



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA METFORMINA Y CURCUMINA
EN LA CITOTOXICIDAD Y EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS VPH⁺**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

JONATHAN GERARDO SANCHEZ PERALTA

CODIRECTORAS

M. EN C. MARGARITA BAHENA ROMAN

DRA. CARLA O. CONTRERAS OCHOA

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2023

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Generalidades de Cáncer Cervicouterino	6
1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH).....	7
1.3 Carcinogénesis	9
2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS	12
2.1 Efecto de la Metformina en cáncer.....	12
2.2 Efecto de la Metformina en la proliferación e inducción de muerte celular en CaCu.....	13
2.3 Efecto de la Curcumina en cáncer	15
2.4 Efecto de la Curcumina en la proliferación y muerte celular en CaCu	16
2.5 Efecto sinérgico de la Metformina y Curcumina en cáncer y CaCu	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1 Cultivo celular.....	21
6.2 Desprendimiento y conteo celular	21
6.3 Ensayo de citotoxicidad	22
6.4 Evaluación de la expresión de genes involucrados en proliferación celular, muerte celular y respuesta inmune	23
6.4.1 Extracción de RNA.....	24
6.4.2 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR.....	25
6.4.3 Análisis de expresión de genes por qPCR.....	25
6.5 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Efecto citotóxico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu.....	28
7.2 Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu	30
7.3 Efecto de la Metformina y Curcumina en la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares.....	34
7.3.1 Proliferación y supervivencia celular.....	34

7.3.2 Muerte celular	36
7.3.3 Transformación celular por VPH	38
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	46
10. PERSPECTIVAS.....	47
11. LITERATURA CITADA.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del genoma viral del VPH.....	9
Figura 2. Infección por el VPH-AR en células de cérvix que conlleva al desarrollo de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, o cáncer invasivo.....	11
Figura 3. Estructura química de la Metformina	12
Figura 4. Estructura química de la Curcumina.....	16
Figura 5. Efecto citotóxico de la Metformina en líneas celulares derivadas de CaCu	29
Figura 6. Efecto citotóxico de la Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu	30
Figura 7. Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células HeLa VPH18 ⁺	32
Figura 8. Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células SiHa VPH16 ⁺	33
Figura 9. Expresión de Ciclina D1 y NFKB1 en células VPH ⁺	36
Figura 10. Expresión de Bcl-2, Bax y LC3B en células VPH ⁺	37
Figura 11. Expresión del oncogén E7 de VPH de alto riesgo	38
Figura 12. Posibles vías implicadas en el efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la reacción por qPCR.....	26
Tabla 2. Resumen de la expresión relativa de genes involucrados en diversos procesos celulares en células VPH ⁺ tratadas con Metformina y Curcumina.	34

ABREVIATURAS

AMPK: Proteína Quinasa Activada por Monofosfato de Adenina

AP-1: Proteína Activadora

CaCu: Cáncer Cervicouterino

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditioneitol

dT: Desoxitimina

dNTPs: Desoxirribonucleotidos trifosfato

HPRT: Hipoxantina-Guanina Fosforribosiltransferasa

LCR: Región Larga de Control

mTOR: Diana de la Rapamicina en mamíferos

PBS: Solución Salina de Fosfatos

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

VPH-AR: Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la neoplasia ginecológica más prevalente a nivel mundial, asociada a la infección con el virus del papiloma humano de alto riesgo. Los tratamientos actuales contra CaCu consisten en la quimioterapia con el fármaco Cisplatino y cirugía; sin embargo, los efectos secundarios y la quimiorresistencia generada por las células tumorales resaltan la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento. En esta investigación evaluamos la Metformina y Curcumina, que son compuestos naturales con potencial antitumoral, debido a que disminuyen la proliferación celular e inducen muerte celular actuando por múltiples vías de señalización. Evaluamos el efecto citotóxico de la Metformina, Curcumina y su combinación en células HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VPH16⁺) usando el reactivo MTS. Para identificar vías celulares responsables del efecto citotóxico inducido por estos compuestos, se evaluó la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares como proliferación y supervivencia (*NFKB* y *Ciclina D1*), muerte celular por apoptosis (*Bax* y *Bcl-2*) y muerte celular por autofagia (*LC3B*) mediante RT-qPCR en tiempo real; así mismo se evaluó la expresión del oncogén viral (*E7*) involucrado en carcinogénesis. Encontramos que la Metformina y la Curcumina provocan un efecto citotóxico dosis dependiente en ambas líneas celulares a las 48 horas de tratamiento; sin embargo, las células SiHa fueron más resistentes a la Metformina, mientras que con Curcumina ambas líneas celulares fueron igualmente susceptibles. De manera importante, demostramos que el tratamiento combinado con ambos compuestos potencia significativamente la citotoxicidad en ambas líneas celulares. Por su parte, los genes evaluados se expresaron de manera diferencial en ambas líneas celulares tratadas con Metformina o Curcumina; sin embargo, destacamos la expresión significativa de *NFKB* y *LC3B* con ambos tratamientos; por lo que efecto citotóxico observado posiblemente se deba a la inhibición del ciclo celular y/o la inducción de muerte celular por autofagia. La expresión del oncogén *E7* únicamente disminuyó con Curcumina, y la combinación de esta y Metformina. La investigación sobre el efecto antitumoral de la Curcumina y Metformina podría conducirlos a ser futuros candidatos coadyuvantes para el tratamiento contra CaCu.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es una de las neoplasias ginecológicas más prevalentes a nivel mundial, el agente causal de esta patología es el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) (Torre *et al.*, 2015; Zur, 2009). A nivel mundial el CaCu ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad en las mujeres, con 604,127 casos, y 341,831 muertes registradas en 2020 (GLOBOCAN, 2020). En México, el CaCu ocupa el segundo lugar después del cáncer de mama con una incidencia de 9,439 casos y 4,335 muertes, además de una alta prevalencia con 6,959 casos registrados en el mismo año, por lo que este cáncer representa un importante problema en Salud Pública (GLOBOCAN, 2020).

La infección con el VPH-AR es una causa necesaria más no suficiente para el desarrollo de CaCu; existen otros factores relacionados como el inicio temprano de relaciones sexuales, múltiples parejas sexuales, uso de anticonceptivos orales por largos periodos, obesidad, inmunosupresión, microbiota cervical, tabaquismo, y además se asocia a otras co-infecciones como VIH (virus de inmunodeficiencia humana) o herpes (Cordero-Martínez y García-Pimentel, 2015).

Existen diferentes tratamientos para el CaCu, los cuales varían de acuerdo al estadio en que se encuentra; en una fase temprana, el método estándar es la intervención quirúrgica seguida de radioterapia para reducir el tamaño y diseminación de la masa tumoral. En estadios avanzados se utiliza la quimioterapia con fármacos antineoplásicos como el Cisplatino, Carboplatino o Fluorouracilo para causar daño al

ADN e inducir apoptosis en las células tumorales; sin embargo, estos tratamientos ocasionan efectos secundarios como inmunosupresión, náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, pérdida de cabello, anemia, cansancio crónico, entre otros (García y Noriega, 2008; Annede *et al.*, 2019).

1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Se han identificado aproximadamente 200 genotipos de VPH, los cuales se han clasificado en VPH de bajo y alto riesgo. Los VPH de bajo riesgo incluyen a los genotipos 6, 11, 42, 43 y 44, mientras que los de alto riesgo son los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59. Los VPH 16 y 18 están relacionados con la mayoría de las neoplasias intraepiteliales cervicales de alto grado (NIC II y III) representando el 60 y 70% de las mismas, por lo que se han considerado principales precursores del CaCu debido a su alta capacidad oncogénica (Wuerthner y Ávila-Wallace, 2016).

Los VPH pertenecen a la familia *Papovaviridae*, son virus pequeños de 55 nm de diámetro y su genoma viral está constituido por ADN de doble cadena sin envoltura que contienen cerca de 8,000 pb y codifica para ocho o nueve marcos de lectura abiertos (ORF) que son transcritos como ARNm policistrónicos. Tienen una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros que están formados por dos proteínas L1 y L2, siendo L1 el elemento estructural primario, y L2 como componente menor del virión ubicada en el centro de los capsómeros pentavalentes del mismo (Modis *et al.*, 2002). El genoma del VPH se divide en tres regiones; la primera es una región

reguladora no codificante denominada región larga de control (LCR) y está encargada de la replicación del ADN controlando la transcripción ORF. La segunda es la región temprana que codifica proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 que participan en la replicación viral y la oncogénesis (Figura 1). La tercera es una región tardía que codifica las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral (Harden y Munger, 2017).

El gen E1 codifica una helicasa de ADN viral dependiente de ATP que se puede unir al origen de replicación (LCR) rico en AT, mientras que las proteínas E2 funcionan en la transcripción viral, la replicación y la partición del genoma. El producto del gen E4 juega un papel funcional en la maduración, ensamblaje y liberación de partículas virales. La E5 es una proteína de membrana hidrofóbica que forma dímeros e interactúa con los receptores de tirosina quinasa, incluyendo los receptores EGF y PDGF (Dimaio y Petti, 2013; Doorbar, 2013). Los oncogenes E6 y E7 en conjunto se encargan de la inmortalización celular regulándose a nivel transcripcional por E2, para conducir la entrada al ciclo celular y favorecer la amplificación del genoma en las capas medias del epitelio e inhibir la inmunidad innata (Doorbar *et al.*, 2016).

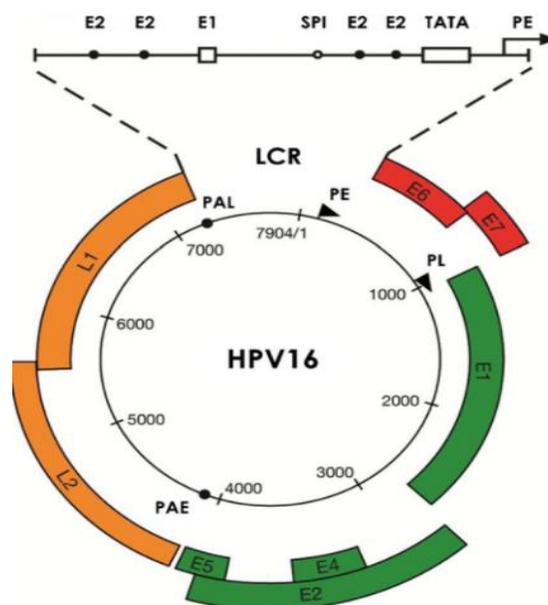


Figura 1. Estructura del genoma viral del VPH (Harden y Munger, 2017).

1.3 Carcinogénesis

Generalmente el desarrollo de CaCu es muy lento, ya que comienza con una infección pre-cancerosa llamada displasia, posteriormente evoluciona a cáncer cuando las células comienzan a proliferar sin control. Histopatológicamente el CaCu se clasifica en carcinomas de tipo epidermoide o de células escamosas que se originan en el epitelio del ectocérvix o adenocarcinomas originados en el epitelio endocervical. La unión escamo-columnar o zona de transformación es un sitio que tiene células troncales y se considera un blanco para la infección por VPH debido a la constante división celular (Sureda-Peña y Martínez-Cárdenas, 2014; Reich *et al.*, 2017). En la actualidad las lesiones o neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) se han clasificado en NIC I, NIC II y NIC III, que van desde una displasia leve a severa, considerándose la NIC II y III de alto grado para el desarrollo del cáncer invasivo (Montero *et al.*, 2018).

El tejido cervical se encuentra protegido por varias capas celulares diferenciadas que no son fácilmente accesibles; sin embargo, cuando se presentan micro heridas o abrasiones leves, la capa más profunda queda expuesta para permitir la entrada del virus. La infección comienza cuando el VPH se introduce en las células epiteliales de la membrana basal, estas expresan proteoglicanos heparán sulfato que funcionan como receptores de unión con la proteína L1 del virus para inducir cambios conformacionales de la cápside viral, de tal manera que el extremo amino L2 quede expuesto para hacerlo susceptible a proteasas como la furina que será necesaria para la infección (Cruz *et al.*, 2015).

Cuando el virus se incorpora en las células basales mediante un proceso de endocitosis, inicia la replicación del ADN viral manteniéndose en forma episomal, es decir, una replicación no productiva en donde el virus utiliza la maquinaria de ADN del huésped para realizar aproximadamente de 50 a 100 copias por célula. Durante la fase S los genomas virales se replican una vez por ciclo y suelen ser persistentes durante varios años en las células epiteliales. Posteriormente conforme los queratinocitos se van diferenciando mientras avanzan a la superficie epitelial en las capas suprabasales del epitelio, el ciclo de replicación de ADN cambia y se amplifica a un mayor número de copias para la síntesis de proteínas de la cápside y provocar el ensamblaje viral (Doorbar *et al.*, 2016). El complejo formado por las proteínas E1 y E2 se unen al origen de la replicación, y al no codificar enzimas de replicación, reclutan ADN polimerasas del huésped para permitir la replicación del genoma viral (McBride, 2013). Las capas basales y parabasales aumentan de tamaño en la zona infectada cuando E6 y E7 potencian la proliferación celular (Figura 2). Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo son las principales responsables de la carcinogénesis al intervenir activamente en el ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad cromosomal al unirse a proteínas supresoras de tumores p53 y pRB (Klingelhutz y Roman, 2012).

Por su parte, la proteína E6 altera el ambiente celular al inactivar al supresor tumoral p53 mediante la ubiquitina ligasa asociada (E6-AP), y lo dirige a la degradación proteosomal. Este proceso bloquea la actividad pro-apoptótica, alterando la transcripción de genes celulares por la interacción con p300/CBP, además de un incremento de la vida celular por la regulación activa de la telomerasa para el mantenimiento de los telómeros. La proteína E7 tiene mayor capacidad transformante

al actuar sobre las proteínas pRB, que al unirse liberan al factor de transcripción E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve una sobreexpresión de Ciclina E para el progreso de la replicación celular en la fase S. También induce la replicación anormal al asociarse a otras proteínas, tales como desacetilasas de histonas, AP1 y los inhibidores de los complejos CDK (Quinasas dependientes de Ciclina) como p21 y p27 (Ghittoni *et al.*, 2015).

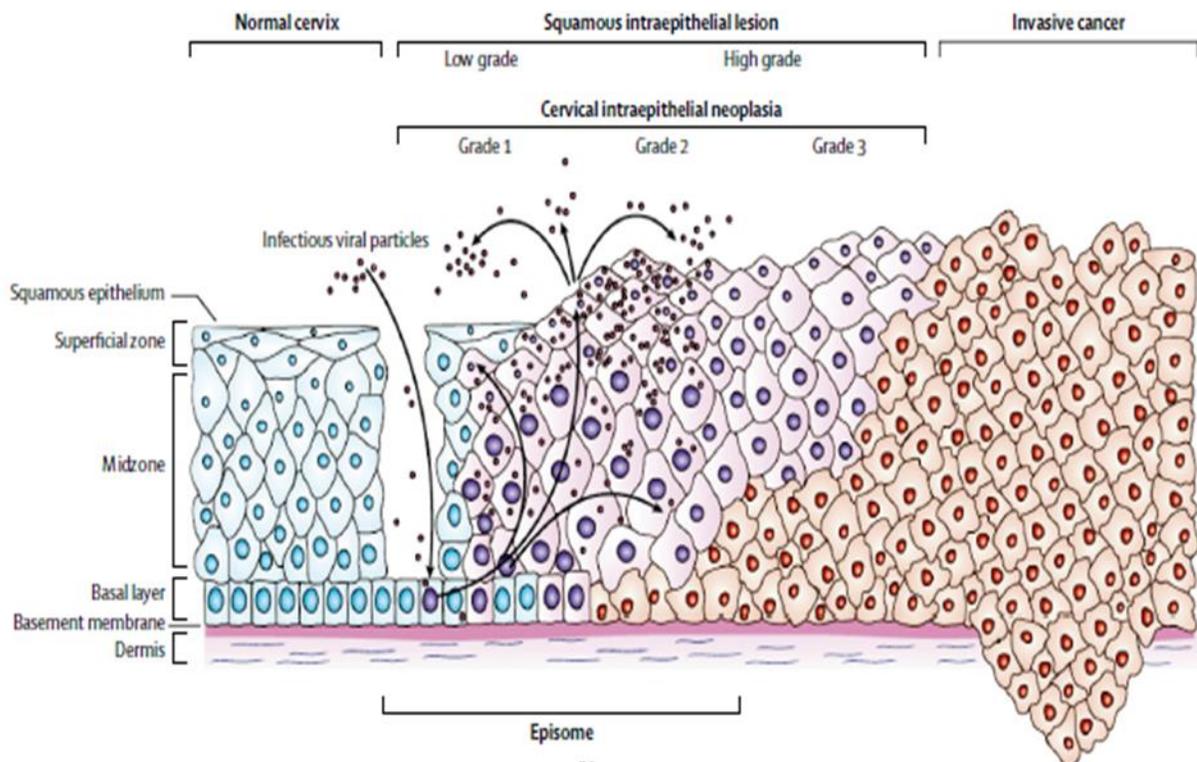


Figura 2. Infección por el VPH-AR en células de cérvix que conlleva al desarrollo de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, o cáncer invasivo (Cohen *et al.*, 2019).

2. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

2.1 Efecto de la Metformina en cáncer

La Metformina (N, N-dimetilbiguanida) es un compuesto sintético formado estructuralmente por dos moléculas de guanidina (Figura 3); originalmente es derivada de la galegina, un producto natural extraído de la planta *Galega officinalis* muy utilizada en la herbolaria por sus propiedades antidiabéticas. Este compuesto se ha utilizado durante muchos años como un agente hipoglucemiante y sensibilizador a la insulina como un tratamiento de primera línea en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, debido a que disminuye la producción de glucosa por el hígado, mediante la inhibición de la gluconeogénesis (Bailey, 2017). Otras de sus propiedades encontradas es la reducción de hígado graso y reducción de complicaciones microvasculares y macrovasculares asociadas con la diabetes mellitus tipo 2, así como la restauración de la función ovárica en el síndrome de ovario poliquístico; además, se ha encontrado que disminuye la incidencia de cáncer en pacientes diabéticos (Viollet *et al.*, 2012; Schulten, 2018).

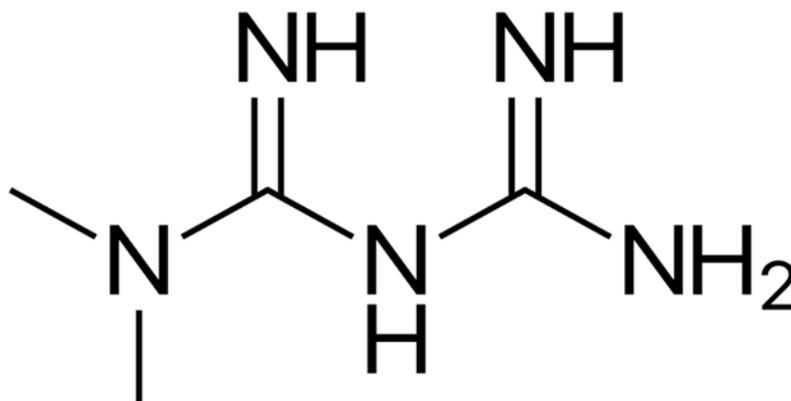


Figura 3. Estructura química de la Metformina.

Diversos estudios han demostrado que la Metformina tiene propiedades antitumorales, ya que inhibe el crecimiento, la supervivencia y la metástasis en células de cáncer de mama, pulmón, esófago, páncreas, hígado, leucemias, entre otros (Ugwueze *et al.*, 2020; Mallik y Chowdhury, 2018). La Metformina actúa sobre diversos blancos celulares, tales como la activación de la vía de señalización AMPK (quinasa activada por monofosfato adenina) mediada por la quinasa hepática B1 (LKB1), favoreciendo la regulación del metabolismo energético, y a su vez, la reducción de la señalización mTOR (diana de rapamicina en mamíferos), y la síntesis de proteínas en las células tumorales (Lei *et al.*, 2017).

En células de cáncer de mama (CaMa) se demostró que la Metformina induce la muerte celular por apoptosis deteniendo a células en la fase G1 del ciclo celular, debido a la modulación en la expresión de ciclinas D1, así como en el aumento de expresión de proteínas Bax y la reducción de proteínas Akt, Bcl-2 y Mdm2 (Al-Zaidan *et al.*, 2017). Además, la Metformina también puede inhibir a las células madre mediante la supresión de la translocación nuclear de NFκB (Factor Nuclear Kappa B) en líneas celulares de cáncer de CaMa, próstata y melanoma (Hirsch *et al.*, 2013). Por su parte, en el carcinoma de células escamosas de esófago la Metformina induce la apoptosis y la autofagia mediante una inactivación de la vía STAT3-Bcl-2 y la supresión de ciclinas D1, CDK4 y CDK6 retrasando el crecimiento celular (Kobayashi *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2014).

2.2 Efecto de la Metformina en la proliferación e inducción de muerte celular en CaCu

La Metformina tiene efecto citotóxico en líneas celulares VPH⁺, en células HeLa (VPH18⁺) disminuye la viabilidad y migración celular de manera dosis dependiente a las 24 h de tratamiento (Hsieh *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Rho *et al.*, 2021; Yudhani *et al.*, 2021). De manera similar, también provoca un efecto citotóxico en células HeLa y CaSki (VPH16⁺) a las 48 h de tratamiento (Chen *et al.*, 2020).

La Metformina potencia la citotoxicidad al combinarse con el inhibidor de la proteasa del VIH Nelfinavir en células HeLa, SiHa y CaSki, disminuyendo la proliferación celular significativamente a las 72 h de tratamiento (Xia *et al.*, 2017). Evidencia reciente demuestra que la Metformina también puede actuar sinérgicamente con el trióxido de arsénico para inhibir la proliferación de células HeLa de una manera dependiente de la concentración y del tiempo (Chen *et al.*, 2021).

En cuanto al mecanismo de acción de la Metformina en células VPH⁺, diversos estudios han reportado que este compuesto modula la expresión de genes y proteínas involucradas en diversos procesos celulares. Por ejemplo, en células HeLa este compuesto suprime de manera dosis dependiente la expresión de la proteína Ciclina D1, involucrada en proliferación celular (Hsieh *et al.*, 2018; Yudhani *et al.*, 2021). Así mismo, en células CaSki, HeLa o C33A la Metformina modula la expresión de las proteínas involucradas en la muerte celular por apoptosis, provocando un incremento en la expresión de Bak y Bax (pro-apoptóticos) y disminución de Bcl-2 (anti-apoptótico) a 24 o 48 h de tratamiento (Chen *et al.*, 2020; Rho *et al.*, 2021). Del mismo modo, en células HeLa la Metformina sola o en combinación con el Trióxido de arsénico indujo la expresión de la proteína LC3 que participa en la muerte celular por autofagia (Chen

et al., 2021). Este incremento en LC3 también se encontró en células HeLa y SiHa tratadas con Metformina y Nelfinavir (Xia *et al.*, 2019).

En relación a la infección con VPH, se encontró que la Metformina disminuye los niveles de expresión de los oncogenes virales *E6* y *E7* a nivel de transcripción y de proteína en células HeLa, SiHa y CaSki (Hoppe-Seyler *et al.*, 2021), indicando que dicha disminución posiblemente se deba a que la Metformina disminuye la actividad de la quinasa PI3K.

2.3 Efecto de la Curcumina en cáncer

La Curcumina es el principal componente polifenólico biológicamente activo aislado de los rizomas de la *Curcuma longa*, una planta perteneciente a la familia *Zingiberaceae* originaria en la India, que es muy utilizada como colorante natural en alimentos, cosméticos y textiles, como repelente de insectos y como agente antimicrobiano (Kotha y Luthria, 2019). En la actualidad se le han encontrado múltiples beneficios terapéuticos, debido a sus actividades fisiológicas y farmacéuticas, como antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador, antidepresivo, anticancerígeno, entre otros. Sin embargo, su eficacia y utilidad se limitan por su baja biodisponibilidad atribuida a la insolubilidad en agua y rápido metabolismo, degradándose fácilmente en ambientes alcalinos (Stohs *et al.*, 2020).

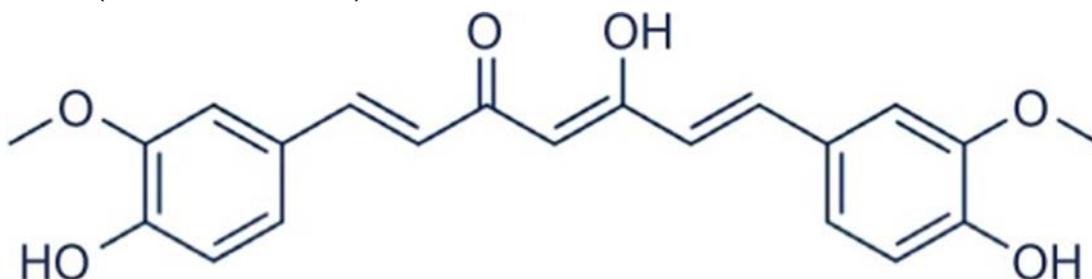


Figura 4. Estructura química de la Curcumina.

Entre los principales mecanismos de acción de la Curcumina en las células está la modulación de múltiples vías de señalización, incluyendo proteínas involucradas en proliferación celular (ciclinas), factores de transcripción como el NF κ B, factores de crecimiento, proteínas quinasas, proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas (Bcl-2, Survivina, Bax, NOXA, PUMA, etc.), enzimas, citocinas inflamatorias y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos mecanismos han demostrado que favorecen la inhibición de la proliferación celular y la inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer mama, gástrico, páncreas, colorrectal, leucemia, entre otros (Liu *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2015; Giordano y Tommonaro, 2019; Termini *et al.*, 2020; Pricci *et al.*, 2020; Mansouri *et al.*, 2020).

2.4 Efecto de la Curcumina en la proliferación y muerte celular en CaCu

En células HeLa, SiHa y CaSki la Curcumina provoca un efecto citotóxico a las 24 h de tratamiento (Patiño-Morales *et al.*, 2019). A su vez, en células HeLa este compuesto causa citotoxicidad la cual aumenta con la dosis y el tiempo de incubación desde 24 a 96 h (Pani *et al.*, 2021; Dhanasekaran *et al.*, 2019).

En relación al mecanismo de acción de la Curcumina en células VPH⁺, un estudio con Curcumina y el antioxidante de la fresa (ácido elágico) en células HeLa reportó que la Curcumina sola no provocó cambios significativos en la expresión de la proteína Bax (pro-apoptótico); sin embargo, cuando se combinó con el ácido elágico aumentó su

expresión (Kumar *et al.*, 2016). En las líneas celulares HeLa y SiHa tratadas con Curcumina durante 24 h la expresión de la proteína Ciclina D1 disminuyó (30% y 16%, respectivamente); por su parte, la expresión de la proteína Bax se incrementó un 65% y 54% en HeLa y SiHa, respectivamente; mientras que la proteína Bcl-2 (anti-apoptótico) disminuyó de manera similar en ambas líneas celulares (Singh y Singh, 2009). Del mismo modo, la Curcumina disminuyó significativamente la expresión de la proteína Ciclina D1 en células HeLa y SiHa expuestas a la hormona estradiol (Singh y Singh, 2011).

Por su parte, en células HeLa, SiHa y CaSki la Curcumina disminuye significativamente la expresión de los oncogenes virales *E6* y *E7* de VPH, tanto a nivel transcripcional como de proteína, a las 24 y 48 h de tratamiento (Maher *et al.*, 2011).

2.5 Efecto sinérgico de la Metformina y Curcumina en cáncer y CaCu

Hasta el momento no existe evidencia científica reportada del efecto de la combinación de Curcumina + Metformina sobre la citotoxicidad y muerte celular en líneas derivadas de CaCu.

Este efecto se ha descrito en otros modelos tumorales como cáncer gástrico y de próstata. En líneas celulares de cáncer gástrico, la combinación de Metformina y Curcumina aumenta significativamente el efecto citotóxico de diversos fármacos quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de esta neoplasia, tales como Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino, Epirubicina, Doxorrubicina, Docetaxel,

Paclitaxel y Metrotexato); además de inhibir la migración celular y la capacidad de invasión de estas células (Zarei *et al.*, 2021).

Por su parte, en una línea celular de cáncer de próstata la Curcumina disminuyó la expresión de los genes *Bcl-2* y *hTERT*, mientras que la Metformina aumentó la expresión de los genes *Bax* y *PUMA*, y disminuyó la expresión de *Bcl-2*, *hTERT*, *mTOR* y *p53*; por lo que la combinación de Metformina y Curcumina potenció la citotoxicidad, la inducción de apoptosis y la expresión de genes (Eslami *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

El CaCu es un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido al aumento gradual de las tasas de incidencia y mortalidad. Actualmente el tratamiento contra este cáncer consiste en cirugía para eliminar la región del cérvix afectada, y quimioterapia con fármacos antineoplásicos como el Cisplatino; no obstante, estos fármacos son altamente tóxicos e inespecíficos y han generado quimiorresistencia; por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos compuestos que tengan un mayor efecto a dosis bajas y sean más específicos contra las células tumorales.

La Metformina y Curcumina son compuestos naturales que han demostrado tener efectos antitumorales al actuar sobre múltiples vías de señalización para inducir citotoxicidad, reducir la proliferación celular e inducir la muerte celular, activando o suprimiendo genes involucrados en estos procesos fisiológicos en diferentes modelos tumorales. Evidencia científica indica que la combinación de ambos compuestos potencia la citotoxicidad y la muerte celular en cáncer el de próstata y gástrico; sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado el efecto sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu; por lo que este estudio pretende evaluar la citotoxicidad y la expresión de genes involucrados en proliferación celular, muerte celular y respuesta inmune inducidos por el tratamiento combinado de ambos compuestas en las líneas celulares HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VHP16⁺), que representan dos de los genotipos de VPH de alto riesgo con mayor prevalencia a nivel mundial. La investigación generada permitirá contemplar en un futuro la posibilidad de emplear estos compuestos en combinación con los tratamientos actuales contra CaCu.

4. HIPÓTESIS

En células VPH⁺ el tratamiento combinado con Metformina y Curcumina potencia el efecto citotóxico, e induce la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares en relación al tratamiento por separado.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células VPH⁺, y determinar si estos compuestos modulan la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células VPH⁺.
2. Analizar la expresión de genes involucrados en proliferación celular, muerte celular y respuesta inmune en células VPH⁺ tratadas con Metformina y Curcumina.
3. Determinar si la Metformina y Curcumina modulan la expresión del oncogén *E7* involucrado en la transformación celular.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de CaCu, HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VPH16⁺), las cuales se cultivaron en frascos de 25 cm² con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B), y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, cambiando el medio de cultivo cada tercer día.

6.2 Desprendimiento y conteo celular

Las líneas celulares empleadas tienen como característica adherirse al plástico del frasco de cultivo, para desprenderlas se utilizó una solución para desprender células (Tripsina 0.1%, EDTA tetrasódico 0.025% y glucosa 0.1%). Para el conteo celular se realizó lo siguiente: se removió el medio de cultivo de los frascos y se lavó con 3 mL de solución salina de fosfatos (PBS), se agregó 1 mL de solución para desprender células y se incubó de 1 a 2 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 2 mL de medio DMEM suplementado para inactivar la tripsina; se centrifugó a 2,500 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, para resuspender el precipitado con 1 mL de medio de cultivo.

Para determinar el número y viabilidad celular se realizó lo siguiente: en un tubo Eppendorf se colocaron 20 µL de la suspensión celular y 20 µL de colorante azul tripano para obtener una dilución 1:2, se tomaron 10 µL de esta suspensión y se colocaron en la cámara de Neubauer contando cuatro cuadrantes en un microscopio

invertido, se determinó el número total de células mediante la siguiente fórmula, la cual nos indica el número de células totales por mL de suspensión:

$$\sum_{i=1}^n \frac{\text{Número de células totales}}{4} \times \text{dilución celular} \times 10,000 \times \text{volumen total de la suspensión celular}$$

6.3 Ensayo de citotoxicidad

Las células HeLa y SiHa se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo con 100 μ L de medio DMEM suplementado y se mantuvieron en cultivo durante 24 h. Posterior a la incubación, las células se trataron bajo el siguiente esquema: 1) Metformina sola a diferentes concentraciones, 2) Curcumina sola a diferentes concentraciones, 3) Metformina + Curcumina a diferentes concentraciones, 4) Control negativo: células sin tratamiento, solo con medio de cultivo, 5) Control positivo de citotoxicidad: se utilizó el fármaco antineoplásico Cisplatino, 6) Control de disolvente: se utilizó el Dimetilsulfóxido que es el disolvente de la Curcumina. Una vez administrados los tratamientos las células se mantuvieron en cultivo durante 48 h a 37°C con 5% de CO₂. Transcurrida la incubación se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo MTS (CellTiter 96® Aqueous MTS reagent powder, Promega), del cual se añadieron 20 μ L por pozo; posteriormente la placa se incubó durante 1 h a 37°C y la viabilidad se determinó mediante absorbancia a una densidad óptica de 490 nm y 690 nm en un espectrofotómetro (BioTek Instruments Inc). Para el análisis de resultados se restó la lectura de fondo dada por el colorante del medio de cultivo (690 nm), a la del MTS en cada muestra (490 nm), y se normalizó el valor de las células control no tratadas como el 100% de viabilidad celular para

ajustar los valores de los diversos tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado para obtener el promedio y desviación estándar. Para la Curcumina y Metformina por separado se determinó la concentración letal media o IC₅₀ (concentración a la que se obtiene el 50% de muerte celular) de manera experimental, empleando una serie de concentraciones ascendentes de dichos compuestos, evaluando el efecto citotóxico con cada una de ellas como se describió arriba; de manera que la concentración más cercana al 50% de viabilidad celular tomando en cuenta la desviación estándar se consideró como la IC₅₀. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja a la que un compuesto reduce la viabilidad celular.

6.4 Evaluación de la expresión de genes involucrados en proliferación celular, muerte celular y respuesta inmune

Las células HeLa y SiHa se sembraron a una densidad de 800,000 células por pozo en placas de 6 pozos con 1.5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado; al día siguiente de la siembra se trataron bajo el siguiente esquema: 1) Metformina sola a la dosis IC₅₀, 2) Curcumina sola a la dosis IC₅₀, 3) Metformina + Curcumina ambas a la dosis IC₅₀, 4) Control negativo: células sin tratamiento, y 5) Control positivo: Cisplatino 30 µM; y se mantuvieron en cultivo durante 48 h. Posteriormente se removió el medio de cultivo de las células, se lavaron con PBS y se desprendieron con 700 µL de solución para desprender células, se colectaron por centrifugación a 2,500 rpm durante

5 minutos para obtener el precipitado celular que se resuspendió en 100 μ L de PBS para mantenerse a una temperatura de -80°C .

6.4.1 Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA total de las células HeLa y SiHa que se trataron con Metformina o Curcumina a partir de las células colectadas, como se describió en el apartado anterior.

Para la extracción se utilizó un kit de extracción de RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante, que se describe a continuación. Para el aislamiento del RNA se agregó 350 μ L de buffer de lisis RLT al precipitado, y para un óptimo lisado, la suspensión celular se homogenizó entre 5 a 10 veces en una jeringa estéril con aguja calibre 0.9 mm, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos. Se agregó 350 μ L de etanol al 70% al lisado, se mezcló y se transfirieron los 700 μ L del homogenizado a la columna All Prep colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos; se decantó el fluido y se agregó 700 μ L de buffer RW1 para lavar el RNA unido a la membrana, y se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm. Se eliminó el fluido y se agregaron 500 μ L de buffer RPE a la columna para lavar la membrana, y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 segundos. Posteriormente se agregaron 500 μ L de buffer RPE y se centrifugó durante 2 minutos a 10,000 rpm para secar la membrana de la columna y asegurar la eliminación total de etanol. Finalmente se colocó la columna RNeasy en un nuevo tubo de 1.5 mL y se añadieron 20 μ L de agua libre de RNAsas directamente a la membrana

de la columna, se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 rpm para obtener el RNA total. Para determinar la concentración de RNA, se cuantificaron las muestras a 260 nm en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop). La pureza de la muestra se obtuvo con la relación de absorbancia 260/280 nm, que debe ser de 1.8 a 2.0 para muestras de óptima calidad.

6.4.2 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR

El RNA total aislado de las células se utilizó para sintetizar el cDNA (DNA complementario), la síntesis se realizó a partir de 1 µg de RNA total, 1 µL de oligo dT (desoxitimina 0.5 mg/µL), 8 U/µL de inhibidor de RNAsas y agua libre de DNAsas/RNAsas. Las muestras se incubaron a 65°C por 10 minutos para eliminar las estructuras secundarias del RNA y así permitir el alineamiento del oligo dT. Posteriormente se agregaron 4 µL de buffer 5X, 4 µL de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato 2.5 mM), 2 µL de DTT (ditiotreitól 0.1 mM), 0.2 µL de inhibidor de RNAsas (40 U/µL) y 0.5 µL de transcriptasa reversa (100 U/µL). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h, seguida de una incubación de 10 minutos a 70°C para inactivar a la enzima transcriptasa reversa.

6.4.3 Análisis de expresión de genes por qPCR

Mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se midió la expresión de genes involucrados en proliferación y supervivencia celular (*Ciclina D1* y *NFKB*), apoptosis (*Bcl-2* y *Bax*), autofagia (*LC3B*), el oncogen viral *E7* y el gen constitutivo de expresión

(*HPRT1*, Tabla 1). La reacción se realizó utilizando 1 μ L de la dilución de cDNA (200 ng/ μ L), 1 μ L de los oligonucleótidos respectivos para cada gen (0.5 ng/ μ L), 5 μ L de SYBER Green (1X) y 3 μ L de agua grado biología molecular. Previamente se montaron las condiciones de amplificación para cada uno de los genes evaluados.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la reacción por qPCR.

Genes	Oligonucleótidos	Producto pares bases (pb)
<i>NFKB1</i>	Forward: 5'-GTGGTGCCTCACTGCTAACT-3' Reverse: 5'-GGATGCACTTCAGCTTCTGT-3'	160
<i>Ciclina D1</i>	Forward: 5' TCTCCAAAATGCCAGAGGCG 3' Reverse: 5' AGGAAGTTGTTGGGGCTCCT 3'	136
<i>Bcl-2</i>	Forward: 5' ATCGCCCTGTGGATGACTGAG 3' Reverse: 5' CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG 3'	115
<i>Bax</i>	Forward: 5' GGACGAACTGGACAGTAACATGG 3' Reverse: 5' GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC 3'	149
<i>LC3B</i>	Forward: 5' AAGCAGCTTCCTGTTCTGGAT 3' Reverse: 5' GATTGGTGTGGAGACGCTGA 3'	158
<i>E7</i>	Forward: 5' GGGAATTCTTACTGCTGGGATGCACACCA 3' Reverse: 5' GGGGGATCCATGCATGGACCTAAGGCAACA 3'	84

Se realizó un ensayo de disociación o curva melt para determinar la especificidad de los productos de amplificación. La eficiencia de amplificación por PCR de cada gen se calculó mediante el método de curva estándar $E=10^{(-1/\text{slope})}-1$. El nivel de expresión de RNAm para los genes evaluados se calculó mediante cuantificación relativa con el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\text{Ct}}$), representándose como unidades relativas de expresión de cada gen en relación al gen endógeno *HPRT* y grupo de comparación. La reacción de qPCR se realizó en el equipo de PCR-Tiempo Real ViiA7 (Applied

Biosystems). Se realizaron dos experimentos independientes con cada una de las líneas celulares.

6.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney en el programa estadístico Minitab Statistical Software. Las diferencias entre el control y los tratamientos con una $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto citotóxico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu

Se probaron diferentes concentraciones de Metformina (20 a 100 mM) y Curcumina (50 a 300 μ M) para evaluar la actividad citotóxica de ambos compuestos. Las células HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VPH16⁺) se incubaron durante 24 y 48 h con Metformina y Curcumina; sin embargo, a las 24 h no se observó un efecto significativo sobre la viabilidad en las células tratadas con Metformina (datos no mostrados); mientras que a las 48 h si se observó un efecto citotóxico con ambos compuestos, por lo que los siguientes ensayos se realizaron a las 48 h.

Encontramos que la Metformina induce un efecto citotóxico dosis dependiente en ambas líneas celulares; sin embargo, las células SiHa fueron más resistentes al tratamiento con Metformina (Figura 5). La dosis IC₅₀ en las células SiHa fue de 80 mM mientras que en las HeLa fue de 50 mM; dado que ambas líneas celulares provienen del cérvix, la diferencia de dicho efecto por parte de la Metformina podría deberse al genotipo de VPH (16 y 18, respectivamente) y a la carga viral.

Por su parte, el fármaco antineoplásico Cisplatino se utilizó como control positivo de inducción de citotoxicidad, este se usa como primera línea de tratamiento contra el CaCu; y se encontró que las células HeLa son ligeramente más resistentes al Cisplatino que las células SiHa a la misma concentración (30 μ M, Figura 5).

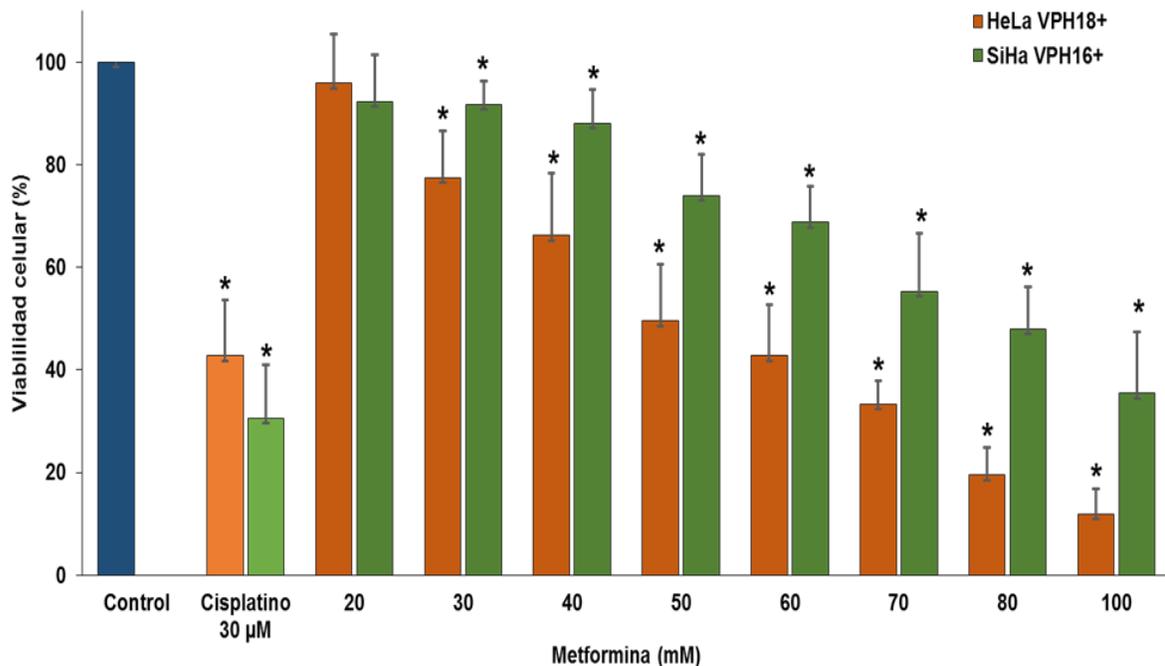


Figura 5. Efecto citotóxico de la Metformina en líneas celulares derivadas de CaCu. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de Metformina por 48 h. Se utilizaron células sin tratamiento como control y células tratadas con Cisplatino como control positivo de citotoxicidad. Se midió la viabilidad celular utilizando el reactivo MTS. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes por duplicado \pm DE. El asterisco indica la significancia estadística con un valor $p \leq 0.05$.

Por su parte, en los ensayos con Curcumina debido a que esta es insoluble en agua, se diluyó en Dimetilsulfóxido (DMSO), y se encontró que éste compuesto por sí solo no indujo citotoxicidad; mientras que la Curcumina provocó un efecto citotóxico dosis dependiente en las células HeLa y SiHa, con un valor IC_{50} de 150 μ M en ambas líneas celulares (Figura 6).

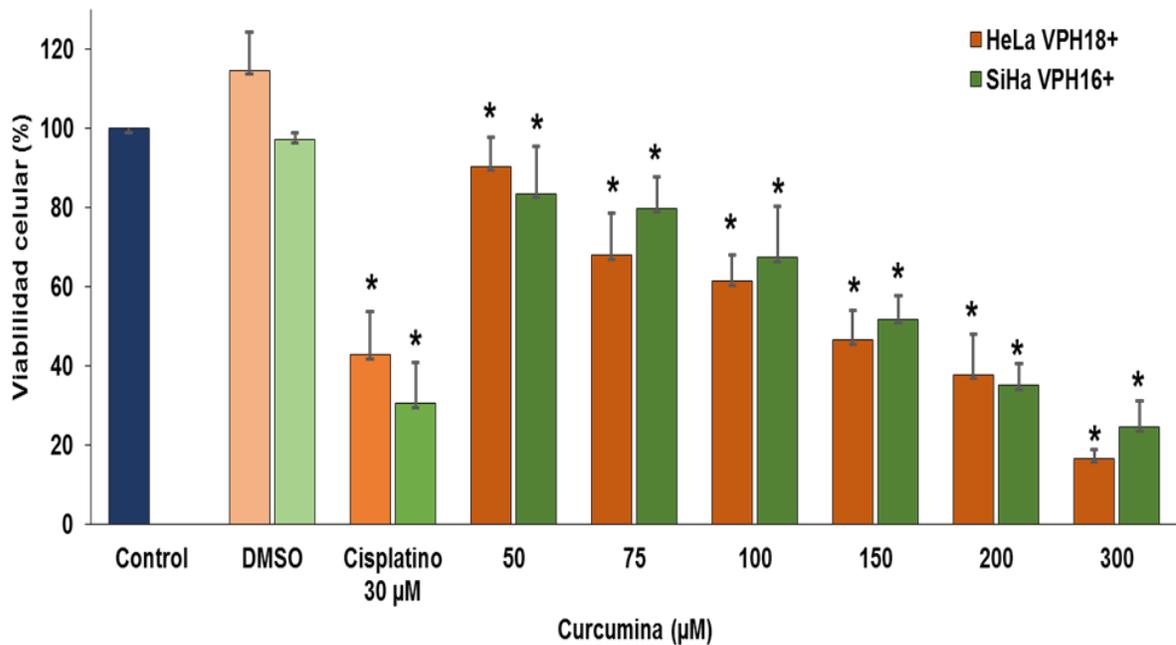


Figura 6. Efecto citotóxico de la Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu. Las células se trataron con diferentes concentraciones de Curcumina por 48 h. Los controles fueron: células sin tratamiento (control); Cisplatino como inductor de citotoxicidad y el DMSO (Dimetilsulfóxido) como disolvente de la Curcumina. Se midió la viabilidad celular utilizando el reactivo MTS. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes por duplicado \pm DE. El asterisco indica la significancia estadística con un valor $p \leq 0.05$.

7.2 Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu

Con base en los resultados obtenidos con las dosis individuales, se seleccionaron diferentes concentraciones de Metformina y Curcumina para evaluar el efecto en combinación. En las células HeLa, las dosis de Metformina seleccionadas fueron 40,

50, 60 y 80 mM, y en las células SiHa 40, 60 y 80 mM; mientras que la Curcumina se evaluó a 50, 75 y 150 μ M en ambas líneas celulares.

En las células HeLa la combinación de Metformina + Curcumina tuvo un efecto citotóxico mayor en comparación al tratamiento por separado, observándose un efecto sinérgico en todas las concentraciones evaluadas ($p \leq 0.05$, Figura 7). Con la dosis más baja de Curcumina (50 μ M) se observó que el efecto citotóxico sinérgico aumenta a medida que incrementa la concentración de Metformina de 40 a 80 mM; por ejemplo, la combinación Curcumina 50 μ M + Metformina 40 mM, tuvo un efecto citotóxico de 57%, mientras que la Curcumina sola a esta concentración indujo un 10% de citotoxicidad y la Metformina sola un 34% (Figura 7). Un efecto similar se observó con la dosis intermedia de Curcumina (75 μ M), la citotoxicidad aumentó a medida que aumenta la concentración de Metformina; por ejemplo, con la combinación Curcumina 75 μ M + Metformina 50 mM (que corresponde a su IC_{50}) la citotoxicidad fue de 52%; mientras que la dosis individual de Curcumina y Metformina fue de 32% y 51%, respectivamente. Finalmente, a la dosis más alta de Curcumina (150 μ M, que corresponde a su IC_{50}) la citotoxicidad no se potenció al incrementar las dosis de Metformina; es decir, con la combinación Curcumina 150 μ M + Metformina 50 mM la citotoxicidad fue del 82%, similar a las otras dosis de Metformina (Figura 7).

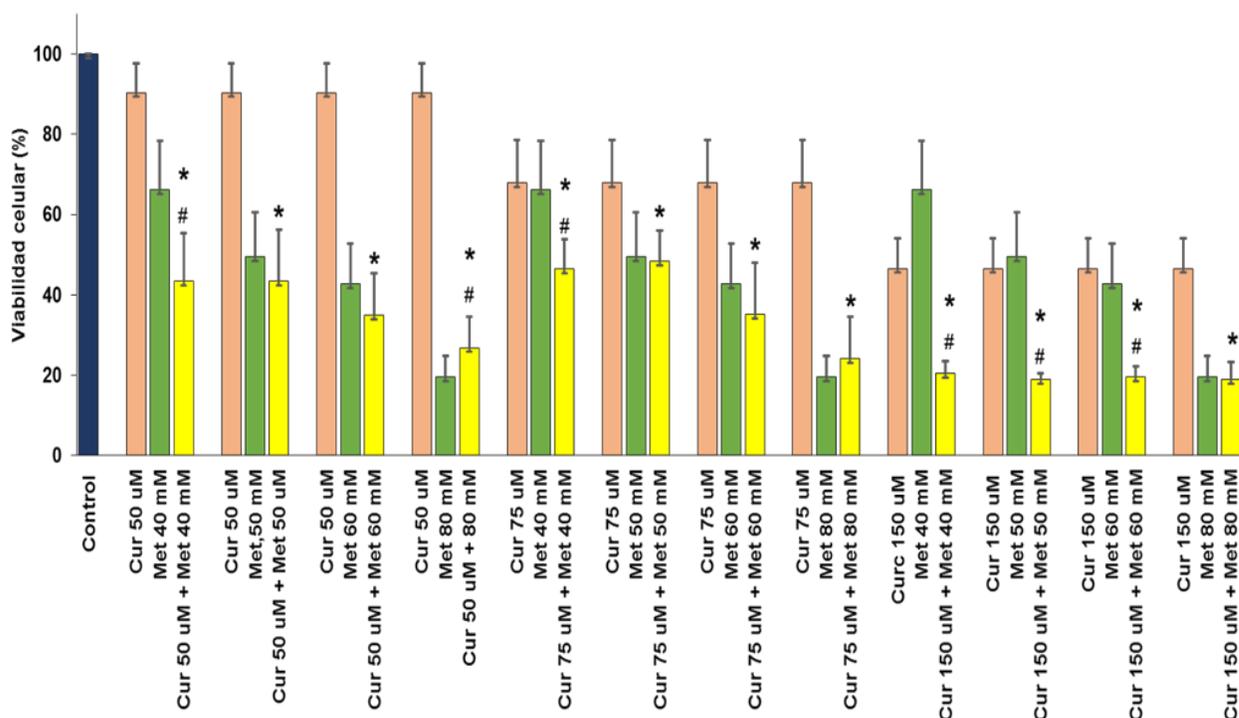


Figura 7. Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células HeLa VPH18⁺. Las células se trataron con diferentes concentraciones de Curcumina (Cur) y Metformina (Met) en combinación durante 48 h. La viabilidad celular se midió con el reactivo MTS. Con fines de comparación se muestra el efecto citotóxico inducido por estos compuestos de manera individual obtenido de los experimentos previos. La gráfica indica el promedio de 3 experimentos independientes por duplicado \pm DE. Se tomó un valor $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo indicado con * para Cur y # para Met, en comparación con las dosis individuales respectivas.

Por su parte en células SiHa, al igual que en HeLa, el efecto citotóxico se potencia significativamente cuando se combina la Metformina y Curcumina para todas las concentraciones evaluadas ($p \leq 0.05$; Figura 8). Sin embargo, el efecto citotóxico de la Curcumina a dosis baja, media y alta, parecería no aumentar significativamente a medida que aumenta la concentración de Metformina. De este modo, con la dosis baja

de Curcumina 50 μM + Metformina 40 mM, la citotoxicidad fue de 53%, mientras que con el tratamiento individual de Curcumina o Metformina fue de 17% y 12%, respectivamente (Figura 8). Con la dosis intermedia de Curcumina 75 μM en combinación con Metformina 60 mM, la citotoxicidad fue de 62%, siendo de 21% y 32% para el tratamiento por separado con Curcumina o Metformina, respectivamente. Por su parte, a la dosis alta de Curcumina 150 μM (que corresponde a su IC_{50}) se obtuvo el mismo efecto citotóxico del 78%, independientemente de la dosis de Metformina.

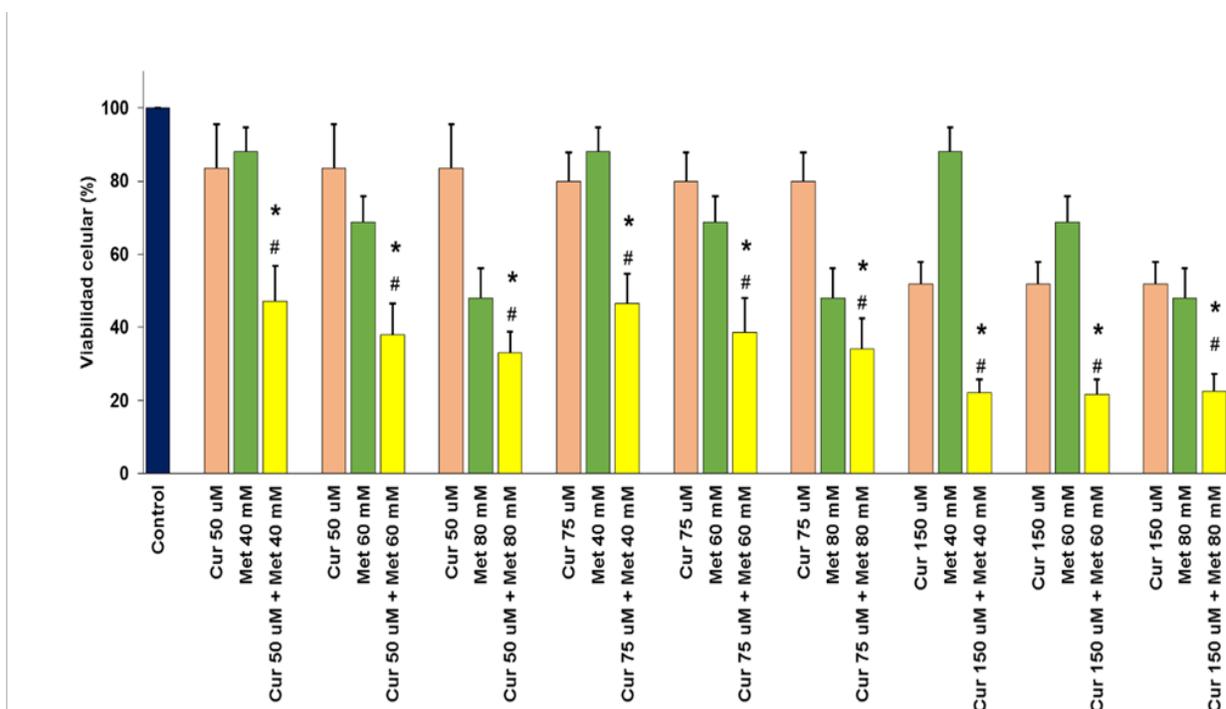


Figura 8. Efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en células SiHa VPH16⁺. Las células se trataron con diferentes concentraciones de Curcumina (Cur) y Metformina (Met) en combinación durante 48 h. La viabilidad celular se midió con el reactivo MTS. Con fines de comparación se muestra el efecto citotóxico inducido por estos compuestos de manera individual obtenido de los experimentos previos. La gráfica indica el promedio de 3 experimentos independientes por duplicado \pm DE. Se tomó un valor $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo indicado con * para Cur y # para Met, en comparación con las dosis individuales respectivas.

7.3 Efecto de la Metformina y Curcumina en la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares

7.3.1 Proliferación y supervivencia celular

Las células HeLa y SiHa se trataron con Metformina, Curcumina y la combinación de ambas, y se encontró una expresión diferencial de los genes *Ciclina D1* y *NFKB1* que participan en ciclo celular y supervivencia, respectivamente. *Ciclina D1* aumentó casi al doble con el tratamiento combinado en HeLa; y en SiHa la Curcumina redujo significativamente su expresión, mientras que con Metformina aumentó al doble (Figura 9, Tabla 2), esto posiblemente indicaría que la Curcumina podría estar interrumpiendo puntos de control en el ciclo celular para inhibir la proliferación celular en células SiHa, en comparación con las HeLa en donde la *Ciclina D1* aumenta su expresión debido a la alta capacidad proliferativa de las células. Por su parte, en HeLa el *NFKB* se sobre expresó de manera significativa con los tres tratamientos, siendo la Metformina el mayor inductor (9 veces, Tabla 2); en SiHa solamente la Metformina provocó la sobre expresión de este gen al doble, pero no fue estadísticamente significativo (Figura 9, Tabla 2). Debido a que la Curcumina y Metformina producen especies reactivas de oxígeno en la célula como parte de su mecanismo de acción, este mecanismo podría ser el responsable de la sobreexpresión de *NFKB1*.

Tabla 2. Resumen de la expresión relativa de genes involucrados en diversos procesos celulares en células VPH⁺ tratadas con Metformina y Curcumina.

Línea celular	Tratamiento					
	Curcumina 150 μ M		Metformina 50 mM		Cur 75 μ M + Met 40 mM	
	HeLa	SiHa	HeLa	SiHa	HeLa	SiHa
Ciclina D1 proliferación	0.32	-0.84 *	0.1	1.1 *	0.94 *	-0.22
NFKB1 supervivencia	1.7 *	-0.27	9.0 *	1.0	7.4 *	0.32
Bcl-2 pro-apoptótico	-0.1	1.54	1.63	0.55	-0.59 *	-0.67 *
Bax anti-apoptótico	-0.24	-0.66	0.59	0.91	0.29	-0.06
LC3B autofagia	8.8*	1.0	2.44	6.7 *	43.4 *	0.89
E7 oncogén del VPH	-0.15	-0.9 *	1.7 *	0.72	-0.05	-0.82 *

Nota: Se indica el cambio en la expresión de los genes evaluados en relación al control sin tratamiento. En negritas se indica el valor de la sobre expresión; el símbolo negativo indica la inhibición en la expresión del gen. Las diferencias estadísticamente significativas con una $p \leq 0.05$ se indican con un asterisco.

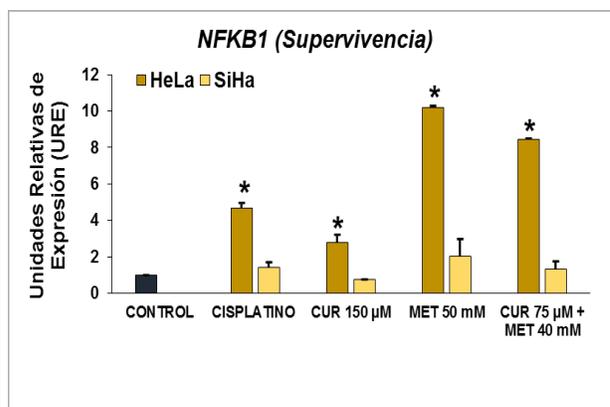
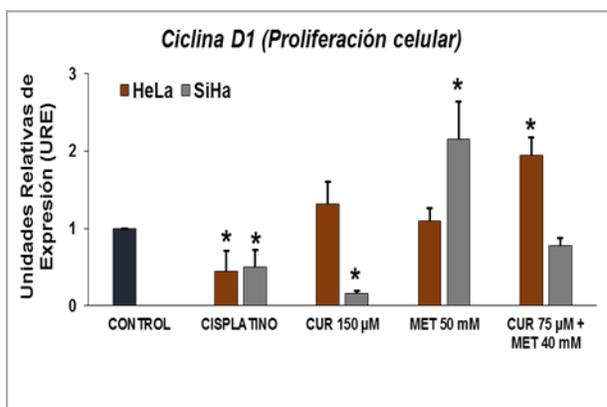


Figura 9. Expresión de *Ciclina D1* y *NFKB1* en células VPH⁺. Las células HeLa y SiHa se incubaron con Metformina (MET), Curcumina (CUR) y la combinación Metformina + Curcumina (MET+CUR) a las dosis indicadas durante 48 h. Se incluyó el Cisplatino como control positivo. Se indica la expresión de los genes *Ciclina D1* y *NFKB1* involucrados en proliferación y supervivencia celular, respectivamente. La expresión génica se normalizó con el gen constitutivo *HPRT1*. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes \pm Desviación estándar. El asterisco indica la significancia estadística con un valor de $p \leq 0.05$.

7.3.2 Muerte celular

Para determinar si el efecto citotóxico de Metformina y Curcumina se debía a la inducción de algún tipo de muerte celular, se evaluó la expresión de genes involucrados en apoptosis *Bcl-2* anti-apoptótico y *Bax* pro-apoptótico, así como la expresión de *LC3B* involucrado en autofagia.

En ambas líneas celulares el tratamiento combinado disminuyó de manera significativa la expresión de *Bcl-2*; la Metformina indujo su sobre expresión sobre todo en HeLa, y la Curcumina también provocó su aumento en SiHa. Por su parte, la Curcumina inhibió la expresión de *Bax* en ambas líneas celulares, y de manera opuesta, la Metformina provocó su aumento (Figura 10, Tabla 2).

En las células HeLa el gen *LC3B* involucrado en autofagia, se sobre expresó significativamente con los tres tratamientos, sobre todo con Curcumina (9 veces), y de manera notable con la combinación de ambos (hasta 43 veces, Tabla 2, Figura 10). De manera opuesta, en SiHa, solamente la Metformina provocó un incremento en la expresión de este gen (7 veces). Estos resultados podrían indicar que el principal

mecanismo de acción de estos compuestos es la inducción de autofagia, ya que inhiben principalmente la vía mTOR y la síntesis de proteínas, desencadenando este tipo de muerte.

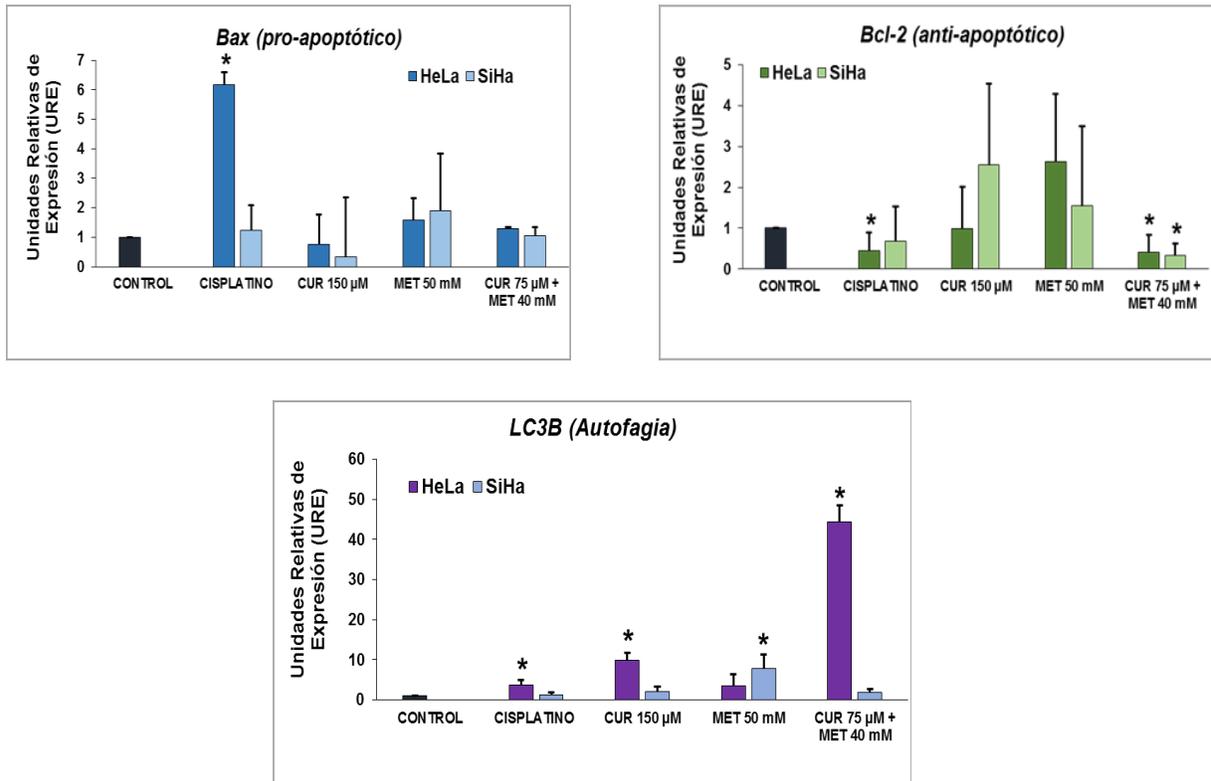


Figura 10. Expresión de *Bcl-2*, *Bax* y *LC3B* en células *VPH*⁺. Las células HeLa y SiHa se trataron con Metformina (MET), Curcumina (CUR) y la combinación Metformina + Curcumina (MET+CUR) a las dosis indicadas durante 48 h. Se incluyó el Cisplatino como control positivo. Se indica la expresión de los genes *Bcl-2* y *Bax* involucrados en apoptosis, y *LC3B* involucrado en autofagia. La expresión génica se normalizó con el gen constitutivo *HPRT1*. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes \pm Desviación estándar. El asterisco indica la significancia estadística con un valor de $p \leq 0.05$.

7.3.3 Transformación celular por VPH

La expresión del oncogén *E7* del VPH es importante para la inducción y el mantenimiento de la transformación maligna en las células de cérvix infectadas, lo que conlleva al desarrollo de CaCu; por tanto, se analizaron los niveles de expresión de *E7* en las células tratadas con Curcumina, Metformina y la combinación de ambas.

La Metformina provocó la sobre expresión del oncogén *E7* en ambas líneas celulares; sin embargo, solo fue significativa en HeLa. Por su parte, la Curcumina sola y en combinación inhibió su expresión significativamente solo en las células SiHa (Figura 11, Tabla 2). Estos resultados sugieren que la Curcumina podría interferir con el proceso de carcinogénesis.

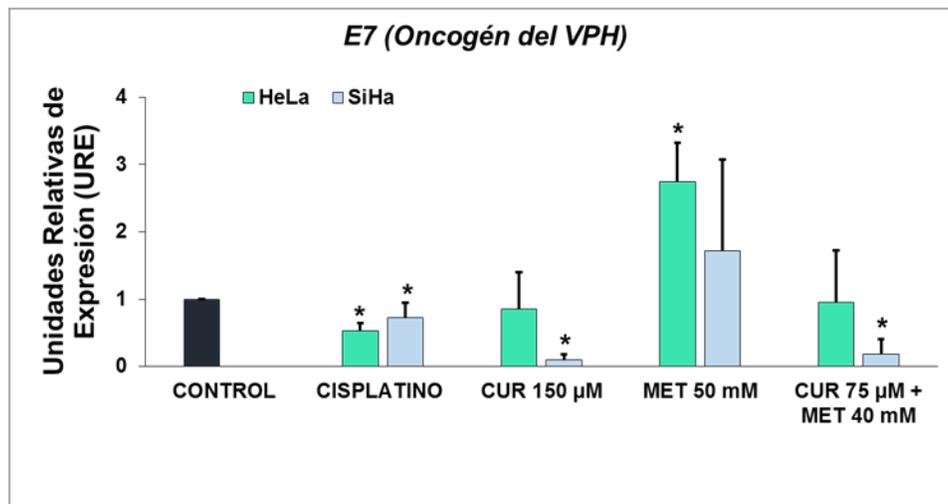


Figura 11. Expresión del oncogén *E7* de VPH de alto riesgo. Las células HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VPH16⁺) se incubaron durante 48 h con Metformina (MET), Curcumina (CUR) y la combinación Metformina + Curcumina (MET+CUR) a las dosis indicadas. Se incluyó el Cisplatino como control positivo. La expresión génica se normalizó con el gen constitutivo *HPRT1*. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes \pm Desviación estándar. El asterisco indica la significancia estadística con un valor de $p \leq 0.05$.

8. DISCUSIÓN

El cáncer cervicouterino es un importante problema de salud pública a nivel mundial, representando la cuarta causa de muerte en las mujeres, y también repercute en la población femenina en México. Los altos índices de mortalidad se deben a la detección tardía de esta neoplasia, a la falta de acceso a la cirugía, a la inespecificidad de la quimioterapia, aunado a la quimiorresistencia generada en las células tumorales a los fármacos antineoplásicos. Es por ello que se buscan nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo la búsqueda de nuevos compuestos con potencial antitumoral.

Para este estudio, se utilizaron los compuestos naturales Metformina y Curcumina, la Metformina es un fármaco utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, y la Curcumina es el componente activo de la Cúrcuma que, de acuerdo a la evidencia científica, activan genes, factores de transcripción y vías de señalización que provocan citotoxicidad en diferentes modelos tumorales. Evaluamos la citotoxicidad inducida por ambos compuestos en dos líneas celulares derivadas de CaCu, HeLa VHP18⁺ y SiHa VPH16⁺, ambas son células de cérvix transformadas por el virus VPH, y representan los dos principales genotipos virales responsables del 80% de las neoplasias cervicales en el mundo (Wuerthner y Ávila-Wallace, 2016).

Nuestros resultados indican que la Metformina y la Curcumina provocan un efecto citotóxico dosis dependiente de manera individual y sinérgica en ambas líneas celulares. En cuanto a Metformina, la dosis IC₅₀ en células HeLa fue de 50 mM a 48 horas de tratamiento, que es una dosis mayor a la reportada por otros autores como Rho *et al* (2021) con 20 mM a 24 horas; mientras que Chen *et al* (2020) a esta misma concentración obtuvieron hasta un 85% de citotoxicidad a las 48 horas, un porcentaje

mayor al que encontramos a ese mismo periodo de incubación. Sin embargo; otros autores reportan una dosis similar a la que nosotros encontramos, pero a 24 horas de tratamiento (40 y 60 mM, Kim *et al.*, 2019; Yudhani *et al.*, 2019).

Existen pocos estudios sobre la citotoxicidad de la Metformina en células SiHa. Nuestros resultados indican que estas células son más resistentes que las HeLa, ya que se requirió una mayor dosis de este compuesto para alcanzar la IC₅₀, siendo de 80 mM a las 48 horas; comparativamente, se ha reportado una IC₅₀ menor (68.4 mM) pero a 72 horas de incubación (Xia *et al.*, 2017).

En lo que respecta a la Curcumina, encontramos que también induce un efecto citotóxico dosis dependiente, con una dosis IC₅₀ de 150 µM a 48 horas de tratamiento en ambas líneas celulares. En comparación con otros estudios en células HeLa a 24 horas de seguimiento, la dosis que encontramos es diez veces mayor a la reportada por Kumar *et al* (2016), que observaron un 60% de citotoxicidad con 16.52 µM; mientras que Patiño-Morales *et al* (2020) con 20 µM obtuvieron el mismo efecto citotóxico en células HeLa, SiHa y CaSki. A su vez, la Curcumina (23.86 µM) disminuyó la viabilidad celular un 60% a las 96 horas (Pani *et al.*, 2021). De manera similar a las condiciones experimentales empleadas en nuestro estudio, se reportó una IC₅₀ de 100 µM, con 47% de citotoxicidad a las 24 horas, aumentando a 65% a las 48 horas de tratamiento (Dhanasekaran *et al.*, 2019).

Derivado de lo anterior, concluimos que las diferencias entre las dosis IC₅₀ de Metformina y Curcumina encontradas en nuestro trabajo y los otros autores podrían deberse a la formulación de los compuestos, a las concentraciones utilizadas, tiempos

de incubación, solubilidad de la Curcumina, y a las estrategias metodológicas empleadas para medir la viabilidad celular.

En el presente estudio demostramos que la combinación de Metformina y Curcumina tiene un importante efecto sinérgico en ambas líneas celulares, debido a que aumenta la citotoxicidad celular en comparación con los tratamientos por separado; la dosis en donde obtuvimos mayor efecto citotóxico fue con Curcumina 75 μ M + Metformina 40 mM, con un aumento entre 2 y 5 veces en la citotoxicidad en células HeLa y SiHa.

Hasta el momento no existe evidencia científica reportada del efecto sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu; este efecto se ha descrito solamente en células de cáncer gástrico y de próstata; donde utilizaron la Metformina + Curcumina a una dosis de 2.93 mM + 4.7 μ M, respectivamente, a 48 horas de tratamiento, obteniendo un porcentaje de citotoxicidad del 60% en cáncer gástrico (Zarei *et al.*, 2021). De igual modo 6 mM de Metformina + 15 μ M de Curcumina, provocó un 70% de citotoxicidad a las 48 horas en un modelo de cáncer de próstata (Eslami *et al.*, 2021). Estas dosis son menores en comparación a las que nosotros empleamos (Metformina 40 mM + Curcumina 75 μ M); estas diferencias podrían deberse al tipo de línea celular, o bien a que las células derivadas de CaCu son más resistentes a estos compuestos en relación a los otros dos modelos mencionados. La información generada con este estudio es relevante, ya que la combinación de Metformina y Curcumina como coadyuvantes a los fármacos antineoplásicos convencionales, podría aumentar la citotoxicidad de las células tumorales, o bien contribuir a disminuir la resistencia a quimioterapéuticos, y sobre todo, disminuir los efectos adversos en células normales.

Una vez demostrado el efecto citotóxico y sinérgico de la Metformina y Curcumina en las células VPH⁺, se procedió a identificar posibles blancos celulares y vías de señalización activadas por ambos compuestos, para lo cual se evaluaron genes involucrados en diversos procesos fisiológicos como proliferación, supervivencia celular y muerte celular por apoptosis y autofagia, encontrándose una expresión diferencial de estos genes. Comparando la expresión por tratamiento, el *NFKB* y el *LC3B* aumentaron significativamente con Curcumina, Metformina y con la combinación de ambos; *Ciclina D1* aumentó solamente con la combinación de los dos compuestos; por su parte, *Bcl-2* aumentó con los tratamientos por separado, y de manera opuesta, la combinación lo inhibe; mientras que *Bax* no tuvo cambios importantes.

Por su parte, comparando la expresión de genes por línea celular, se encontró que *Ciclina D1*, *NFKB* y *LC3B* se expresaron de manera diferencial entre HeLa y SiHa, mientras que en una línea disminuyen en la otra aumentan; estas diferencias podrían deberse al genotipo viral, y/o a que ambas líneas derivan de diferentes tejidos como el endocérvix (HeLa) y ectocérvix (SiHa), por lo que originan tumores diferentes, Adenocarcinomas y Carcinomas de células escamosas, respectivamente (Vandermark *et al.*, 2012).

Tomando en consideración los resultados de citotoxicidad y expresión de genes, la citotoxicidad inducida por la Curcumina y Metformina podría estar asociada a la inhibición del ciclo celular y/o a la inducción de muerte celular por autofagia principalmente. La expresión significativa de *LC3B* podría indicarnos su posible reclutamiento para la formación de autofagosomas durante la autofagia (Lv y Guo, 2020). Por su parte, el *NFKB* además de estar involucrado en la supervivencia celular,

también participa en la activación de la respuesta inmune, y su expresión significativa podría indicar su participación como supresor tumoral y/o activador de vías de reconocimiento y eliminación del virus (Vandermark *et al.*, 2012). Por otro lado, aunque no hubo cambios significativos en la expresión de los genes *Bcl-2* y *Bax* involucrados en apoptosis, no se descarta que pudieran estar involucrados otros genes como *Noxa*, *Puma*, *Bcl-xL*, entre otros, que no fueron considerados para este estudio.

Hasta donde sabemos, en líneas celulares VPH⁺ no hay evidencia reportada en la literatura del análisis de expresión de los genes considerados en este trabajo. Solamente se ha evaluado la expresión de las proteínas Ciclina D1, Bcl-2, Bax y LC3B mediante Western Blot en células HeLa, SiHa y CaSki, encontrando que la Metformina y Curcumina podrían modular la proliferación y muerte celular al aumentar o disminuir a las proteínas mencionadas (Kumar *et al.*, 2016; Xia *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Rho *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021).

En el presente estudio también se evaluó el papel de la Curcumina y Metformina en la modulación del oncogén *E7*, que junto con *E6*, y las proteínas codificadas por estos, son responsables de la transformación celular y desarrollo de la neoplasia en el cérvix. Nosotros encontramos que la Curcumina sola y en combinación con Metformina inhibe significativamente la expresión de *E7* solamente en células SiHa; de manera opuesta la Metformina incrementa su expresión en HeLa; esta diferencia posiblemente se deba al genotipo viral (VPH16⁺ o VPH18⁺, respectivamente), o bien que la Curcumina está inhibiendo a AP-1 (Proteína activadora 1) para impedir su unión al LCR (Región Larga de Control) evitando la transcripción de *E7*. De manera similar y contraria a nuestros resultados, se ha reportado que la Metformina y Curcumina de manera individual

inhiben la expresión del oncogén *E7* en ambas líneas celulares, bajo las condiciones de hipoxia celular se podrían inhibir vías de interacción con *E7* como el AKT, la vía PI3K o mTOR (Maher *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2015; Hoppe-Seyler *et al.*, 2021).

En la Figura 12 se indican los principales mecanismos de acción descritos para la Metformina y Curcumina, los cuales inhiben o activan múltiples vías de señalización como el AMPK, ROS, AKT y PI3K, incluyendo factores de transcripción como el NFkB, mTOR, p53 y AP-1 que se encargan de controlar varias funciones celulares como la proliferación, supervivencia y respuesta inmune. Además, estos compuestos disminuyen la producción de ATP e inhiben complejos mitocondriales y factores de crecimiento desencadenando la muerte celular por apoptosis y autofagia; por lo que estas vías podrían ser las responsables del efecto citotóxico encontrado en las células HeLa y SiHa. Aunado a esto, la Curcumina también podría inhibir el proceso de transformación celular actuando sobre los oncogenes virales *E6* y *E7* a través del factor de transcripción AP-1.

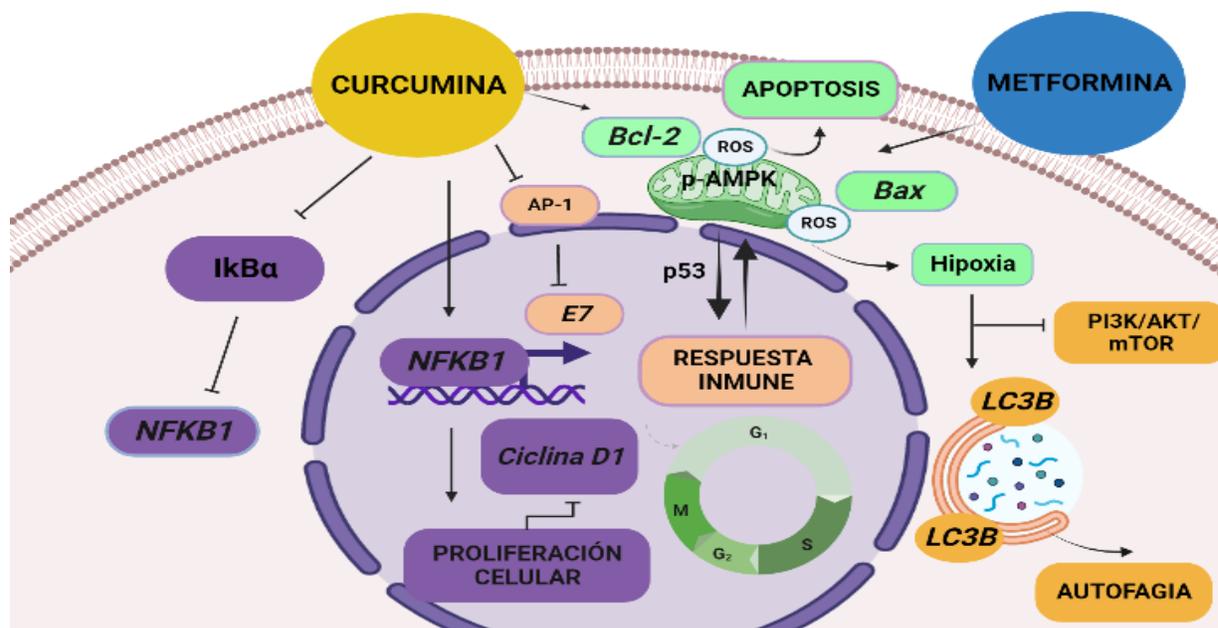


Figura 12. Posibles vías implicadas en el efecto citotóxico sinérgico de la Metformina y Curcumina en líneas celulares derivadas de CaCu. Se muestran los posibles mecanismos y vías de señalización que comparten ambos compuestos para actuar sinérgicamente en células VPH⁺ inhibiendo la proliferación celular y activando la muerte celular (véase texto para detalles). El símbolo \longrightarrow indica vía de activación, y el símbolo \perp indica vía de inhibición.

Los resultados del presente estudio demuestran que la combinación de Metformina y Curcumina podría ser coadyuvante en el tratamiento actual contra el CaCu. Aunque nuestros resultados fueron significativos, falta identificar los mecanismos puntuales por los que estos compuestos actúan en las células VPH⁺. Además, es relevante determinar si la sinergia de ambos compuestos podría disminuir la toxicidad de fármacos antineoplásicos actuales sobre las células no tumorales, y/o reducir los problemas de quimiorresistencia a los anti-neoplásicos, todo esto enfocado en mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

9. CONCLUSIONES

- La Metformina y Curcumina provocan un efecto citotóxico dosis dependiente en las células HeLa (VPH18⁺) y SiHa (VPH16⁺).
- El tratamiento combinado con Metformina y Curcumina potencia la citotoxicidad entre 2 y 5 veces en ambas líneas celulares.
- Las células HeLa son más sensibles a la Metformina, y ambas líneas fueron igualmente susceptibles a la Curcumina.
- La Metformina y Curcumina modulan de manera diferencial la expresión de genes dependiendo de la línea celular; el efecto citotóxico encontrado podría asociarse con los genes *NFKB* y *LC3B* involucrados en la regulación del ciclo celular y la muerte celular por autofagia.
- La Curcumina inhibe la expresión del oncogén *E7* de VPH, sugiriendo que podría estar involucrada en la inhibición de la transformación celular.

10. PERSPECTIVAS

Derivado de los resultados encontrados en el presente estudio, se plantean las siguientes perspectivas:

- Evaluar el efecto citotóxico de la Metformina y Curcumina en células no tumorales (HaCaT) para determinar su especificidad en células tumorales.
- Identificar la inducción de muerte celular por apoptosis y/o autofagia mediante diversas técnicas (caspasas 3/7, citometría de flujo, fragmentación de DNA, entre otras).
- De los genes diferencialmente expresados con la Metformina y Curcumina sería conveniente evaluar su expresión a nivel de proteína mediante Western blot, para identificar sus vías potenciales de acción.
- Evaluar la expresión del oncogén *E6* para determinar si es modulado por la Metformina o Curcumina.
- Analizar la expresión de la proteína p53, para identificar si la transcripción de los genes evaluados dependen de este factor de transcripción, involucrado en múltiples procesos celulares.

11. LITERATURA CITADA

- Al-Zaidan L, El Ruz RA, Malki AM (2017). Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. *Front Public Health*. 5:277.
- Annede P, Gouy S, Haie-Meder C, et al (2019). Place of radiotherapy and surgery in the treatment of cervical cancer patients. *Radiotherapie cancer*. 23(6-7): 737-744.
- Bailey CJ (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 60:1566–1576.
- Chen YH, Yang SF, Yang CK, Tsai HD, Chen TH, Chou MC, Hsiao YH (2020). Metformin induces apoptosis and inhibits migration by activating the AMPK/p53 axis and suppressing PI3K/AKT signaling in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep*. 23(1):88.
- Chen J, Zhou C, Yi J, Sun J, Xie B, Zhang Z, Wang Q, Chen G, Jin S, Hou J, Qin M, Wang L, Wei H (2021). Metformin and arsenic trioxide synergize to trigger Parkin/pink1-dependent mitophagic cell death in human cervical cancer HeLa cells. *J Cancer*. 12(21):6310-6319.
- Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L (2019). Cervical cancer. *The Lancet*. 383:169-182.
- Cordero-Martínez J y García-Pimentel M (2015). Citologías alteradas y algunos factores de riesgo para el cáncer cervicouterino. *Revista de Ciencias Médicas. La Habana*. 21(2):357-370.
- Cruz L, Biryukov J, Conway MJ, Meyers C (2015). Cleavage of the HPV16 Minor Capsid Protein L2 during Virion Morphogenesis Ablates the Requirement for Cellular Furin during De Novo Infection. *Virus*. 7: 5813–5830.
- Dang YP, Yuan XY, Tian R, Li DG, Liu W (2015). Curcumin improves the paclitaxel-induced apoptosis of HPV-positive human cervical cancer cells via the NF- κ B-p53-caspase-3 pathway. *Exp Ther Med*. 9(4):1470-1476.
- Dhanasekaran S (2019). Augmented cytotoxic effects of paclitaxel by curcumin induced overexpression of folate receptor- α for enhanced targeted drug delivery in HeLa cells. *Phytomedicine*. 56:279-285.
- Dimaio D, Petti LM (2013). The E5 proteins. *Virology*. 445(1-2):99-114.
- Doorbar J (2013). The E4 protein: structure, function and patterns of expression. *Virology*. 445(1-2): 80-98.

- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, y Murakami I (2016). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology*. 25:2-23.
- Eslami SS, Jafari D, Montazeri H, Sadeghizadeh M, Tarighi P (2021). Combination of Curcumin and Metformin Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis without Affecting the Cell Cycle in LNCaP Prostate Cancer Cell Line. *Nutr Cancer*. 73(6):1026-1039.
- Feng Y, Ke C, Tang Q, Dong H, Zheng X, Lin W, Ke J, Huang J, Yeung SC, Zhang H (2014). Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis*. 5(2).
- García NJ, Noriega LJ (2008). El tratamiento actual del cáncer cervicouterino. *Ginecol Obstet Mex*. 76(02):131-139.
- Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S y Tommasino M (2015). Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicalscience*. 9:526.
- Giordano A, y Tommonaro G (2019). Curcumin and Cancer. *Nutrients*, 11(10):2376.
- Guo LD, Chen XJ, Hu YH, Yu ZJ, Wang D, Liu JZ (2013). Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytother Res*. 27(3):422-30.
- Harden, ME y Munger K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 772:3–12.
- Hirsch HA, Iliopoulos D, Struhl K (2013). Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(3):972-7.
- Hsieh Li SM, Liu ST, Chang YL, Ho CL, Huang SM (2018). Metformin causes cancer cell death through downregulation of p53-dependent differentiated embryo chondrocyte 1. *J Biomed Sci*. 25(1):81.
- Hoppe-Seyler K, Herrmann AL, Däschle A, Kuhn BJ, Strobel TD, Lohrey C, Bulkescher J, Krijgsveld J, Hoppe-Seyler F (2021). Effects of Metformin on the virus/host cell crosstalk in human papillomavirus-positive cancer cells. *Int J Cancer*. 149(5):1137-1149.

- Kim MY, Kim YS, Kim M, Choi MY, Roh GS, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Shin JK, & Choi WS (2019). Metformin inhibits cervical cancer cell proliferation via decreased AMPK O-GlcNAcylation. *Animal cells and systems*, 23(4):302–309.
- Klingelhutz AJ, y Roman A (2012). Cellular transformation by human papillomaviruses: lessons learned by comparing high-and low-risk viruses. *Virology*, 424(2):77-98.
- Kobayashi M, Kato K, Iwama H, Fujihara S, Nishiyama N, Mimura S, Toyota Y, Nomura T, Nomura K, Tani J, Miyoshi H, Kobara H, Mori H, Murao K, Masaki T (2013). Antitumor effect of metformin in esophageal cancer: in vitro study. *Int J Oncol*. 42(2):517-24.
- Kotha, RR, y Luthria DL (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(16), 2930.
- Kumar D, Basu S, Parija L, Rout D, Manna S, Dandapat J, Debata PR (2016). Curcumin and Ellagic acid synergistically induce ROS generation, DNA damage, p53 accumulation and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *Biomed Pharmacother*. 81:31-37.
- Lei Y, Yi Y, Liu Y, Liu X, Keller ET, Qian CN, Zhang J, Lu Y (2017). Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer*. 36(1):17.
- Liu Q, Loo WT, Sze SC, Tong Y (2009). Curcumin inhibits cell proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 breast cancer cells mediated by down-regulation of NFkappaB, cyclinD and MMP-1 transcription. *Phytomedicine*. (10):916-22.
- Lv Z, Guo Y (2020). Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*.11:191.
- McBride AA (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), 57–79.
- Maher DM, Bell MC, O'Donnell EA, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC (2011). Curcumin suppresses human papillomavirus oncoproteins, restores p53, Rb, and PTPN13 proteins and inhibits benzo[a]pyrene-induced upregulation of HPV E7. *Mol Carcinog*. 50(1):47-57.
- Mallik R, Chowdhury TA (2018). Metformin in cancer. *Diabetes Res Clin Pract*. 143:409-419.
- Mansouri K, Rasoulpoor S, Daneshkhah A, Abolfathi S, Salari N, Mohammadi M, Rasoulpoor S, Shabani S (2020). Clinical effects of curcumin in enhancing cancer therapy: A systematic review. *BMC Cancer*. 20(1):791.

- Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *Embo J.* 21:4754-62.
- Montero LY, Ramón JR, Valverde RC, et al (2018). Principales factores de riesgo en la aparición del cáncer cervicouterino. *MEDISAN 2018.* 22(5):531.
- Pandey A, Vishnoi K, Mahata S, Tripathi SC, Misra SP, Misra V, Mehrotra R, Dwivedi M, Bharti AC (2015). Berberine and Curcumin Target Survivin and STAT3 in Gastric Cancer Cells and Synergize Actions of Standard Chemotherapeutic 5-Fluorouracil. *Nutr Cancer.* 67(8):1293-304.
- Pani S, Sahoo A, Patra A, Debata PR (2021). Phytochemicals curcumin, quercetin, indole-3-carbinol, and resveratrol modulate lactate-pyruvate level along with cytotoxic activity in HeLa cervical cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem.* (6):1396-1402.
- Patiño-Morales CC, Soto-Reyes E, Arechaga-Ocampo E, Ortiz-Sánchez E, Antonio-Véjar V, Pedraza-Chaverri J, García-Carrancá A (2020). Curcumin stabilizes p53 by interaction with NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in tumor-derived cell lines. *Redox Biol.* 28:101320.
- Pricci M, Girardi B, Giorgio F, Losurdo G, Ierardi E, Di Leo A (2020). Curcumin and Colorectal Cancer: From Basic to Clinical Evidences. *Int J Mol Sci.* 21(7):2364.
- Reich O, Regauer S, McCluggage WG, et al (2017). Defining the cervical transformation zone and squamocolumnar junction: can we reach a common colposcopic and histologic definition?. *International Journal of Gynecological Pathology,* 36(6):517-522.
- Rho SB, Byun HJ, Kim BR, Lee CH (2021). Knockdown of *LKB1* Sensitizes Endometrial Cancer Cells via AMPK Activation. *Biomol Ther (Seoul).* 29(6):650-657.
- Schulten HJ. (2018). Pleiotropic Effects of Metformin on Cancer. *International journal of molecular sciences,* 19(10):2850.
- Singh M, Singh N (2009). Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells. *Mol Cell Biochem.* 325(1-2):107-19.
- Stohs, SJ., Chen O, Ray SD, Ji J, Bucci LR, & Preuss HG (2020). Highly bioavailable forms of curcumin and promising avenues for curcumin-based research and application: A review. *Molecules,* 25(6):1397.

- Sureda-Peña M y Martínez-Cárdenas D (2014). Una alerta para la mujer: Factores de riesgo del cáncer cervicouterino. *Medicentro electrónica*. 18(1) 36-38.
- Termini D, Den Hartogh DJ, Jaglanian A, Tsiani E (2020). Curcumin against Prostate Cancer: Current Evidence. *Biomolecules*. 10(11):1536.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 65(2):87-108.
- Ugwueze CV, Ogamba OJ, Young EE, Onyenekwe BM, Ezeokpo BC (2020). Metformin: A Possible Option in Cancer Chemotherapy. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 7180923.
- Vandermark ER, Deluca KA, Gardner CR, Marker DF, Schreiner CN, Strickland DA, Wilton KM, Mondal S, Woodworth CD (2012). Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF-kB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-kB promotes cell growth and immortalization. *Virology*. 425(1):53-60.
- Viollet B, Guigas B, Sanz-Garcia N, Leclerc J, Foretz M, and Andreelli F (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science*, 122(6): 253–270.
- Wuerthner BA y Avila-Wallace M (2016). Cervical Cancer; Screening, management and prevention. *The Nurse Practitioner*. 41(9):18-23.
- Xia C, Chen R, Chen J, Qi Q, Pan Y, Du L, Xiao G, Jiang S (2017). Combining metformin and nelfinavir exhibits synergistic effects against the growth of human cervical cancer cells and xenograft in nude mice. *Sci Rep*. 7:43373.
- Xia C, Liu C, He Z, Cai Y, Chen J (2020). Metformin inhibits cervical cancer cell proliferation by modulating PI3K/Akt-induced major histocompatibility complex class I-related chain A gene expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 39(1):127.
- Yudhani RD, Astuti I, Mustofa M, Indarto D, & Muthmainah M (2019). Metformin Modulates Cyclin D1 and P53 Expression to Inhibit Cell Proliferation and to Induce Apoptosis in Cervical Cancer Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention. APJCP*. 20(6):1667–1673.
- Zarei E, Sefidi-Heris Y, Saadat I (2021). Synergistic effects of metformin and curcumin on cytotoxicity of chemotherapy drugs using a gastric cancer cell line model. *EXCLI J*. 20:1488-1498.

Zur Hausen H (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 84(2):260-5.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 24 de abril de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **JONATHAN GERARDO SANCHEZ PERALTA**, con el título del trabajo: **EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA METFORMINA Y CURCUMINA EN LA CITOTOXICIDAD Y EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS VPH+**.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DR. NAHIM SALGADO MEDRANO

VOCAL: M. EN C. MARGARITA BAHENA ROMAN

SUPLENTE: DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA

SUPLENTE: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARGARITA BAHENA ROMÁN | Fecha:2023-05-11 17:26:08 | Firmante

T86ZMUAt3tV9S9x2pqS31sYh8TkDKVRskblW/ZgAuUUh7lygzDyV8RG2bluMRI11zaBD01rjc6w5Z//4ML1qn90VRQkRofSaUGETpoY21zzXIHnzZxggMZDK8PquAbmVVTfQz90g
gKwis4TUzWjd6JT/eQ4lrCHDY+2/+6L1lc5INIYnVC8HRPKRAFpusLLuS3Ceigqb6PqEx0P7Aqb8MOsTf4951DqsPZB4GWuSV0AgXIS6SLxSZ5GS1RqPMdvVwEs1BDzC3N+Bk0
vCFsl/5MYNeqUNqmShz0G4cQXxIVU/4jnH/A/zyT4zUlus9FjVqPdn2ljdQ27uQ2sNWdy1N2Q==

MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2023-05-11 17:59:01 | Firmante

QCz8Q48Jl6xVhk9clpSDAgIU+718FGFOAR5xzTHmFJjl2Tw3NQ0sZgytW16+ofodZqem4lhN/cAz1XxlMUQ/FITq30eokWekN614L52qc7XxEGQXVTTAq9bo1r3ZLsey54ilZqlUbK
RwXGSI+0HD+15ydP8S6yVdGx1qW9K9JRAKrbXhfxZQjhdwtlJBIBpKOpohpcmnDWR0I8yHziWe/pdeb1kcQpEC/cBfsCcjMbRdvY+VBQGGQYRfTjoGthKHseZMKiiEgOD4PfJM
9pOlrFVlv9Nt+WwifHizxj5WVxUCeSSEjqvNqHJELRQFKieB1EiqL0IEWfxXNA8A9Spw==

NAHIM SALGADO MEDRANO | Fecha:2023-05-12 13:23:54 | Firmante

BdpLJusSHPANCPbe9aw2jkm9XbAoXhNk2dyzVWsAoolUe748FG6Df3jwzyhLOJkMTaFoVUhaS2APTL6XGCrILqWBVYbM7O9seKkf3vgyKVP4WriBOCEHUheHqVf/7b3hEC
WqY1967CRMvIALDU2XCRAnYfwMFSiGiZ34bZldxgZGNfrVshU06O3X31dGlxJ4DSsCscnbKpvShUdyMzXOymF0v3T9NrqvdNbMvS3/P/ToEbm2oRvYJe+Cj8UJtqsrSZqUCdjW
8yM+xiWr0I9Ghu3zDK7Q8xwKLDzDLXJmty1+po9leksmrp14kGz7FZhr5NXvwDHHah90aCB17A5Q==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2023-05-15 10:56:59 | Firmante

PvNv9yiyqTjAW0rcVMDcUjRszF7Pdw/OguJJEuaFzo7wLP1BM72dG5sR8LTeitChYOgNbg7P2cT0KpKjxxSIGH/Qd0u4eSdSfMgShWCXiHump4dfYHFvjstsBzBaaZXufVF71i8IS
dtFboqZnUELvbRq5eJFsPcs4vfKFOzbpAz/0+LiN6yi3S2JFQ8jU6/N3W2t+sZh/FHS0kcKdZUjsAmOQotjlc4Pn3VKjEeq3z0Y9I3Mu262Kth4piqFNSpKJxzUa5yonDdQ3K97W2/
J+izQft3dOhS+nDuczvo1HQR0bfUCbrsm6+00B5hzk+wRDpdjGbuV93CWn8z9g==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-05-18 13:49:31 | Firmante

BLwlijYfGoll7SZ34a9gXKKHJllkpfldlvokqvzYBTr2NFXEKZKFqWmmNJOXt/mjHoe/ehj6sYpFGhu5l3PFGd91yJl6MMTEg7HAbiYj8BfzTxDy251fYCh924TPHNTbnYYCtidDIQGI
QBSP1HNS2CEobMaAioXP2XkDsgy4F4ck8g46eTagRcWlydH3hO/CPBBglY2JG1D+nOn4zMrwfofxSqGMhhKqtzhD0dS0fh+ojdnKR2o7/6HZjvmhzmSxSDVV1Mmr+MIFsd2y
79UCdyaeluiYZRrdQoS0ZjQKAjPyVd+su925YK7ZFLxMLokF9I0HwVlnNjDnM8KPtGg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



qgoeinbd4

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SVHsMsO4Nklt1ihgHl36f2kOtVqBYKK>

