resuspendió el pellet de bacterias en 4 mL de buffer P1 homogeneizando utilizando vórtex. Luego, se añadieron 4 mL de buffer P2 y se mezcló por inversión, sin permitir que la reacción ocurriera por más de 5 minutos, únicamente hasta que la mezcla se vuelva azul. Después se añadieron 4 mL de buffer P3, se mezcló perfectamente por inversión 4-6 veces y se dejó incubando en hielo durante 15 minutos. Después de la incubación se centrifugó a $\geq 20,000$ xg por 30 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se colocó en otro tubo, ya que ahí se encontraba el ADN plasmídico. Ese sobrenadante se volvió a centrifugar a $\geq 20,000$ xg por 15 minutos a 4°C, mientras tanto, se equilibraron las columnas (QIAGEN-tip 100) añadiendo 4 mL de buffer QBT hasta que este bajó por completo por gravedad. Una vez que la columna estuvo equilibrada, se añadió el sobrenadante de la centrifugación anterior al centro de la columna, hasta que bajó completamente por gravedad. A continuación, se hicieron 2 lavados a la columna añadiendo 10 mL de buffer QC para cada lavado. Posteriormente, para eluir el ADN de la columna, se cambió a un tubo

nuevo de 50 mL de polipropileno (No usar tubos de policarbonato, ya que pueden reaccionar con los solventes e interferir con la reacción) y se añadieron 5 mL del buffer QF hasta que bajó completamente por gravedad. Posteriormente, para precipitar el ADN se añadieron 3.5 mL de Isopropanol al eluído, se mezcló perfectamente y se centrifugó a $\geq 15,000$ xg por 30 minutos a 4°C, se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN con 0.5 mL de EtOH 70% y se centrifugó a $\geq 15,000$ xg por 10 minutos. Se tiró cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ADN por 5-10 minutos a temperatura ambiente, una vez seco, el pellet se resuspendió perfectamente en 100 μ L de buffer TE pH 8.0.

Una vez eluído el material, se cuantificó con Nanodrop y se corrieron 500 ng de las muestras en un gel de agarosa 0.7% para verificar la integridad de este.

Congelación de bacterias transformadas

Antes de sembrar las bacterias se colocaron 500 μ L de glicerol en crioviales de 2 mL y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C y 15 psi. Cuando las bacterias estuvieron listas, en condiciones de esterilidad se tomaron 500 μ L del cultivo y se pusieron en el crioval con glicerol estéril, se mezcló suavemente hasta homogeneizar perfectamente y se almacenaron los criovales a temperaturas de -20 a -80°C. De esta manera se pueden almacenar viales de bacterias transformadas por años²²⁹. Para utilizar estas bacterias se descongelan 50 μ L de bacterias en 5 mL de medio LB + Ampicillina (antibiótico de selección).

RESULTADOS

Comprobación de las ICs de resveratrol y cisplatino en placas adherentes de 24 pozos

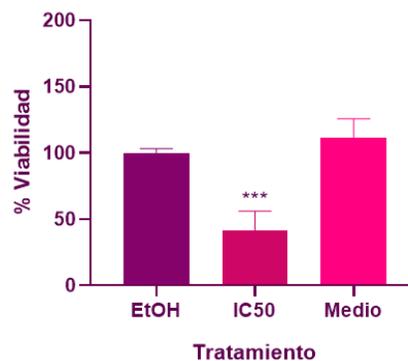
Después de tratar a las tres líneas celulares (HeLa, SiHa y C-33A) con las IC50 de resveratrol reportadas previamente, se observó que las ICs de resveratrol reportadas coincidieron con lo esperado, ya que en las tres líneas celulares se observó aproximadamente el 50% de células después del tratamiento con resveratrol (ver *figura 12*), por lo que estas dosis de resveratrol se utilizaron en los siguientes experimentos.

Por otro lado, en el caso del cisplatino, las dosis que se habían reportado previamente (Ver *tabla 1*) no tuvieron el efecto esperado (datos no mostrados), por lo que se decidió volver a calcular las ICs 20 y 50 para los tratamientos con cisplatino.

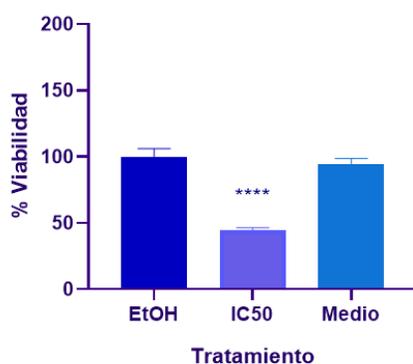
A.

Línea Celular	[] μM Resveratrol
C-33A	90.9
HeLa	123.2
SiHa	164.7

B. Resveratrol en células C-33A



C. Resveratrol en células HeLa



D. Resveratrol en células SiHa

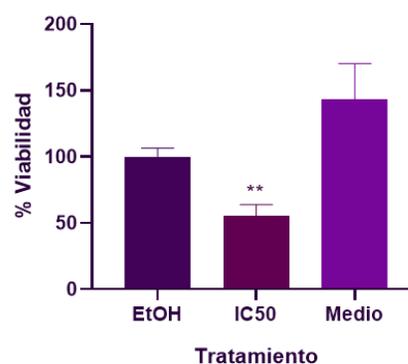


Figura 12. Comprobación de las ICs de resveratrol. Se muestra la viabilidad celular después de dar tratamiento con resveratrol. **A.** Se muestran las dosis reportadas previamente como IC50 de resveratrol para cada una de las líneas celulares. Gráficas de la viabilidad celular de C-33A (**B.**), HeLa (**C.**) y SiHa (**D.**) después del tiempo de tratamiento con las IC50 correspondientes a cada línea celular (90.9, 123.2 y 164.7 μM respectivamente). La viabilidad celular se calculó a partir de la absorbancia obtenida del ELISA, estos resultados expresan la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. En todos los casos se observa diferencia significativa con respecto al control (EtOH) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

Determinación de las nuevas ICs de cisplatino

Se hicieron curvas de dosis-respuesta de tratamiento con cisplatino y se evaluó la viabilidad celular utilizando una tinción con cristal violeta, se observó que en la línea celular C-33A el tratamiento con este fármaco tuvo un efecto dependiente de la dosis,

ya que a mayor concentración de fármaco se observó menor supervivencia celular (ver *figura 13A*), al evaluar los datos obtenidos, se calcularon las ICs utilizando el software Sigma Plot y se determinó que la IC20 corresponde a 5.8379 μM de cisplatino, mientras que la IC50 se alcanza con 14.6328 μM del fármaco (ver *figura 13C*).

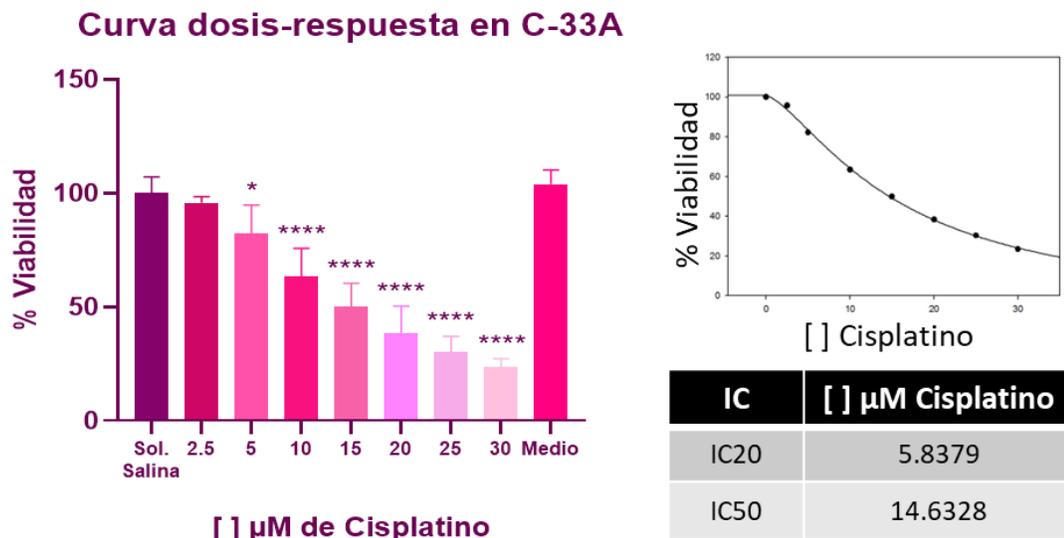


Figura 13. Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular C-33A. Se determinaron la IC20 y la IC50 de cisplatino en células C-33A utilizando las dosis mostradas. A. Muestra la gráfica de supervivencia celular tras finalizar el tratamiento con cisplatino, las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A partir de la dosis de 5 μM se observa diferencia significativa con respecto al control de vehículo (Sol. Salina) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$. **B.** Gráfica dosis-respuesta otorgada por Sigma Plot, esta gráfica fue la que se usó para calcular las ICs. **C.** Concentraciones Inhibitorias (ICs) obtenidas para las células C-33A.

Por otro lado, en el caso de las células HeLa, también se observó un efecto dependiente de la dosis de cisplatino, donde a mayor concentración de fármaco hubo menor viabilidad celular. Sin embargo, en este caso las células fueron menos sensibles que en C-33A (ver *figura 14A*). Utilizando el software Sigma Plot se determinó que la

IC20 de cisplatino para HeLa es de 8.3066 μM de cisplatino, mientras que la IC50 fue de 19.8789 μM del fármaco (ver *figura 14C*).

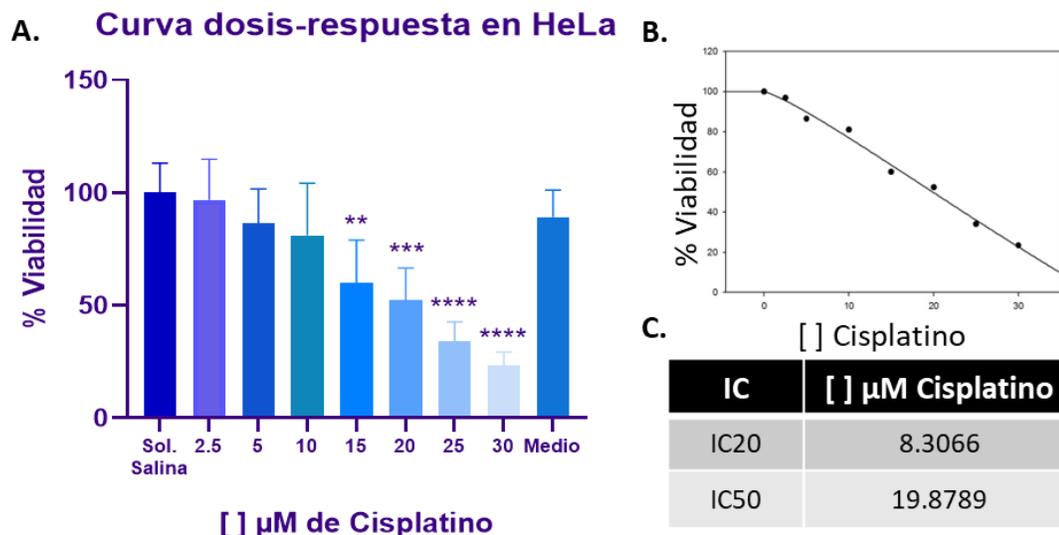


Figura 14. Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular HeLa. Se determinaron la IC20 y la IC50 de cisplatino en células HeLa utilizando las dosis mostradas. **A.** Muestra la gráfica de supervivencia celular tras finalizar el tratamiento con cisplatino, las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A partir de la dosis de 15 μM se observa diferencia significativa con respecto al control de vehículo (Sol. Salina) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$. **B.** Gráfica dosis-respuesta otorgada por Sigma Plot, esta gráfica fue la que se usó para calcular las ICs. **C.** Concentraciones Inhibitorias (ICs) obtenidas para las células HeLa.

En contraste, la línea celular SiHa, resulto ser la más resistente al tratamiento con cisplatino, debido a que aún con la concentración más alta del fármaco en esta línea celular la viabilidad prácticamente no se vio afectada (ver *figura 15A*). Sin embargo, al utilizar el software Sigma Plot si se encontró que la IC20 fue de 8.7695 μM de cisplatino, pero incluso con la dosis más alta utilizada para el tratamiento (30 μM) no se alcanzó la IC50, pues el software determinó que la IC52 se encontraba en 35 (ver *figura 15C*), por lo que habría que utilizar una dosis mucho mayor para alcanzar la IC50, probablemente muy cerca de 40 μM .

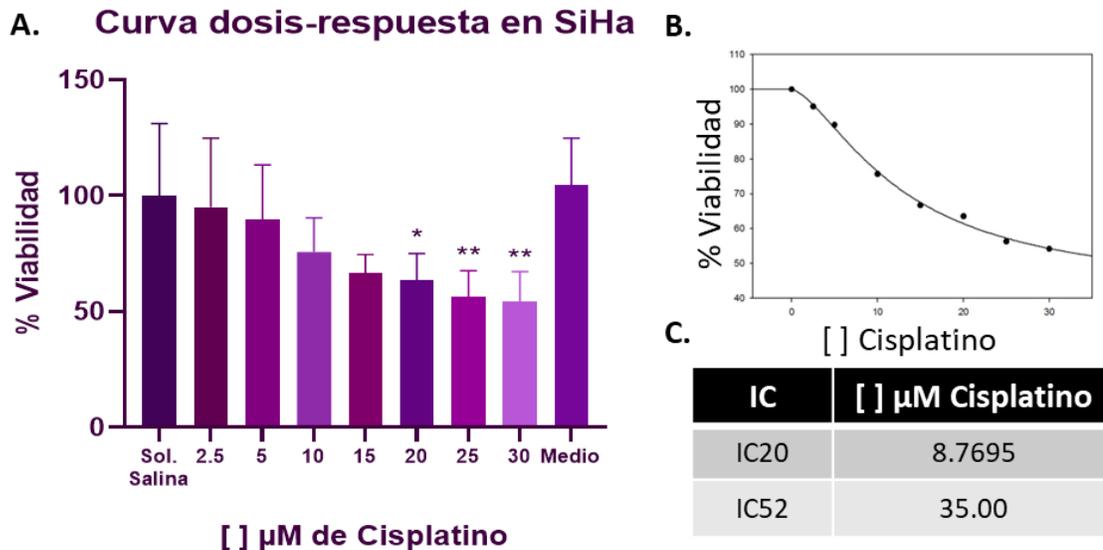


Figura 15. Determinación de las nuevas ICs de cisplatino en la línea celular SiHa. Se determinaron la IC20 y la IC50 de cisplatino en células SiHa utilizando las dosis mostradas. **A.** Muestra la gráfica de supervivencia celular tras finalizar el tratamiento con cisplatino, las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A partir de la dosis de 20 μ M se observa diferencia significativa con respecto al control de vehículo (Sol. Salina) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$. **B.** Gráfica dosis-respuesta otorgada por Sigma Plot, esta gráfica fue la que se usó para calcular las ICs. **C.** Concentraciones Inhibitorias (ICs) obtenidas para las células SiHa.

Determinación de las ICs de resveratrol y cisplatino en Células CaSki

Debido a que la línea celular SiHa resulto ser muy resistente al tratamiento con cisplatino, y en el trabajo previo de Sánchez-Vizcarra no mostró sinergia en combinación con el resveratrol (datos no mostrados). Decidimos evaluar la línea celular CaSki. Por lo que determinamos las IC20 y 50 de cisplatino y la IC50 de resveratrol. Para ello se hizo una curva dosis respuesta de cisplatino utilizando las concentraciones utilizadas para las otras líneas celulares.

Tras el tratamiento con cisplatino se observó un efecto dependiente de la dosis, donde a mayor concentración de fármaco, observamos una menor viabilidad celular

(ver figura 16A). Utilizando el software Sigma Plot, determinamos que la IC20 fue de 2.4433 μM de fármaco, mientras que la IC50 es de 10.0039 μM de cisplatino (ver figura 16C).

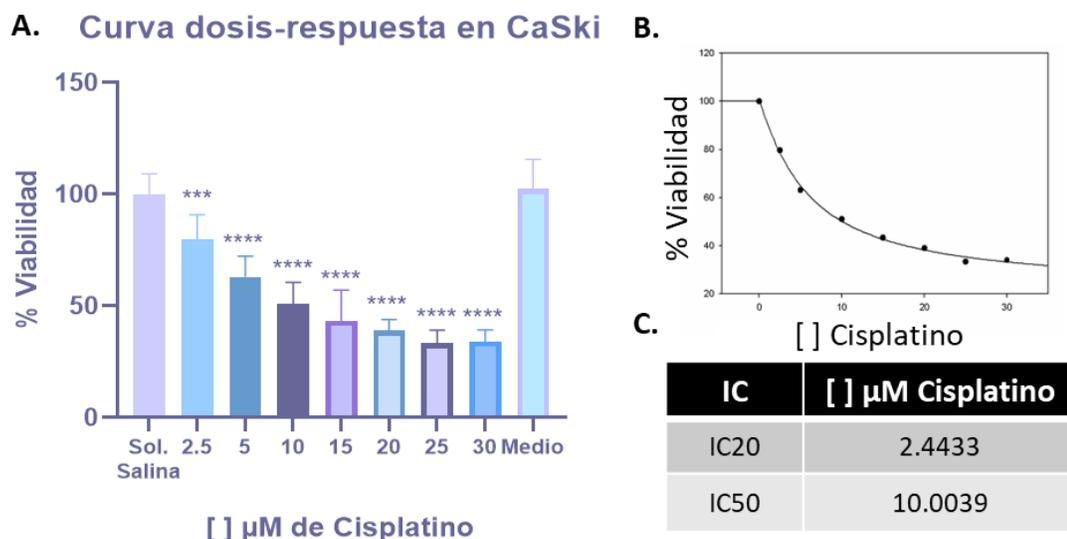


Figura 16. Determinación de las ICs de cisplatino en la línea celular CaSki. Se determinaron la IC20 y la IC50 de cisplatino en células CaSki utilizando las dosis mostradas. **A.** Muestra la gráfica de supervivencia celular tras finalizar el tratamiento con cisplatino, las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A partir de la dosis de 2.5 μM se observa diferencia significativa con respecto al control de vehículo (Sol. Salina) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$. **B.** Gráfica dosis-respuesta otorgada por Sigma Plot, esta gráfica fue la que se usó para calcular las ICs. **C.** Concentraciones Inhibitorias (ICs) obtenidas para las células CaSki.

Posteriormente, se hizo una curva dosis respuesta de resveratrol (50, 100, 150, 200 y 250 μM), y de igual manera se observó un efecto dosis dependiente (ver figura 17A). El análisis con el software Sigma Plot, determinó que la IC50 de resveratrol fue de 97.8515 μM (ver figura 17C).

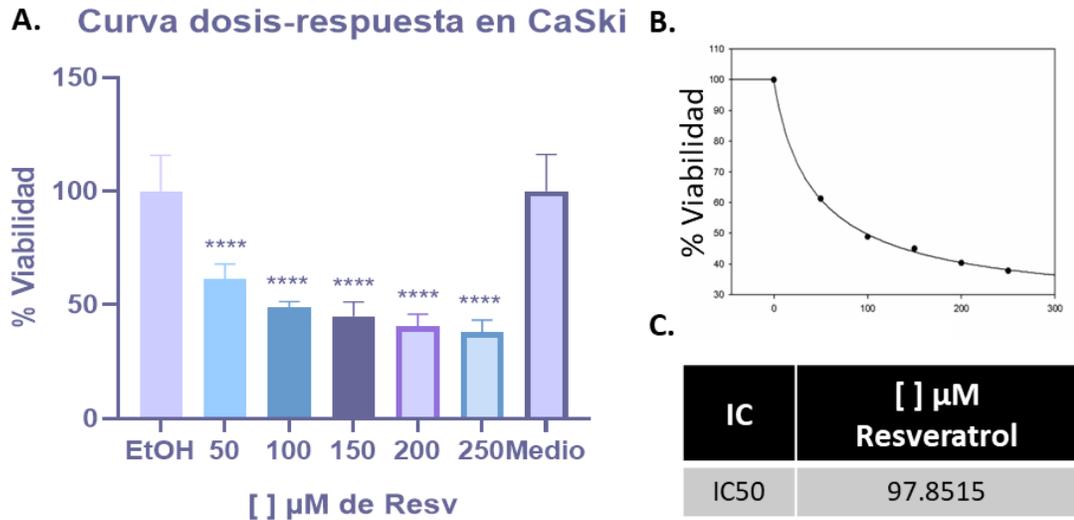


Figura 17. Determinación de la IC50 de resveratrol en la línea celular CaSki. Se determinaron la IC20 y la IC50 de resveratrol en células CaSki utilizando las dosis mostradas. **A.** Muestra la gráfica de supervivencia celular tras finalizar el tratamiento con resveratrol, las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A partir de la dosis de 50 μ M se observa diferencia significativa con respecto al control de vehículo (EtOH) donde **** simbolizan un valor $p < 0.0001$. **B.** Gráfica dosis-respuesta otorgada por Sigma Plot, esta gráfica fue la que se usó para calcular las ICs. **C.** Concentraciones Inhibitorias (ICs) obtenidas para las células CaSki.

A continuación, se muestra una tabla resumen de las ICs determinadas para las 4 líneas celulares y que fueron utilizadas para los demás experimentos. Aquí se puede observar que la línea celular más sensible al tratamiento con cisplatino fue la línea celular CaSki, seguida de las células C-33A, HeLa, y finalmente las células SiHa. Para el tratamiento con resveratrol, las células C-33A fueron las más sensibles al tratamiento, seguidas CaSki, HeLa y finalmente SiHa.

A.	C33A	SiHa	HeLa	CaSki
IC20	5.8379	8.7695	8.3066	2.4433
IC50	14.6328	35.00	19.8789	10.0039
B.	C33A	SiHa	HeLa	CaSki
IC50	90.9	164.7	123.2	97.85

Tabla 8. Resumen de las ICs de resveratrol y cisplatino en las cuatro líneas celulares.

Se muestran las ICs encontradas para cada línea celular. **A.** Resumen de las IC20 e IC50 de cisplatino en las 4 líneas celulares. **B.** Se muestran las IC50 de resveratrol calculadas para las 4 líneas celulares.

Efecto del resveratrol sobre la expresión de las proteínas Ku70 y Ku80

Después de la determinación de las ICs de resveratrol, se evaluó el efecto del tratamiento con resveratrol sobre los niveles de proteína de Ku70/Ku80 utilizando las correspondientes ICs50 de las líneas celulares (C-33A, SiHa y HeLa) mediante western blot. Se observó que en el caso de Ku70, en las 3 líneas celulares parece haber una tendencia a la disminución en los niveles de proteína; sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos (ver *figura 18*). Por lo que sería necesario realizar más repeticiones para confirmar lo observado.

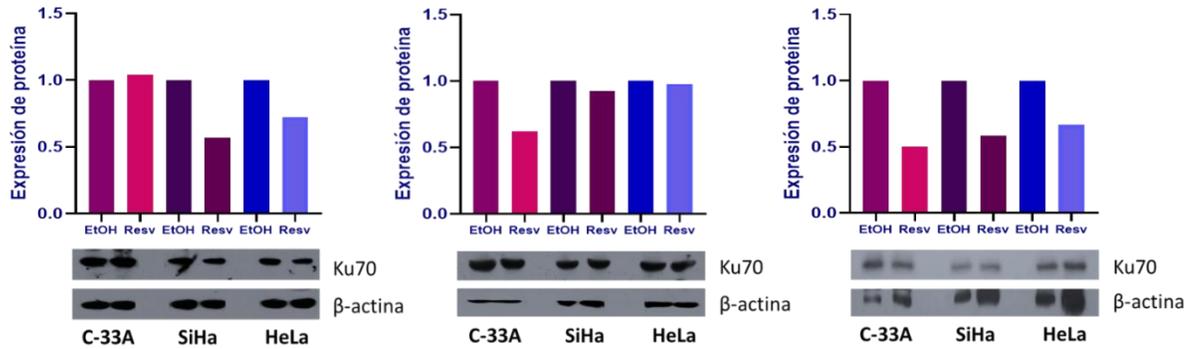


Figura 18. Efecto del resveratrol sobre la expresión de proteína Ku70. Western blot de la proteína Ku70 en las 3 líneas celulares (C-33A, SiHa y HeLa) después del tratamiento con la IC50 de resveratrol o el control de vehículo (EtOH). Se muestran las placas de los tres biológicos y las gráficas de densitometría correspondiente. Estas gráficas se obtuvieron de la densitometría de las placas mostradas. Las densitometrías se realizaron con el software ImageJ y el análisis estadístico consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

Por otro lado, en el caso de Ku80 se observó que tanto en las células C-33A como HeLa hay una disminución de los niveles de proteína, nuevamente, estos cambios no fueron estadísticamente significativos; por otro lado, en las células SiHa no se observaron cambios, incluso parece haber un aumento, pero tampoco fue estadísticamente significativo (ver *figura 19*). Nuevamente en el caso de C-33A y HeLa, serían necesarias más repeticiones para confirmar si la disminución observada en los niveles de la proteína Ku80 es real.

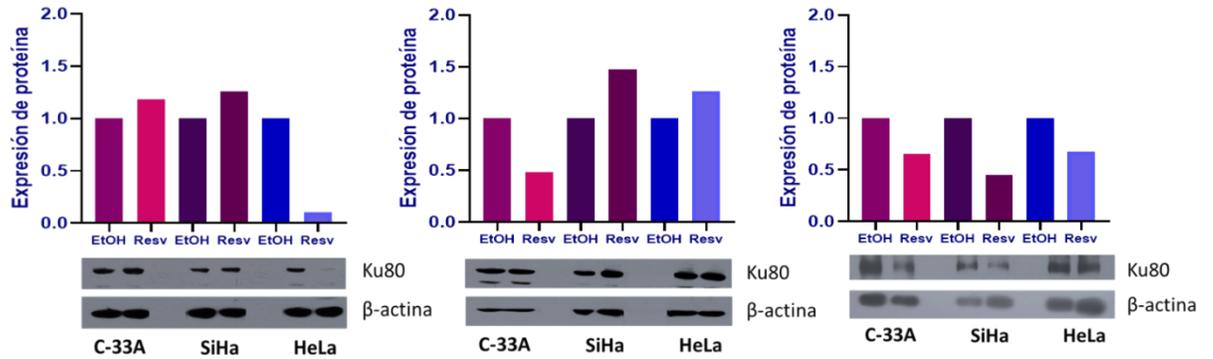


Figura 19. Efecto del resveratrol sobre la expresión de proteína Ku80. Western blot de la proteína Ku80 en las 3 líneas celulares (C-33A, SiHa y HeLa) después del tratamiento con la IC50 de resveratrol o el control de vehículo (EtOH). Se muestran las placas de los tres biológicos y las gráficas de densitometría correspondiente. Estas gráficas se obtuvieron de la densitometría de las placas mostradas. Las densitometrías se realizaron con el software ImageJ y el análisis estadístico consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

Efecto del resveratrol y cisplatino sobre los niveles de mRNA y proteína de Ku70/Ku80 en células HeLa

Analizamos el efecto del tratamiento de resveratrol solo o en combinación con cisplatino, o cisplatino solo sobre los niveles de expresión del heterodímero Ku70/Ku80 en células HeLa. En el caso de Ku70 se observó disminución a nivel de mensajero en el tratamiento de resveratrol solo, sin embargo, la expresión de las muestras tratadas con el tratamiento combinado se mantuvo a niveles muy similares que el control. En ninguno de los tratamientos con resveratrol se observaron cambios estadísticamente significativos (ver figura 20).

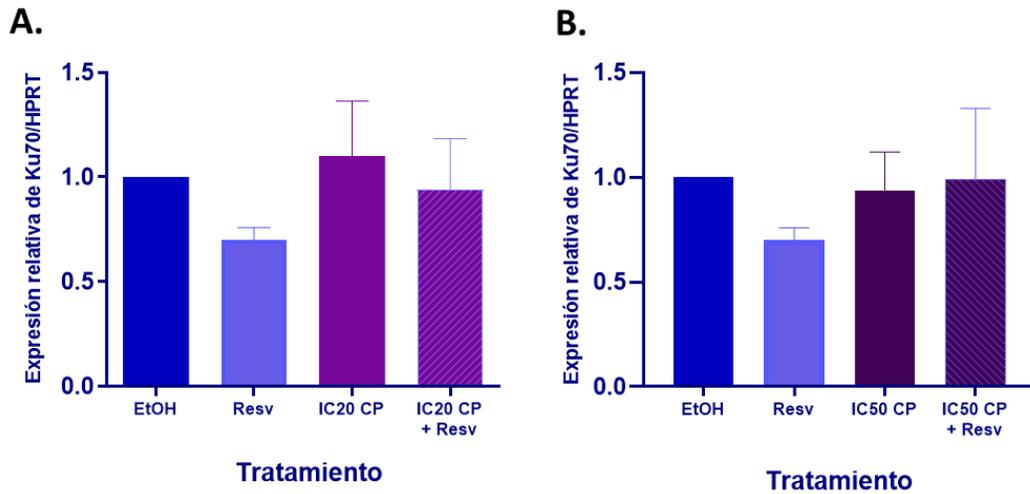


Figura 20. Efecto del resveratrol sobre los niveles de mRNA de Ku70 en células HeLa. Se realizó qPCR para evaluar los niveles de mRNA de Ku70 **A.** Muestra la gráfica de los niveles de expresión del mRNA del set con la IC20 de cisplatino, mientras que en **B.** se muestran los datos correspondientes al set de la IC50 de cisplatino. Estas gráficas se obtuvieron tras analizar los datos mediante el método $\Delta\Delta C_t$, y las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

Por otro lado, en el caso de Ku80, se observó que el tratamiento con resveratrol solo mostró una disminución en los niveles del mRNA, sin embargo, al igual que en el caso de Ku70, el tratamiento combinado hizo que Ku80 mantuviera niveles muy similares al control. Nuevamente, en ninguna de las condiciones probadas se observaron cambios estadísticamente significativos (ver figura 21).

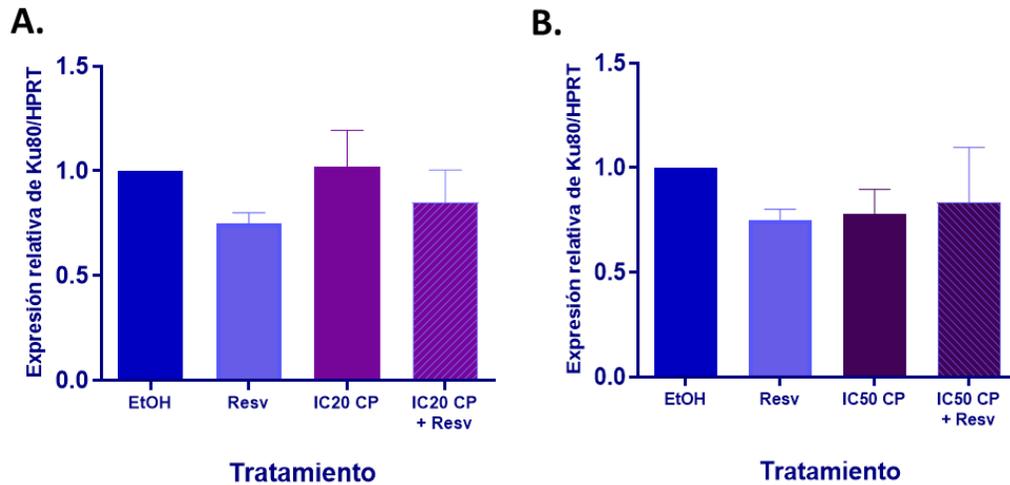


Figura 21. Efecto del resveratrol sobre los niveles de mRNA de Ku80 en células HeLa. Se realizó qPCR para evaluar los niveles de mRNA de Ku80 **A.** Muestra la gráfica de los niveles de expresión del mRNA del set con la IC20 de cisplatino, mientras que en **B.** se muestran los datos correspondientes al set de la IC50 de cisplatino. Estas gráficas se obtuvieron tras analizar los datos mediante el método $\Delta\Delta Ct$, y las barras representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

También se analizó el efecto del resveratrol sobre la expresión de proteína y se observó que en el caso de Ku70 ni el tratamiento solo de resveratrol, ni las combinaciones con cisplatino mostraron cambios significativos con respecto al control de vehículo (ver figura 22).

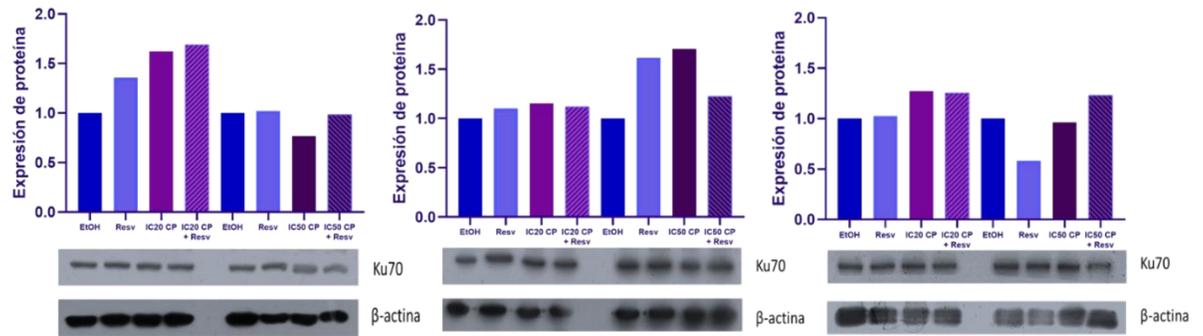


Figura 22. Efecto del resveratrol sobre la proteína Ku70 en células HeLa. Western blot de la proteína Ku70 en la línea celular HeLa con los diferentes tratamientos y combinaciones. Se muestran las placas de los tres biológicos y las gráficas de las densitometrías correspondientes. Estas gráficas se obtuvieron de la densitometría de las placas mostradas. Las densitometrías se realizaron con el software ImageJ y el análisis estadístico consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

En el caso de Ku80, el tratamiento solo de resveratrol pareció tener una ligera disminución respecto al control, mientras que las combinaciones con la IC20 e IC50 de cisplatino se mantuvieron a niveles muy similares que el control (ver figura 23); sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

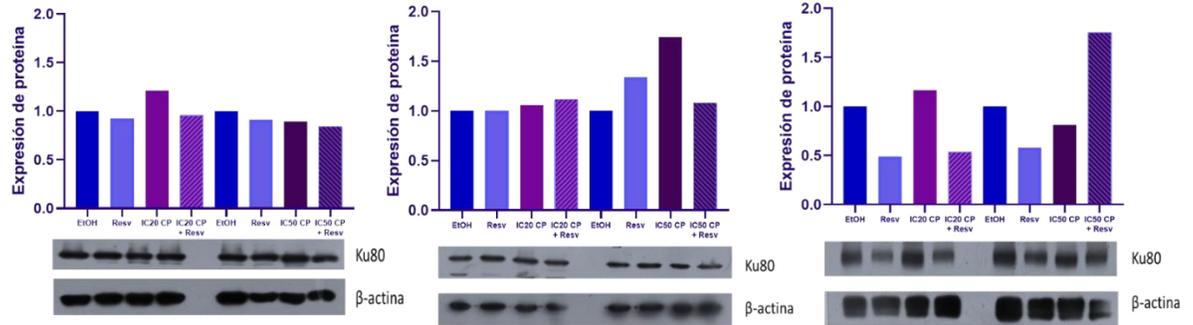


Figura 23. Efecto del resveratrol sobre la proteína Ku80 en células HeLa. Western blot de la proteína Ku80 en la línea celular HeLa con los diferentes tratamientos y combinaciones. Se muestran las placas de los tres biológicos y las gráficas de las densitometrías correspondientes. Estas gráficas se obtuvieron de la densitometría de las placas mostradas. Las densitometrías se realizaron con el software ImageJ y el análisis estadístico consideró que **** simbolizan un valor $p < 0.0001$.

Efecto del resveratrol sobre la localización de las proteínas de Ku70/Ku80 en células HeLa

Debido a que la localización del complejo Ku, es importante para su función de reconocimiento del daño y reparación por la vía NHEJ, decidimos evaluar la localización de las proteínas Ku70 y Ku80 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se evaluó el efecto del resveratrol solo o en combinación con cisplatino, así como del cisplatino solo y el control de vehículo (EtOH) sobre la localización de las proteínas Ku70 y Ku80.

En el caso de Ku70, en algunas de las células tratadas con resveratrol y las combinaciones se observa a Ku70 en el citoplasma (*figuras 24y 25*); sin embargo, son muy pocas las células por lo que no se señalan. Lo que es claro es que esto ocurre únicamente en presencia de resveratrol, sin embargo, el efecto no parece ser significativo. Además, se observó en estos experimentos una diferencia en los cambios de intensidad de la proteína en el núcleo, por ejemplo, en presencia de resveratrol solo, se observa una mayor intensidad de fluorescencia en el núcleo en comparación con el control.

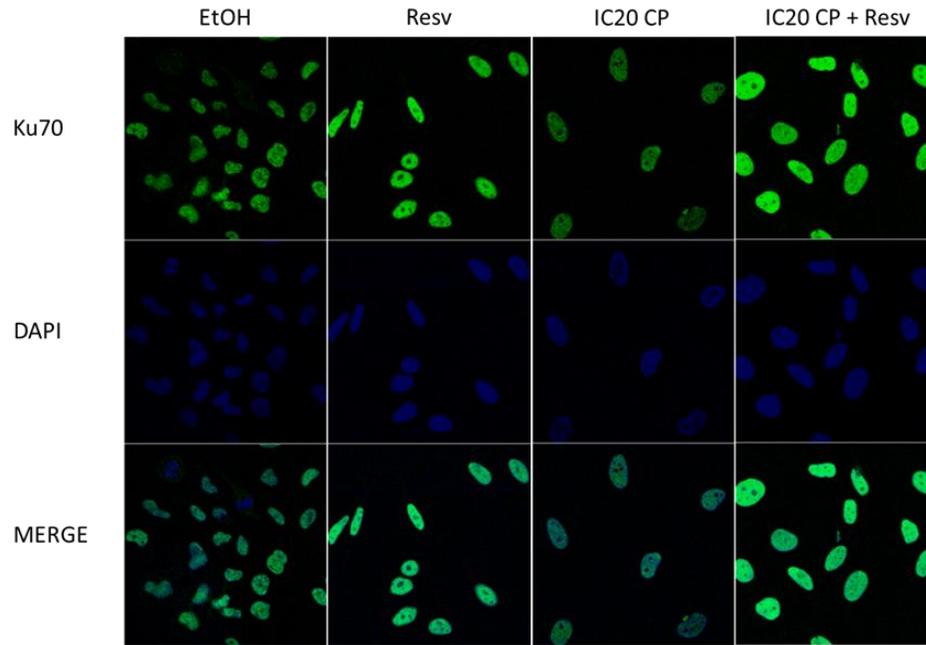


Figura 24. *Efecto del resveratrol en combinación con la IC20 de cisplatino sobre la localización de Ku70 en células HeLa. Inmunofluorescencia de la proteína Ku70 en la línea celular HeLa. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal del efecto de resveratrol + IC20 de cisplatino en estas células.*

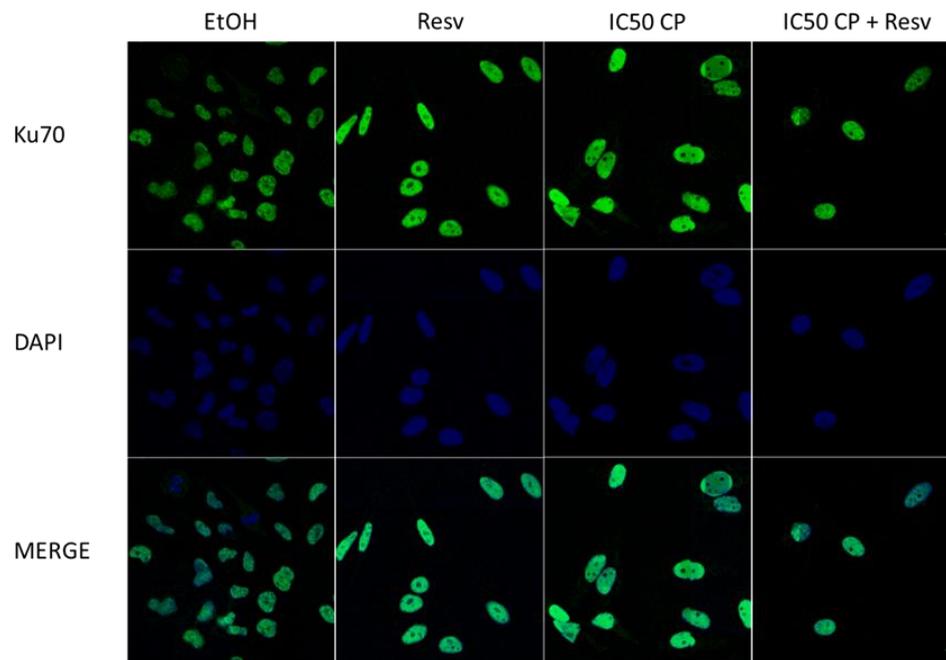


Figura 25. Efecto del resveratrol en combinación con la IC50 de cisplatino sobre la localización de Ku70 en células HeLa. Inmunofluorescencia de la proteína Ku70 en la línea celular HeLa. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal del efecto de resveratrol + IC50 de cisplatino en estas células.

Por otro lado, con respecto a Ku80 nuevamente algunas células parecen tener presencia citoplasmática, pero no de manera significativa, por lo que tampoco se señalan. De igual manera, se vieron cambios en la intensidad de la proteína. En este caso, el tratamiento con resveratrol también mostró mayor intensidad de fluorescencia que el grupo control, y los demás grupos (ver figuras 26 y 27).

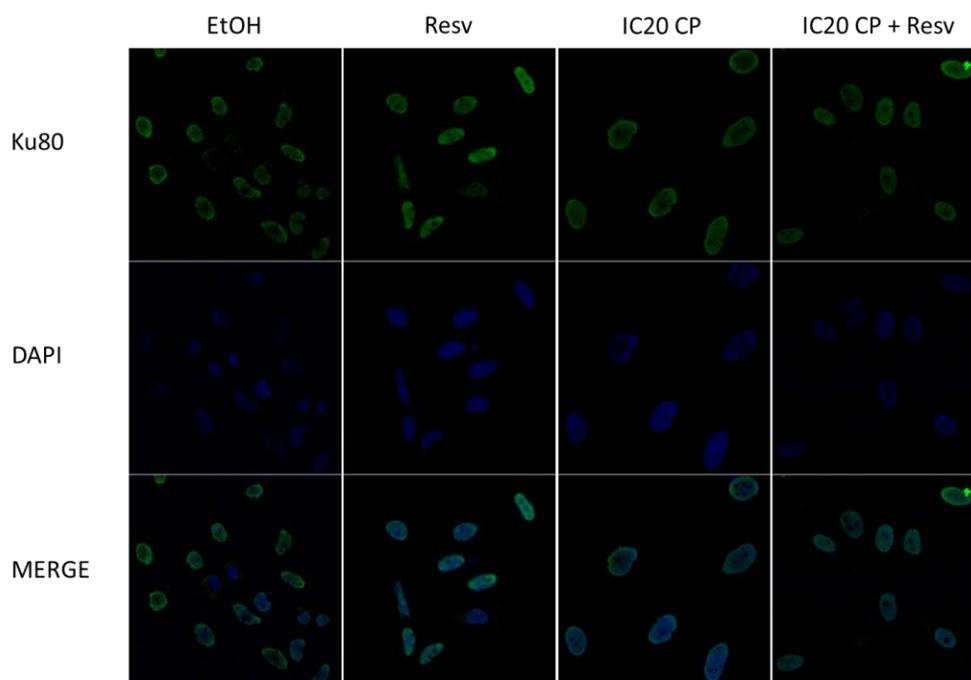


Figura 26. Efecto del resveratrol en combinación con la IC20 de cisplatino sobre la localización de Ku80 en células HeLa. Inmunofluorescencia de la proteína Ku80 en la línea celular HeLa. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal del efecto de resveratrol + IC20 de cisplatino en estas células.

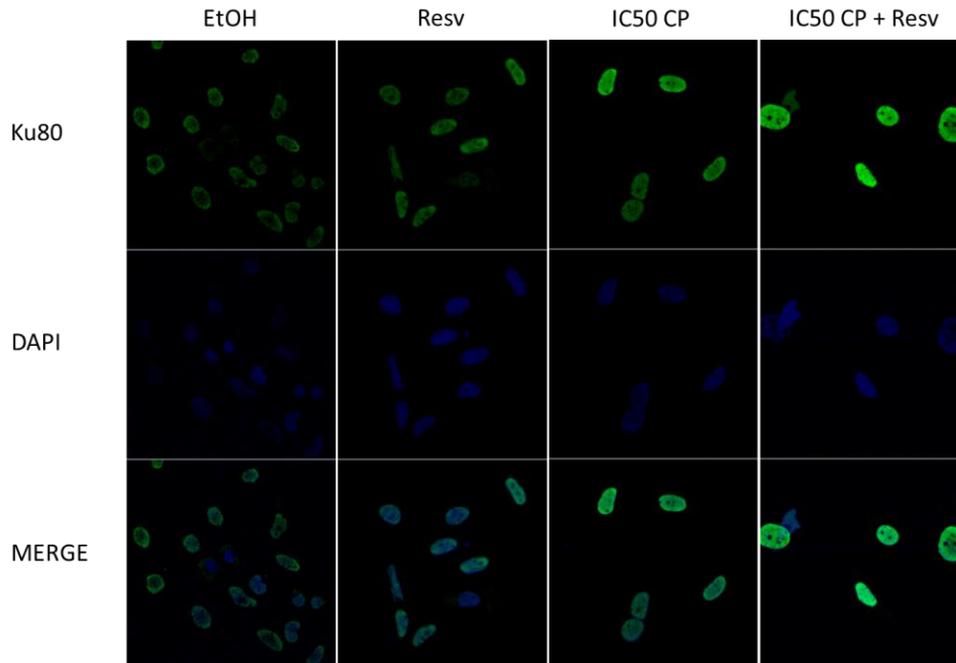


Figura 27. Efecto del resveratrol en combinación con la IC50 de cisplatino sobre la localización de Ku80 en células HeLa. Inmunofluorescencia de la proteína Ku80 en la línea celular HeLa. Se muestran las imágenes obtenidas por microscopía confocal del efecto de resveratrol + IC50 de cisplatino en estas células.

Purificación y comprobación de la identidad de plásmidos del sistema reportero

Se realizó la purificación de los plásmidos del sistema reportero como se describió en materiales y métodos y en la figura 28 se muestra el gel de integridad de los plásmidos, donde se pueden observar 2 o 3 bandas donde la banda de mayor migración es el plásmido circular super enrollado, la segunda banda el plásmido circular laxo y la última banda, el plásmido lineal.

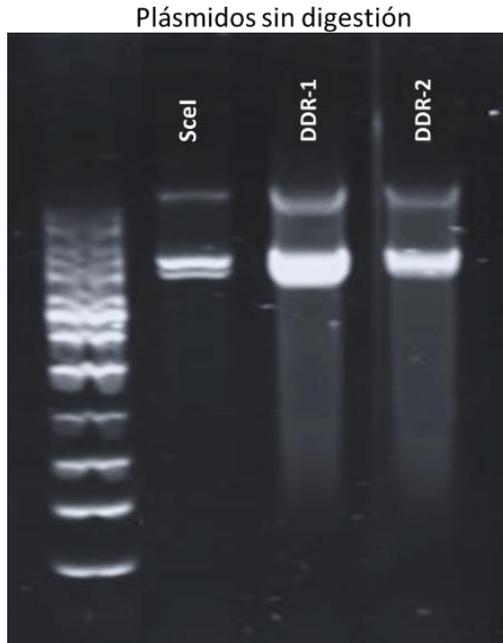


Figura 28. Purificación de plásmidos del sistema reportero. Se muestra un el de agarosa 0.7% donde se cargaron 500 ng de cada plásmido sin digestión.

A continuación, se realizó el análisis *in silico* para conocer los patrones de bandeo que se obtendrían al digerir cada plásmido con diferentes enzimas de restricción.

Para el plásmido con el sistema reportero se realizó la digestión con las enzimas EcoRV y BamHI como se describió en materiales y métodos. El patrón de bandeo con estas enzimas según el análisis *in silico* tendría un fragmento de 8163 pb y otro de 281 pb (ver *figura 29B*), lo cual se comprobó experimentalmente (ver *figura 29C*). Sin embargo, la linearización con BamHI no fue completa, por lo que aún se observa plásmido super-enrollado.

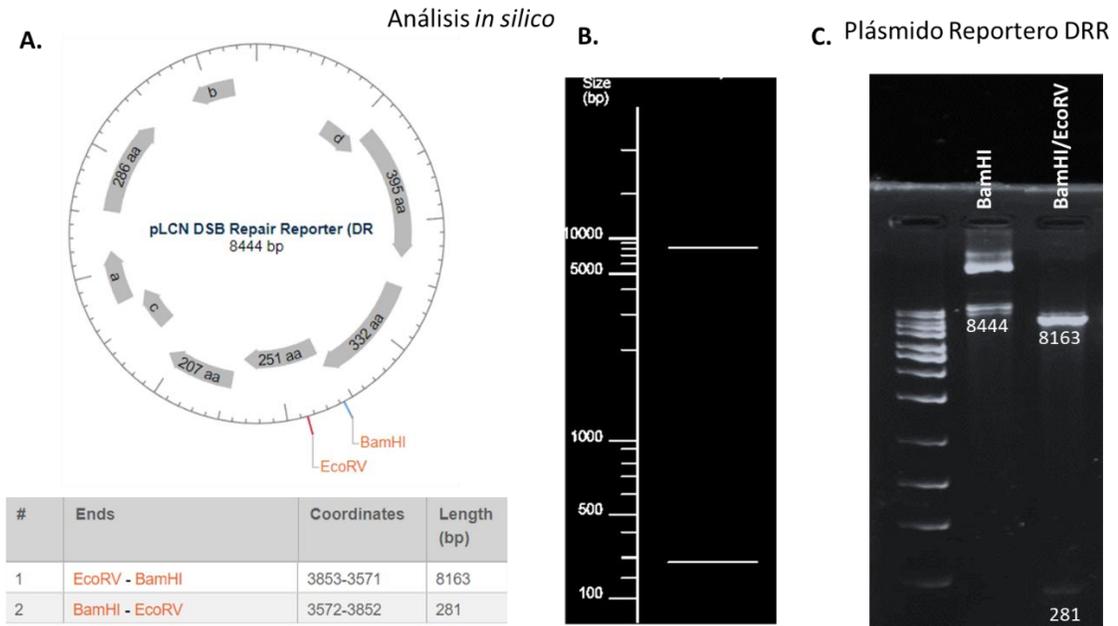


Figura 29. Comprobación de la identidad del plásmido con sistema reportero. Se realizó la comprobación de la identidad de plásmido. **A.** muestra el esquema circular del plásmido y los sitios de corte de ambas enzimas de restricción. **B.** muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos y el corrimiento hipotético de los mismos en un gel de agarosa 0.7%. **C.** muestra el corrimiento de los plásmidos después de la digestión con las enzimas de restricción.

De igual manera, para el plásmido que contiene el ORF de la enzima I-SceI que corta al sistema reportero, se realizó la digestión con las enzimas EcoRI y BglII como se describió en materiales y métodos. El patrón de bandeado con estas enzimas según el análisis *in silico* generaría un fragmento de 4787 pb y otro de 878 pb (ver *figura 30B*), lo cual se comprobó experimentalmente (ver *figura 30C*).

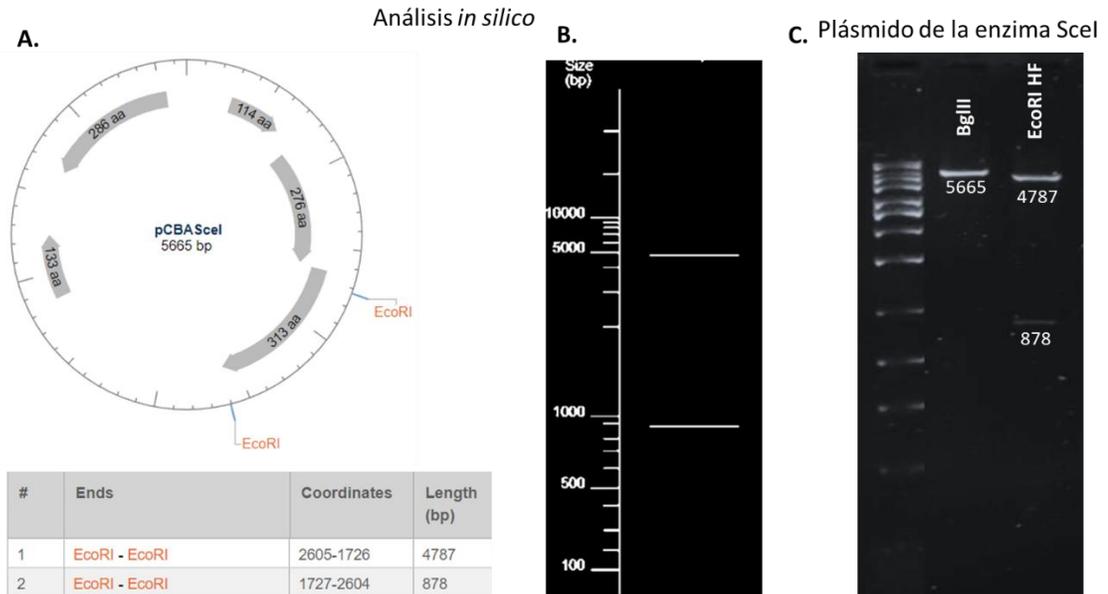


Figura 30. Comprobación de la identidad del plásmido con la enzima para cortar al sistema reportero. Se realizó la comprobación de la identidad del plásmido. **A.** muestra el esquema circular del plásmido y los sitios de corte de la enzima de restricción para el patrón de bandeó. **B.** muestra el tamaño de los fragmentos obtenidos y el corrimiento hipotético de los mismos en un gel de agarosa 0.7%. **C.** muestra el corrimiento de los plásmidos después de la digestión con las enzimas de restricción.

DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino es uno de los 10 cánceres más mortales a nivel mundial según la International Agency of Research of Cancer²³⁰, por lo que el tratamiento de esta neoplasia es prioritario. El tratamiento con cisplatino es uno de los más comúnmente utilizados en el CaCu⁷¹. Lamentablemente, la resistencia a este fármaco, incluso a dosis altas, muchas veces limita su eficiencia; es por eso, que encontrar compuestos que sensibilicen a las células cancerosas al tratamiento con cisplatino sería de gran utilidad. En ese sentido, uno de los mecanismos de resistencia a cisplatino está dado por la alta eficiencia en los mecanismos de reparación del ADN en las células cancerosas, los cuales son capaces de eliminar la mayor cantidad de aductos causados por el cisplatino, evitando la muerte de las células cancerosas^{93,95}.

En este trabajo se planteó evaluar el efecto quimiosensibilizador de resveratrol al tratamiento con cisplatino en células de cáncer cervicouterino, para lo cual se utilizaron 4 líneas celulares: C-33A, HeLa, SiHa y Caski. A partir de esta determinación se obtuvieron las cuatro IC₂₀ de 5.8379, 8.3066, 8.7695 y 2.4433 μ M para C-33A, HeLa, SiHa y CaSki, respectivamente (ver *tabla 7*). De igual manera se obtuvieron las cuatro IC₅₀ de 14.6328, 19.8789, 35.00 y 10.0039 μ M en el mismo orden (ver *tabla 7*). A partir de estos resultados se determinó que las células más sensibles al tratamiento con cisplatino son las células CaSki y C-33A, mientras que las más resistentes son HeLa y SiHa. En un trabajo previo, también reportaron que las células SiHa son las más resistentes al tratamiento con cisplatino que las células CaSki²³¹: en contraste con nuestro trabajo, en ese estudio determinaron que las células HeLa eran más sensibles al tratamiento que las células CaSki²³²; mientras que las células C-33A fueron las más sensibles. Estos autores encontraron que los niveles de survivina eran mayores en las células más resistentes (SiHa y CaSki), por lo que consideraron que esta proteína podría estar implicada en la resistencia al tratamiento²³¹; sin embargo, en otro trabajo más reciente, obtuvieron resultados similares a nuestro estudio donde se observó que las células CaSki eran las más sensibles al tratamiento con cisplatino, seguidas muy de cerca por las células C-33A, posteriormente HeLa y finalmente SiHa.

Estos resultados también coinciden con otro trabajo independiente donde se observó que las células CaSki eran más sensibles al tratamiento con cisplatino que HeLa y SiHa²³³. Todos estos trabajos en concordancia con el nuestro coinciden en que las células SiHa son las más resistentes al tratamiento con cisplatino. En este sentido, en un trabajo realizado en células SiHa y HeLa donde ambas líneas celulares fueron tratadas con cisplatino; los autores observaron también que las células SiHa eran más resistentes a dicho tratamiento que HeLa. Ellos demostraron que las células HeLa mostraban una mayor actividad de las caspasas 3, 8 y 9 que las células SiHa y que el tratamiento con cisplatino favorecía la actividad de NF-κB en SiHa; sin embargo, al inhibir químicamente a NF-κB en SiHa, la actividad de las caspasas aumentaba y la apoptosis se veía favorecida; curiosamente, ese efecto no se observó en las células HeLa por lo que la actividad de este factor de transcripción podría estar relacionado con la resistencia de las células SiHa al tratamiento con cisplatino²³⁴. De acuerdo con lo anterior, en otro trabajo demostraron que el tratamiento con cisplatino activa a ERK2 nuclear y NF-κB en células SiHa, lo cual favoreció la resistencia a cisplatino en estas células²³⁵, esto confirmaría que NF-κB podría ser el factor que vuelve a las células SiHa más resistentes al tratamiento con cisplatino.

Por otro lado, otro trabajo demostró que las células HeLa tenían mayores niveles de mensajero de p21^{Waf1/Cip1} y p53 que las células SiHa, de esta manera los autores explican la mayor sensibilidad de las células HeLa al tratamiento con cisplatino²³². Adicionalmente, en otro trabajo demostraron que las células SiHa tienen una sobre expresión de S100A9, una proteína de unión a calcio que se ha relacionado con la quimioresistencia ya que la sobre-expresión de esta proteína promueve la expresión de los oncogenes p-AKT, p-ERK, p-FOXO1 y Nanog volviendo a las células SiHa muy agresivas²³⁶.

Por otro lado, se comprobaron las IC50 de resveratrol que habían sido reportadas anteriormente en tres de estas líneas celulares, C-33A, HeLa y SiHa; y agregamos una cuarta línea celular, CaSki, donde determinamos la IC50 de resveratrol. Las IC50 que reportamos aquí son de 90.9, 164.7, 123.2 y 97.85 μM de resveratrol para C-33A, SiHa,

HeLa y CaSki, respectivamente (ver *tabla 7*). La línea celular C-33A resultó ser la más sensible al tratamiento, seguida por CaSki, HeLa y finalmente SiHa fue la más resistente.

Con respecto a esto, existe un trabajo realizado en células C-33A, HeLa y SiHa donde los autores observaron que las células más sensibles al tratamiento con resveratrol eran las C-33A, seguidas de HeLa y SiHa, lo que coincide con nuestro estudio; los autores de este trabajo sugieren que las células C-33A son más sensibles al tratamiento con resveratrol porque no están infectadas con VPH de ningún tipo, por lo que podrían considerarse menos agresivas que HeLa (HPV18) y SiHa (HPV16)²³⁷. En otro trabajo, realizado en células HeLa y SiHa, las células HeLa fueron ligeramente más sensibles al tratamiento con resveratrol que las células SiHa; sin embargo, en este trabajo, los autores demostraron que al inhibir químicamente la vía de Notch, la apoptosis aumentaba un poco más en las células SiHa que en las células HeLa, por el contrario, al inhibir la fosforilación de STAT3 las células HeLa eran las que se veían más afectadas, por lo que, aunque la viabilidad de ambas líneas celulares se ve modificada por ambas vías, la actividad de cada vía podría variar en cada línea²³⁸. Con respecto a lo anterior, en otro trabajo realizado en células HeLa, los autores demostraron que los niveles de mRNA y proteína de GRIM-19 (gen asociado con la proteína de mortalidad inducida por retinoide-IFN 19) aumentaban después del tratamiento con resveratrol, y disminuía la fosforilación de STAT3 y los niveles de mensajero de ciclina B1, VEGF y Bcl-2, ocasionando una menor supervivencia celular²³⁹. Adicionalmente, en otro trabajo donde no se utilizó resveratrol, se demostró que la vía de STAT3 regula la sensibilidad a la apoptosis en células de CaCu. Los autores observaron que en las células CaSki, cuya apoptosis se puede inducir por TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) la fosforilación de STAT3 se inhibía por esta proteína aumentando apoptosis, mientras que en las células SiHa, insensible a TRAIL, la apoptosis era menor; sin embargo, al inhibir mediante siRNA a STAT3, las células SiHa se volvían sensibles a TRAIL²⁴⁰. Esto podría explicar el hecho de

que las células CaSki y HeLa sean más sensibles a resveratrol que SiHa, debido a que son más dependientes de la actividad de STAT3.

Sin embargo, otros reportes tienen resultados variables, donde la sensibilidad al tratamiento con resveratrol entre estas 4 líneas celulares cambia, por ejemplo, en un trabajo se demostró que las células CaSki eran las más sensibles al tratamiento con resveratrol, seguidas de HeLa, C-33A y SiHa en ese orden. En este trabajo los autores encontraron que después del tratamiento con resveratrol, en las células HeLa, disminuyó la expresión de p53, mientras que en C-33A, SiHa y CaSki, su expresión aumentó. Además, la expresión de la subunidad de NF- κ B p65 disminuyó en C-33A, HeLa y CaSki, pero no en SiHa¹⁸³, esto podría explicar la mayor resistencia de esta línea al tratamiento.

Considerando lo anterior, aunque los mecanismos que podrían hacer a las células de CaCu más o menos resistentes al tratamiento con resveratrol, no están claros, pareciera que STAT3, p53 y NF- κ B, podrían ser los responsables de una mayor o menor supervivencia en cada línea celular.

Por otro lado, con respecto a los cambios en la expresión de Ku70 y Ku80 después del tratamiento con resveratrol en HeLa, SiHa y C-33A, los resultados fueron muy variables; por ejemplo, en el caso de Ku70, parece haber disminución en las 3 líneas celulares, aunque es más notorio en C-33A y SiHa, que en HeLa, aunque sin cambios estadísticamente significativos. Algo similar ocurrió con Ku80, donde observamos una disminución de Ku80 en HeLa y C-33A, pero no en SiHa. Este comportamiento es usual en compuestos como el resveratrol, ya que sus efectos pueden variar entre líneas celulares. En trabajos previos se ha demostrado un mosaicismo en el efecto de resveratrol sobre estas proteínas, por ejemplo, se observó que resveratrol disminuyó la expresión de la proteína Ku80, pero no de Ku70 en tres líneas celulares de adenocarcinoma de esófago, al evaluar el perfil proteómico de estas células²⁴¹, mientras que, en otro trabajo, el resveratrol demostró aumentar los niveles de Ku80 en una línea celular de linfoma de Burkitt aumentando la actividad de la vía NHEJ²⁴².

En otro estudio, un análogo del resveratrol SS28 demostró no tener ningún efecto sobre la expresión de las proteínas Ku70 y Ku80 en las células CEM (leucemia) y A549 (adenocarcinoma de pulmón)²⁴³. Por otro lado, se sabe que el resveratrol es un activador de SIRT1^{244,245}, una desacetilasa que a su vez ha demostrado favorecer la actividad (aunque no la expresión) de Ku70, mejorando la respuesta al daño al ADN²⁴⁶, por lo que esto podría explicar porque en nuestro estudio y los trabajos anteriores no se observó que resveratrol inhibiera la expresión de Ku70. En resumen, parece ser que el efecto del resveratrol sobre Ku70 y Ku80 es dependiente del contexto celular.

Es importante resaltar que a pesar de que si existen trabajos donde han evaluado de forma aislada el efecto de resveratrol sobre la expresión de Ku70/Ku80 no hay ningún trabajo donde se evalúe el efecto de resveratrol en células de cáncer cervicouterino, por lo que los mecanismos de regulación de estas proteínas por resveratrol, al menos en este tipo de cáncer, no se conocen. Nosotros observamos que el resveratrol tiene efectos interesantes sobre Ku70/80 en las células HeLa, ya que parece disminuir los niveles del mRNA y la proteína. En ese sentido, en un trabajo realizado en células de adenocarcinoma gástrico se observó que los niveles de Ku70 y Ku80 son dependientes de COX-2 que, a su vez, es dependiente de NF-κB, por lo que si NF-κB o COX-2 se inhiben, los niveles tanto de mensajero como de proteína de Ku70 y Ku80 se ven inhibidos también²⁴⁷. Este resultado es interesante, ya que resveratrol ha demostrado inhibir tanto a NF-κB^{183,248} como a COX-2²⁴⁹. Interesantemente, en células de adenocarcinoma de pulmón, se demostró que Ku80 favorece la actividad de la COX-2, lo que demuestra un bucle de regulación entre ellas, que podría estarse regulando por resveratrol²⁵⁰.

Por otro lado, con respecto a la localización de las proteínas, diversos artículos han demostrado que ambas proteínas son independientes una de la otra y que su localización puede ser diferencial y depender de varios factores^{251,252}. Entre estos trabajos, destaca uno realizado en una línea celular de cáncer de páncreas de ratón en el que los autores observaron que la localización nuclear de las proteínas se perdía en presencia de estrés oxidativo al modificar su interacción con importinas²⁵³. En este

sentido, se ha reportado que el resveratrol puede modular los niveles de estrés oxidativo, por lo que esto podría estar modificando la localización de las proteínas. Por otro lado, otro trabajo realizado en las mismas células demostró que la localización de Ku70 se ve afectada por la proteína de choque térmico 70 (Hsc70), ya que esta proteína impide la interacción de Ku70 con la importina alfa; sin embargo, Hsc70, puede ser inhibida por NF- κ B, por lo que la activación de esta favorece la localización de Ku70 al núcleo²⁵⁴. De acuerdo con esto, la localización de Ku70 podría verse modificada al inhibirse NF- κ B por resveratrol^{183,248}. En este trabajo hicimos un análisis preliminar de la localización de estas proteínas y aunque no observamos un cambio significativo, si encontramos algunas células con señal en el citoplasma; por lo que sería necesario repetir este experimento para demostrar si realmente el resveratrol puede inducir un cambio en la localización de Ku70 y/o Ku80. Además, sería interesante evaluar la localización de Ku70/80 tras tiempos cortos con el tratamiento, considerando que el daño al ADN debe ser rápidamente reparado.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se pudo concluir que la línea celular CaSki es la más sensible al tratamiento con cisplatino, seguida de C-33A y HeLa, mientras que SiHa es la línea más resistente a este fármaco. Asimismo, la línea celular C-33A es la más sensible al tratamiento con resveratrol, seguida de CaSki y HeLa, siendo SiHa también la más resistente a este tratamiento. Por otro lado, observamos que resveratrol disminuye la expresión de Ku70 en las células C-33A y SiHa aunque se requieren más repeticiones para determinar si este efecto es significativo. En el caso de Ku80, se observó que tanto en C-33A como en HeLa hubo una disminución en los niveles de la proteína, sin embargo, en el caso de C-33A, hacen falta más repeticiones para ver la tendencia real. Por otro lado, el resveratrol parece no tener un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de Ku70 y 80 a nivel de mensajero y proteína en células HeLa, ya que el tratamiento de resveratrol solo no mostró cambios estadísticamente significativos ni perceptibles a simple vista; sin embargo, para el caso de las combinaciones con la IC20 y la IC50 de cisplatino, se necesitan más repeticiones tanto en western blot como de qPCR para tener un resultado concreto, ya que visualmente sí se observan cambios, que además coinciden con la cuantificación en la intensidad de fluorescencia observados por microscopía, donde resveratrol sí parece modificarlas.

Hasta el momento no es claro si la localización de estas proteínas se modifica con los tratamientos de resveratrol, ya que se tienen pocas células por laminilla; sin embargo, es visualmente claro que el tratamiento combinado de ambos fármacos reduce drásticamente el número de células en comparación con los tratamientos solos, lo cual concuerda con los reportes que indican que el tratamiento con resveratrol favorece la apoptosis en células de CaCu.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del tratamiento combinado de resveratrol y cisplatino en las líneas celulares C-33^a, y CaSki para determinar si resveratrol modifica los niveles de ARN mensajero y proteína de Ku70/80 en estas, así como su localización.
- Evaluar los niveles de γ -H2AX en las tres líneas celulares para determinar el nivel de daño causado por los tratamientos y verificar su co-localización con Ku70/80.
- Evaluar la expresión y localización de Ku70/80 en tiempos cortos después del tratamiento.
- Realizar la transfección del plásmido con el sistema reportero para determinar si la reparación por la vía NHEJ se ve afectada por el tratamiento con resveratrol.
- Determinar si la inhibición de Ku70/Ku80 mediante siRNA sensibiliza a las líneas celulares de cáncer cervicouterino al tratamiento con cisplatino.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferenczy, A. & Wright, T. C. Anatomy and histology of the cervix. in *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract* (ed. Kurman, R. J.) 185–201 (Springer, 1994).
2. ¿Qué es el sarcoma uterino? <https://www.cancer.org/es/cancer/sarcoma-uterino/acerca/que-es-sarcoma-uterino.html>.
3. Prendiville, W. & Sankaranarayanan, R. Anatomy of the uterine cervix and the transformation zone. in *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer* 13–21 (International Agency for Research on Cancer, 2017).
4. De Tomasi, J. B., Opata, M. M. & Mowa, C. N. Immunity in the Cervix: Interphase between Immune and Cervical Epithelial Cells. *J. Immunol. Res.* **2019**, e7693183 (2019).
5. Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-., C., Germany. Cervical cancer: Overview. *InformedHealth.org* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279259/> (2017).
6. ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)? <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>.
7. Cervical Cancer Risk Factors | Risk Factors for Cervical Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>.
8. Burd, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 1–17 (2003).
9. Olusola, P., Banerjee, H. N., Philley, J. V. & Dasgupta, S. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities. *Cells* **8**, 622–633 (2019).
10. Prendiville, W. & Sankaranarayanan, R. Squamous intraepithelial lesions: cytology–histology correlation. in *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer* 23–27 (International Agency for Research on Cancer, 2017).
11. Tota, J. E. *et al.* Anogenital Human Papillomavirus (HPV) Infection, Seroprevalence, and Risk Factors for HPV Seropositivity Among Sexually Active Men Enrolled in a Global HPV Vaccine Trial. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 1247–1256 (2022).
12. Islami, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Bray, F. & Jemal, A. International trends in anal cancer incidence rates. *Int. J. Epidemiol.* **46**, 924–938 (2017).

13. Chaturvedi, A. K. *et al.* Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *J. Clin. Oncol.* **31**, 4550–4559 (2013).
14. Sabatini, M. E. & Chiocca, S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br. J. Cancer* **122**, 306–314 (2020).
15. Xiong, W.-M. *et al.* The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 96419–96432 (2017).
16. Cardona, A. F. *et al.* *Human Papillomavirus Infection and Lung Cancer. Current Perspectives in Human Papillomavirus* (IntechOpen, 2018). doi:10.5772/intechopen.80706.
17. Alam, M., Caldwell, J. B. & Eliezri, Y. D. Human papillomavirus-associated digital squamous cell carcinoma: literature review and report of 21 new cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 385–393 (2003).
18. Chen, M.-L. *et al.* The Impact of Human Papillomavirus Infection on Skin Cancer: A Population-Based Cohort Study. *The Oncologist* **26**, e473–e483 (2021).
19. Bodaghi, S. *et al.* Colorectal papillomavirus infection in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 2862 (2005).
20. Baandrup, L. *et al.* The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **50**, 1446–1461 (2014).
21. Farhadi, A. *et al.* High-risk human papillomavirus infection in different histological subtypes of renal cell carcinoma. *J. Med. Virol.* **86**, 1134–1144 (2014).
22. Ren, C. *et al.* Human papillomavirus infection increases the risk of breast carcinoma: a large-scale systemic review and meta-analysis of case-control studies. *Gland Surg.* **8**, 48600–48500 (2019).
23. Khatami, A., Salavatiha, Z. & Razizadeh, M. H. Bladder cancer and human papillomavirus association: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Agent. Cancer* **17**, 1–9 (2022).
24. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* **25**, 2–23 (2015).
25. Egawa, N. & Doorbar, J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res.* **231**, 119–127 (2017).
26. Munoz, N. *et al.* The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: A population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int. J. Cancer* **52**, 743–749 (1992).
27. Doorbar, J. *et al.* The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **30**, 55–70 (2012).

28. Muñoz, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 518–527 (2003).
29. Muñoz, N. *et al.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? the international perspective. *Int. J. Cancer* **111**, 278–285 (2004).
30. Koshiol, J. E. *et al.* Time to clearance of human papillomavirus infection by type and human immunodeficiency virus serostatus. *Int. J. Cancer* **119**, 1623–1629 (2006).
31. Prendiville, W. & Sankaranarayanan, R. *The effect of oncogenic HPV on transformation zone epithelium. Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer* (International Agency for Research on Cancer, 2017).
32. Gariglio, P. & Rangel, L. M. Virus y Cáncer. *Salud Pública México* **34**, 308–317 (1992).
33. Graham, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin. Sci.* **131**, 2201–2221 (2017).
34. Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P. & Lambert, P. F. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* **5**, e1000318 (2009).
35. Ibarra Sierra, E. *et al.* Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model. *Virology* **433**, 337–345 (2012).
36. Ashrafi, G. H., Haghshenas, M. R., Marchetti, B., O'Brien, P. M. & Campo, M. S. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int. J. Cancer* **113**, 276–283 (2005).
37. Tsao, Y. P., Li, L. Y., Tsai, T. C. & Chen, S. L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sd1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. *J. Virol.* **70**, 7535–7539 (1996).
38. Pedroza-Saavedra, A., Lam, E. W.-F., Esquivel-Guadarrama, F. & Gutierrez-Xicotencatl, L. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1). *Virology* **400**, 44–52 (2010).
39. Venuti, A. *et al.* Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* **10**, 140–158 (2011).
40. Kabsch, K. & Alonso, A. The human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J. Virol.* **76**, 12162–12172 (2002).
41. Wasson, C. W. *et al.* Human papillomavirus type 18 E5 oncogene supports cell cycle progression and impairs epithelial differentiation by modulating growth factor receptor signalling during the virus life cycle. *Oncotarget* **8**, 103581–103600 (2017).

42. Kim, S.-H. *et al.* Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ ERK1,2 and PI3K/Akt. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 930–938 (2006).
43. Lane, D. P. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
44. Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245–2262 (1998).
45. Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495–505 (1993).
46. Darnell, G. A. *et al.* Human Papillomavirus E7 Requires the Protease Calpain to Degrade the Retinoblastoma Protein *. *J. Biol. Chem.* **282**, 37492–37500 (2007).
47. McLaughlin-Drubin, M. E., Park, D. & Munger, K. Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16175–16180 (2013).
48. Nor Rashid, N., Yusof, R. & Watson, R. J. Y. 2011. Disruption of repressive p130–DREAM complexes by human papillomavirus 16 E6/E7 oncoproteins is required for cell-cycle progression in cervical cancer cells. *J. Gen. Virol.* **92**, 2620–2627 (2011).
49. Peter, M. *et al.* MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* **25**, 5985–5993 (2006).
50. Veldman, T., Liu, X., Yuan, H. & Schlegel, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8211–8216 (2003).
51. Liu, X. *et al.* HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18780–18785 (2009).
52. Leão, R. *et al.* Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J. Biomed. Sci.* **25**, 22–33 (2018).
53. Chakrabarti, O. *et al.* Human Papillomavirus Type 16 E6 Amino Acid 83 Variants Enhance E6-Mediated MAPK Signaling and Differentially Regulate Tumorigenesis by Notch Signaling and Oncogenic Ras. *J. Virol.* **78**, 5934–5945 (2004).
54. Yuan, C.-H., Filippova, M. & Duerksen-Hughes, P. Modulation of apoptotic pathways by human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and implications for therapy. *Viruses* **4**, 3831–3850 (2012).
55. Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S. & Duerksen-Hughes, P. J. The human Papillomavirus 16 E6 protein binds to Tumor Necrosis Factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis *. *J. Biol. Chem.* **277**, 21730–21739 (2002).

56. Thompson, D. A. *et al.* The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in normal human fibroblasts. *Oncogene* **20**, 3629–3640 (2001).
57. Toussaint-Smith, E., Donner, D. B. & Roman, A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* **23**, 2988–2995 (2004).
58. Pal, A. & Kundu, R. Human papillomavirus E6 and E7: The cervical cancer hallmarks and targets for therapy. *Front. Microbiol.* **10**, 3116–3131 (2020).
59. Wang, N. *et al.* Increased expression of RRM2 by human papillomavirus E7 oncoprotein promotes angiogenesis in cervical cancer. *Br. J. Cancer* **110**, 1034–1044 (2014).
60. Hellner, K., Mar, J., Fang, F., Quackenbush, J. & Münger, K. HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* **391**, 57–63 (2009).
61. Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K. & Raj, K. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* **31**, 918–926 (2010).
62. Hyland, P. L. *et al.* Evidence for Alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and Epigenetic Reprogramming in Human Papillomavirus Type 16 E6/E7-Expressing Keratinocytes ∇ . *J. Virol.* **85**, 10999–11006 (2011).
63. Wang, R. *et al.* Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* **471**, 88–102 (2020).
64. Ocadiz, R. *et al.* Circulating miR-15b, miR-34a and miR-218 as promising novel early low-invasive biomarkers of cervical carcinogenesis. *APMIS* **129**, 70–79 (2021).
65. Nascimento, N. P. G., Gally, T. B., Borges, G. F., Campos, L. C. G. & Kaneto, C. M. Systematic review of circulating MICRORNAs as biomarkers of cervical carcinogenesis. *BMC Cancer* **22**, 862 (2022).
66. Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F. & Consolaro, M. E. L. A review of methods for detect human Papillomavirusinfection. *Viol. J.* **9**, 262 (2012).
67. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
68. Tsu, V. D., Jeronimo, J. & Anderson, B. O. Why the time is right to tackle breast and cervical cancer in low-resource settings. *Bull. World Health Organ.* **91**, 683–690 (2013).
69. Urrutia S, M. T. *et al.* ¿Por qué las mujeres no se toman el papanicolau?: Barreras percibidas por un grupo de mujeres ingresadas al programa de cáncer cervicouterino auge. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* **73**, 98–103 (2008).
70. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca.html> (2021).

71. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. in *PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2002).
72. Garrido, M. C., Tello, E., Liberal, M. L., Müller, A. & Mestanza, J. A. Revisión de la exenteración pélvica en el cáncer de cérvix. Descripción de nuestra casuística. *Clínica E Investig. En Ginecol. Obstet.* **41**, 122–128 (2014).
73. Sola, A. Radioterapia de intensidad modulada (IMRT). *Rev. Médica Clínica Las Condes* **22**, 834–843 (2011).
74. Velasco, M. *et al.* Quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado. *Rev. Senol. Patol. Mamar. - J. Breast Sci.* **25**, 14–21 (2012).
75. Vora, C. & Gupta, S. Targeted therapy in cervical cancer. *ESMO Open* **3**, e000462 (2019).
76. Sun, C. *et al.* Patient preferences for side effects associated with cervical cancer treatment. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **24**, 1077–1084 (2014).
77. Tewari, K. S. *et al.* Improved Survival with Bevacizumab in Advanced Cervical Cancer. *N. Engl. J. Med.* **370**, 734–743 (2014).
78. Monk, B. J. *et al.* Phase II Trial of Bevacizumab in the Treatment of Persistent or Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Cervix: A Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1069–1074 (2009).
79. Tratamiento del cáncer de cuello uterino (PDQ®)—Versión para pacientes - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/paciente/tratamiento-cuello-uterino-pdq> (2021).
80. Basu, P. *et al.* A randomized phase 2 study of ADXS11-001 Listeria monocytogenes–Listeriolysin o ommunotherapy with or without cisplatin in treatment of advanced cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **28**, 764–772 (2018).
81. Frenel, J.-S. *et al.* Pembrolizumab in patients with advanced cervical squamous cell cancer: Preliminary results from the phase Ib KEYNOTE-028 study. *J. Clin. Oncol.* **34**, 5515–5515 (2016).
82. Lheureux, S. *et al.* A phase I/II study of ipilimumab in women with metastatic or recurrent cervical carcinoma: A study of the Princess Margaret and Chicago N01 Consortia. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3061–3061 (2015).
83. Karim, R. *et al.* Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 6341–6347 (2009).

84. Divya, C. S. & Pillai, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol. Carcinog.* **45**, 320–332 (2006).
85. Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. & Gupta, R. C. Tanshinone IIA inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer. *Cancer Lett.* **356**, 536–546 (2015).
86. Mahata, S. *et al.* Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. *Mol. Cancer* **10**, 39–52 (2011).
87. Lee, H.-G. *et al.* Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 339–343 (2005).
88. Kim, M. S. *et al.* Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.* **29**, 259–272 (2013).
89. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).
90. Peyrone, M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **51**, 1–29 (1844).
91. Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698–699 (1965).
92. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chem.* **88**, 102925 (2019).
93. Rocha, C., Silva, M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. & Menck, C. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* **73**, e478s (2018).
94. Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. & Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14298–14302 (2002).
95. Zhu, H. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 1885–1895 (2016).
96. Meng, F., Tan, S., Liu, T., Song, H. & Lou, G. Predictive significance of combined LAPT4B and VEGF expression in patients with cervical cancer. *Tumor Biol.* **37**, 4849–4855 (2016).
97. Nishikawa, K. *et al.* Resistance of human cervical carcinoma cells to tumor necrosis factor correlates with their increased sensitivity to cisplatin: evidence of a role for DNA repair and epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* **52**, 4758–4765 (1992).

98. Shen, D.-W., Pouliot, L. M., Hall, M. D. & Gottesman, M. M. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol. Rev.* **64**, 706–721 (2012).
99. Gupta, A. Upregulation of microRNA-155 is associated with cisplatin resistance in the head and neck cancer UMSCC-10B/15s cells. (Southern Illinois University Carbondale, 2010).
100. Gao, Y. *et al.* MicroRNA-155 increases colon cancer chemoresistance to cisplatin by targeting forkhead box O3. *Oncol. Lett.* **15**, 4781–4788 (2018).
101. Zang, Y.-S., Zhong, Y.-F., Fang, Z., Li, B. & An, J. MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression. *Cancer Gene Ther.* **19**, 773–778 (2012).
102. Lei, C. *et al.* Up-regulated miR155 Reverses the Epithelial-mesenchymal Transition Induced by EGF and Increases Chemo-sensitivity to Cisplatin in Human Caski Cervical Cancer Cells. *PLOS ONE* **7**, e52310 (2012).
103. Wang, F., Liu, M., Li, X. & Tang, H. MiR-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl212 in cervical cancer cells. *FEBS Lett.* **587**, 488–495 (2013).
104. Duan, M., Ulibarri, J., Liu, K. J. & Mao, P. Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 9248–9260 (2020).
105. Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R. & Essigmann, J. M. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem. Biol.* **3**, 579–589 (1996).
106. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–720 (2003).
107. Shrivastav, M., De Haro, L. P. & Nickoloff, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134–147 (2008).
108. Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A. & Lahav, G. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid-S phase. *Mol. Cell* **47**, 320–329 (2012).
109. Zhao, X. *et al.* Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **49**, 655–668 (2017).
110. Bhargava, R., Onyango, D. O. & Stark, J. M. Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet. TIG* **32**, 566–575 (2016).
111. Caracciolo, D., Montesano, M., Tagliaferri, P. & Tassone, P. Alternative non-homologous end joining repair: a master regulator of genomic instability in cancer. *Precis. Cancer Med.* **2**, (2019).

112. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495 (2017).
113. Moynahan, M. E. & Jasin, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 196–207 (2010).
114. Esashi, F. *et al.* CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**, 598–604 (2005).
115. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* **2**, 130–143 (2013).
116. Weterings, E. & Chen, D. J. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* **18**, 114–124 (2008).
117. Qiu, S. & Huang, J. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **22**, 31–37 (2021).
118. Gottlieb, T. M. & Jackson, S. P. The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131–142 (1993).
119. Costantini, S., Woodbine, L., Andreoli, L., Jeggo, P. A. & Vindigni, A. Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair* **6**, 712–722 (2007).
120. Yano, K. *et al.* Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.* **9**, 91–96 (2008).
121. Grundy, G. J. *et al.* APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *EMBO J.* **32**, 112–125 (2013).
122. Cary, R. B. *et al.* DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4267–4272 (1997).
123. Moon, A. F. *et al.* The X Family Portrait: Structural Insights into Biological Functions of X Family Polymerases. *DNA Repair* **6**, 1709–1725 (2007).
124. Povirk, L. F., Zhou, T., Zhou, R., Cowan, M. J. & Yannone, S. M. Processing of 3'-Phosphoglycolate-terminated DNA Double Strand Breaks by Artemis Nuclease *. *J. Biol. Chem.* **282**, 3547–3558 (2007).
125. Ahel, I. *et al.* The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* **443**, 713–716 (2006).
126. Kanno, S. *et al.* A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses. *EMBO J.* **26**, 2094–2103 (2007).
127. Bernstein, N. K. *et al.* The Molecular Architecture of the Mammalian DNA Repair Enzyme, Polynucleotide Kinase. *Mol. Cell* **17**, 657–670 (2005).

128. Grawunder, U. *et al.* Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**, 492–495 (1997).
129. Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. & Ozer, N. K. Resveratrol: French paradox revisited. *Front. Pharmacol.* **3**, 141–158 (2012).
130. Gambini, J. *et al.* Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 837042 (2015).
131. Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J. & Crozier, A. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3337–3340 (2002).
132. Gresele, P. *et al.* Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 201–211 (2011).
133. Taylor, E. J. M., Yu, Y., Champer, J. & Kim, J. Resveratrol demonstrates antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* In Vitro. *Dermatol. Ther.* **4**, 249–257 (2014).
134. Baur, J. A. & Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 493–506 (2006).
135. Kitada, M. & Koya, D. Renal Protective Effects of Resveratrol. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 568093 (2013).
136. Den Hartogh, D. J. & Tsiani, E. Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients* **11**, 1624 (2019).
137. Meng, H.-Y. *et al.* Resveratrol improves neurological outcome and neuroinflammation following spinal cord injury through enhancing autophagy involving the AMPK/mTOR pathway. *Mol. Med. Rep.* **18**, 2237–2244 (2018).
138. Izzo, C. *et al.* The Role of Resveratrol in Liver Disease: A Comprehensive Review from In Vitro to Clinical Trials. *Nutrients* **13**, 933 (2021).
139. Tang, Y. *et al.* The therapeutic efficacy of resveratrol for acute lung injury—A meta-analysis of preclinical trials. *Front. Pharmacol.* **13**, 963245 (2022).
140. Beijers, R. J. H. C. G., Gosker, H. R. & Schols, A. M. W. J. Resveratrol for patients with chronic obstructive pulmonary disease: hype or hope? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **21**, 138–144 (2018).
141. Wang, Y. *et al.* Resveratrol in Intestinal Health and Disease: Focusing on Intestinal Barrier. *Front. Nutr.* **9**, 848400 (2022).
142. Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P.-Y. & Jameson, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14138–14143 (1997).

143. Bowers, J. L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C. & Klinge, C. M. Resveratrol Acts as a Mixed Agonist/Antagonist for Estrogen Receptors α and β^* . *Endocrinology* **141**, 3657–3667 (2000).
144. Nwachukwu, J. C. *et al.* Resveratrol modulates the inflammatory response via an estrogen receptor-signal integration network. *eLife* **3**, e02057 (2014).
145. Le Corre, L., Fustier, P., Chalabi, N., Bignon, Y.-J. & Bernard-Gallon, D. Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clin. Chim. Acta* **344**, 115–121 (2004).
146. Lin, H.-Y. *et al.* Resveratrol is pro-apoptotic and thyroid hormone is anti-apoptotic in glioma cells: both actions are integrin and ERK mediated. *Carcinogenesis* **29**, 62–69 (2008).
147. Belleri, M. *et al.* $\alpha\beta_3$ Integrin-dependent antiangiogenic activity of resveratrol stereoisomers. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3761–3770 (2008).
148. Casper, R. F. *et al.* Resveratrol Has Antagonist Activity on the Aryl Hydrocarbon Receptor: Implications for Prevention of Dioxin Toxicity. *Mol. Pharmacol.* **56**, 784–790 (1999).
149. Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J. & Bishayee, A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **40–41**, 209–232 (2016).
150. Liu, Z., Wu, X., Lv, J., Sun, H. & Zhou, F. Resveratrol induces p53 in colorectal cancer through SET7/9. *Oncol. Lett.* **17**, 3783–3789 (2019).
151. Ashrafizadeh, M. *et al.* Resveratrol as an Enhancer of Apoptosis in Cancer: A Mechanistic Review. *Anticancer Agents Med. Chem.* **21**, 2327–2336 (2021).
152. Fang, Y., DeMarco, V. G. & Nicholl, M. B. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. *Cancer Sci.* **103**, 1090–1098 (2012).
153. Kim, Y.-A., Rhee, S.-H., Park, K.-Y. & Choi, Y. H. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J. Med. Food* **6**, 273–280 (2003).
154. Kotha, A. *et al.* Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 621–629 (2006).
155. Wolter, F., Akoglu, B., Clausnitzer, A. & Stein, J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J. Nutr.* **131**, 2197–2203 (2001).
156. Yuan, L. *et al.* Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53-independent pathway in A549 cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 2459–2464 (2015).

157. Ko, J.-H. *et al.* The role of resveratrol in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2589–2624 (2017).
158. Tinhofer, I. *et al.* Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J.* **15**, 1613–1615 (2001).
159. Delmas, D. *et al.* Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 41482–41490 (2003).
160. Ma, X., Tian, X., Huang, X., Yan, F. & Qiao, D. Resveratrol-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis are associated with Ca²⁺ and mCICR-mediated MPT activation in HepG2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **302**, 99–109 (2007).
161. Sareen, D., Darjatmoko, S. R., Albert, D. M. & Polans, A. S. Mitochondria, Calcium, and Calpain are Key Mediators of Resveratrol-Induced Apoptosis in Breast Cancer. *Mol. Pharmacol.* **72**, 1466–1475 (2007).
162. Fu, X., Li, M., Tang, C., Huang, Z. & Najafi, M. Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis* **26**, 561–573 (2021).
163. Takashina, M. *et al.* Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int. J. Oncol.* **50**, 787–797 (2017).
164. Li, D. *et al.* Resveratrol suppresses colon cancer growth by targeting the AKT/STAT3 signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **43**, 630–640 (2019).
165. Zhang, J. *et al.* Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca(2+)/AMPK/mTOR pathway in A549 cells. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 317–328 (2013).
166. Chang, C.-H. *et al.* Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. *Int. J. Oncol.* **50**, 873–882 (2017).
167. Zhang, Y., Yang, S., Yang, Y. & Liu, T. Resveratrol induces immunogenic cell death of human and murine ovarian carcinoma cells. *Infect. Agent. Cancer* **14**, 27 (2019).
168. Cao, Z., Fang, J., Xia, C., Shi, X. & Jiang, B.-H. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene Inhibits Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5253–5263 (2004).
169. Herzog, J. *et al.* Cyclin-dependent kinase 5 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α : a novel approach for inhibiting angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **7**, 27108–27121 (2016).
170. Stasinopoulos, I., O'Brien, D. R. & Bhujwalla, Z. M. Inflammation, but not hypoxia, mediated HIF-1 α activation depends on COX-2. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 31–35 (2009).

171. Park, S. Y. *et al.* Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 α and VEGF expression: Their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett.* **258**, 63–69 (2007).
172. Trapp, V., Parmakhtiar, B., Papazian, V., Willmott, L. & Fruehauf, J. P. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* **13**, 305–315 (2010).
173. Chai, R. *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **16**, 8037–8044 (2017).
174. Yuan, L. *et al.* Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial- mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **20**, 2783–2795 (2019).
175. Buhrmann, C. *et al.* Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochem. Pharmacol.* **98**, 51–68 (2015).
176. Ji, Q. *et al.* Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer* **15**, 97 (2015).
177. Sun, H. *et al.* Resveratrol Reverses Cigarette Smoke-Induced Urocytic Epithelial–Mesenchymal Transition via Suppression of STAT3 Phosphorylation in SV-HUC-1-Immortalized Human Urothelial Cells. *Oncotargets Ther.* **12**, 10227–10237 (2019).
178. Gao, Q., Yuan, Y., Gan, H.-Z. & Peng, Q. Resveratrol inhibits the hedgehog signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition and suppresses gastric cancer invasion and metastasis. *Oncol. Lett.* **9**, 2381–2387 (2015).
179. Yin, L. *et al.* Gastric-cancer-derived mesenchymal stem cells: a promising target for resveratrol in the suppression of gastric cancer metastasis. *Hum. Cell* **33**, 652–662 (2020).
180. Hu, F.-W. *et al.* Impairment of tumor-initiating stem-like property and reversal of epithelial–mesenchymal transdifferentiation in head and neck cancer by resveratrol treatment. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1247–1258 (2012).
181. Yang, Z. *et al.* Resveratrol suppresses the invasion and migration of human gastric cancer cells via inhibition of MALAT1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition. *Exp. Ther. Med.* **17**, 1569–1578 (2019).
182. Guo, K. *et al.* Resveratrol and Its Analogs: Potent Agents to Reverse Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Tumors. *Front. Oncol.* **11**, 644134 (2021).

183. García, S. P., García, E., Díaz, J., Hernández, R. & Gariglio, P. Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **22**, 577–584 (2013).
184. Li, L. *et al.* Resveratrol suppresses human cervical carcinoma cell proliferation and elevates apoptosis via the mitochondrial and p53 signaling pathways. *Oncol. Lett.* **15**, 9845–9851 (2018).
185. Yu, R. *et al.* Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol. Pharmacol.* **60**, (2001).
186. Banerjee Mustafi, S., Chakraborty, P. K. & Raha, S. Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70. *PLoS One* **5**, e8719 (2010).
187. Singh, A. K. & Vinayak, M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* **66**, 911–921 (2017).
188. Maher, P. *et al.* ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 261 (2011).
189. Sun, X. *et al.* Resveratrol inhibits the progression of cervical cancer by suppressing the transcription and expression of HPV E6 and E7 genes. *Int. J. Mol. Med.* **47**, 335–345 (2021).
190. Woo, J.-H. *et al.* Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC δ signal transduction. *Oncogene* **23**, 1845–1853 (2004).
191. Sun, X. *et al.* Resveratrol suppresses the growth and metastatic potential of cervical cancer by inhibiting STAT3 Tyr705 phosphorylation. *Cancer Med.* **9**, 8685–8700 (2020).
192. Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. & Perluigi, M. Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 737–747 (2012).
193. Rezk, Y. A., Balulad, S. S., Keller, R. S. & Bennett, J. A. Use of Resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: Study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**, e23–e26 (2006).
194. Ma, L. *et al.* Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by inducing mitochondrial dysfunction and cell apoptosis. *Int. J. Oncol.* **47**, 1460–1468 (2015).

195. Hu, S. *et al.* The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **48**, 528–535 (2016).
196. Osman, A.-M. M. *et al.* Chemosensitizing and nephroprotective effect of resveratrol in cisplatin-treated animals. *Cancer Cell Int.* **15**, 6–13 (2015).
197. Björklund, M., Roos, J., Gogvadze, V. & Shoshan, M. Resveratrol induces SIRT1- and energy-stress-independent inhibition of tumor cell regrowth after low-dose platinum treatment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **68**, 1459–1467 (2011).
198. Liu, Z., Peng, Q., Li, Y. & Gao, Y. Resveratrol enhances cisplatin-induced apoptosis in human hepatoma cells via glutamine metabolism inhibition. *BMB Rep.* **51**, 474–479 (2018).
199. Engelke, L. H., Hamacher, A., Proksch, P. & Kassack, M. U. Ellagic acid and resveratrol prevent the development of cisplatin resistance in the epithelial ovarian cancer cell line A2780. *J. Cancer* **7**, 353–363 (2016).
200. Hernandez, J. *et al.* Induction of p53 phosphorylation at serine 20 by resveratrol is required to activate p53 target genes, restoring apoptosis in MCF-7 cells resistant to cisplatin. *Nutrients* **10**, 1148–1164 (2018).
201. Cocetta, V., Quagliariello, V., Fiorica, F., Berretta, M. & Montopoli, M. Resveratrol as chemosensitizer agent: State of art and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2049–2068 (2021).
202. Nessa, M. U., Beale, P., Chan, C., Yu, J. Q. & Huq, F. Combinations of resveratrol, cisplatin and oxaliplatin applied to human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* **32**, 53–59 (2012).
203. Özdemir, F. *et al.* Apoptotic effects of ϵ -viniferin in combination with cis-platin in C6 cells. *Cytotechnology* **70**, 1061–1073 (2018).
204. Xing, C., Zhu, B., Liu, H., Yao, H. & Zhang, L. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 activates autophagy and induces apoptosis through p53 pathway in gastric cancer cell line SGC7901. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **40**, 194–201 (2008).
205. Lagunas-Rangel, F. A. & Bermúdez-Cruz, R. M. Natural Compounds That Target DNA Repair Pathways and Their Therapeutic Potential to Counteract Cancer Cells. *Front. Oncol.* **10**, (2020).
206. Chen, R.-S. *et al.* Pemetrexed downregulates ERCC1 expression and enhances cytotoxicity effected by resveratrol in human nonsmall cell lung cancer cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **386**, 1047–1059 (2013).
207. Ko, J.-C. *et al.* Resveratrol Enhances Etoposide-Induced Cytotoxicity through Down-Regulating ERK1/2 and AKT-Mediated X-ray Repair Cross-Complement Group 1

- (XRCC1) Protein Expression in Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **117**, 383–391 (2015).
208. Mohapatra, P. *et al.* Resveratrol mediated cell death in cigarette smoke transformed breast epithelial cells is through induction of p21Waf1/Cip1 and inhibition of long patch base excision repair pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **275**, 221–231 (2014).
209. Das, D., Preet, R., Mohapatra, P., Satapathy, S. R. & Kundu, C. N. 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea enhances the inhibitory effect of Resveratrol on 5-fluorouracil sensitive/resistant colon cancer cells. *World J. Gastroenterol. WJG* **19**, 7374–7388 (2013).
210. Leon-Galicia, I. *et al.* Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **22**, 11–20 (2013).
211. Leon, I. *et al.* Resveratrol decreases Rad51 expression and sensitizes cisplatin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **39**, 3025–3033 (2018).
212. Ruíz, G. *et al.* Inhibition of RAD51 by siRNA and Resveratrol Sensitizes Cancer Stem Cells Derived from HeLa Cell Cultures to Apoptosis. *Stem Cells Int.* **2018**, e2493869 (2018).
213. Chen, Y.-A. *et al.* Sensitization of Radioresistant Prostate Cancer Cells by Resveratrol Isolated from *Arachis hypogaea* Stems. *PLOS ONE* **12**, e0169204 (2017).
214. Sánchez Vizcarra, A. 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. (Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, 2020).
215. Gatz, S. A. *et al.* Resveratrol modulates DNA double-strand break repair pathways in an ATM/ATR-p53- and -Nbs1-dependent manner. *Carcinogenesis* **29**, 519–527 (2008).
216. Chen, Q., Cai, D., Li, M. & Wu, X. The homologous recombination protein RAD51 is a promising therapeutic target for cervical carcinoma. *Oncol. Rep.* **38**, 767–774 (2017).
217. Sishc, B. J. & Davis, A. J. The role of the core non-homologous end joining factors in carcinogenesis and cancer. *Cancers* **9**, 81–110 (2017).
218. Saygili, U. *et al.* The relationship between expression of Ku70 and survival in irradiated patients with endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **95**, 518–522 (2004).
219. Song, L. *et al.* DNA repair and replication proteins as prognostic markers in melanoma. *Histopathology* **62**, 343–350 (2013).
220. Abdelbaqi, K., Di Paola, D., Rampakakis, E. & Zannis-Hadjopoulos, M. Ku protein levels, localization and association to replication origins in different stages of breast tumor progression. *J. Cancer* **4**, 358–370 (2013).

221. Komuro, Y. *et al.* The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer* **95**, 1199–1205 (2002).
222. Ma, Q. *et al.* Ku80 is highly expressed in lung adenocarcinoma and promotes cisplatin resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **31**, 99–108 (2012).
223. C-33 A [c-33a] | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-31>.
224. HeLa | ATCC. <https://www.atcc.org/products/ccl-2>.
225. SiHa | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-35>.
226. Ca Ski - CRM-CRL-1550 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crm-crl-1550>.
227. Feoktistova, M., Geserick, P. & Leverkus, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, pdb.prot087379 (2016).
228. Arnoult, N. *et al.* Regulation of DNA Repair pathway choice in S/G2 by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* **549**, 548–552 (2017).
229. Addgene: Protocol - How to Create a Bacterial Glycerol Stock. <https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/>.
230. Cancer today. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
231. Saxena, A., Yashar, C., Taylor, D. D. & Gerdel-Taylor, C. Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 1399–1403 (2005).
232. Funaoka, K. *et al.* High-risk HPV-positive human cancer cell lines show different sensitivity to cisplatin-induced apoptosis correlated with the p21Waf1/Cip1 level. *Cancer Lett.* **108**, 15–23 (1996).
233. Gomes, I. N. F. *et al.* Annona coriacea Mart. Fractions Promote Cell Cycle Arrest and Inhibit Autophagic Flux in Human Cervical Cancer Cell Lines. *Molecules* **24**, 3963 (2019).
234. Venkatraman, M., Anto, R. J., Nair, A., Varghese, M. & Karunakaran, D. Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Carcinog.* **44**, 51–59 (2005).
235. Py, Y. *et al.* Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem. Pharmacol.* **63**, (2002).
236. Zhao, C. *et al.* S100A9 regulates cisplatin chemosensitivity of squamous cervical cancer cells and related mechanism. *Cancer Manag. Res.* **10**, 3753–3764 (2018).

237. Xin, S. *et al.* Effects of Res on proliferation and apoptosis of human cervical carcinoma cell lines C33A, SiHa and HeLa. *J. Med. Coll. PLA* **24**, 148–154 (2009).
238. Zhang, P. *et al.* Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. *Genes Cancer* **5**, 154–164 (2014).
239. Li, Y.-G. *et al.* GRIM-19-mediated Stat3 activation is a determinant for resveratrol-induced proliferation and cytotoxicity in cervical tumor-derived cell lines. *Mol. Med. Rep.* **11**, 1272–1277 (2015).
240. Nakamura, H. *et al.* STAT3 activity regulates sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cervical cancer cells. *Int. J. Oncol.* **49**, 2155–2162 (2016).
241. Dhir, H. *et al.* Interception of Signaling Circuits of Esophageal Adenocarcinoma Cells by Resveratrol Reveals Molecular and Immunomodulatory Signatures. *Cancers* **13**, 5811 (2021).
242. Jara, P. *et al.* The Effect of Resveratrol on Cell Viability in the Burkitt's Lymphoma Cell Line Ramos. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **23**, 0014 (2017).
243. Thomas, E. *et al.* A Novel Resveratrol Based Tubulin Inhibitor Induces Mitotic Arrest and Activates Apoptosis in Cancer Cells. *Sci. Rep.* **6**, 34653 (2016).
244. Howitz, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191–196 (2003).
245. Borra, M. T., Smith, B. C. & Denu, J. M. Mechanism of Human SIRT1 Activation by Resveratrol *. *J. Biol. Chem.* **280**, 17187–17195 (2005).
246. Jeong, J. *et al.* SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* **39**, 8–13 (2007).
247. Lim, J. W., Kim, H. & Kim, K. H. Expression of Ku70 and Ku80 Mediated by NF- κ B and Cyclooxygenase-2 Is Related to Proliferation of Human Gastric Cancer Cells *. *J. Biol. Chem.* **277**, 46093–46100 (2002).
248. Gonzales, A. M. & Orlando, R. A. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutr. Metab.* **5**, 17 (2008).
249. Zykova, T. A. *et al.* Resveratrol Directly Targets COX-2 to Inhibit Carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* **47**, 797–805 (2008).
250. Xiao, Y. *et al.* Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth. *Oncotarget* **6**, 8046–8061 (2015).
251. Koike, M., Shiomi, T. & Koike, A. Dimerization and Nuclear Localization of Ku Proteins*. *J. Biol. Chem.* **276**, 11167–11173 (2001).

252. Koike, M. Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **43**, 223–236 (2002).
253. Song, J. Y., Lim, J. W., Kim, H., Morio, T. & Kim, K. H. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 36676–36687 (2003).
254. Lim, J. W., Kim, K. H. & Kim, H. NF-kappaB p65 regulates nuclear translocation of Ku70 via degradation of heat shock cognate protein 70 in pancreatic acinar AR42J cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2065–2077 (2008).