



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Inducción de muerte celular por apoptosis a través de
p53 en respuesta a fármacos antineoplásicos en células
de VPH+**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ALAN ALEXIS ROJAS TOLEDO

CODIRECTORES DE TESIS:

Dra. CARLA O. CONTRERAS OCHOA

Dr. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2023

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Cáncer	7
1.2. Cáncer cervicouterino	8
1.3. Virus de papiloma humano (VPH)	9
1.4. Apoptosis	10
1.5. Proteína p53 y sus funciones celulares	12
1.6. Pifitrina-α	15
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	16
2.1. Fármacos antineoplásicos	16
2.1.1 Carboplatino	16
2.1.2 Etopósido	17
2.1.3 Vincristina	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. METODOLOGÍA	21
6.1 Cultivo y siembra celular	21
6.2 Desprendimiento celular	22
6.3 Conteo celular	22
6.4 Ensayos de citotoxicidad	23
6.5 Actividad de caspasa 3/7 como indicador de muerte celular por apoptosis	23
6.6 Escalera de ADN como indicador de muerte celular por apoptosis	24
6.7 Detección de p53 mediante Western blot	25
6.8 Análisis estadístico	26
7. RESULTADOS	26
7.1 Efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos	26
7.2 Efecto de los fármacos antineoplásicos en la inducción de apoptosis	27
7.3 Participación de p53 en la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con los fármacos antineoplásicos	29
8. DISCUSIÓN	31

9. CONCLUSIONES	37
10. PERSPECTIVAS	39
11. BIBLIOGRAFÍA	39

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de la apoptosis	12
Figura 2. Estructura de p53	13
Figura 3. Señalización de p53	15
Figura 4. Efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos en la línea celular HeLa	27
Figura 5. Formación de la escalera de ADN como indicador de apoptosis en células HeLa tratadas con fármacos antineoplásicos.....	28
Figura 6. Actividad de caspasas 3/7 en respuesta al tratamiento con fármacos antineoplásicos.	30
Figura 7. Visualización de p53 mediante western blot en células HeLa tratadas con los fármacos antineoplásicos.....	31

ABREVIATURAS

CaCU: Cáncer cervicouterino

VPH-AR: Virus del papiloma humano de alto riesgo

pRb: Proteína del retinoblastoma

PFT- α : Pifitrina alfa

LCR: Región larga de control

PBS: Solución salina de fosfatos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

SBF: Suero bobino fetal

AIF: Factor de inducción de apoptosis

EndoG: Endonucleasa G

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un grave problema de salud pública en la población femenina de México y el mundo. El tratamiento de primera línea en etapas avanzadas de CaCU consiste en el uso de quimioterapia con diferentes fármacos; sin embargo, su toxicidad, efectos secundarios y quimioresistencia celular han promovido la búsqueda de otras alternativas. En esta investigación nos enfocamos en el Carboplatino, el Etopósido y la Vincristina; tres fármacos antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción usados en la clínica para el tratamiento de diversos tumores. Utilizando la línea celular derivada de CaCU HeLa VPH18+, evaluamos el efecto citotóxico de estos fármacos mediante ensayos de citotoxicidad, así como su capacidad para inducir apoptosis midiendo la actividad de las caspasas 3/7 y la formación de la escalera de ADN, por último analizamos la expresión de la proteína p53 mediante western blot, el cual es un factor de transcripción con un papel muy importante ya que suprime el desarrollo del cáncer, debido a su capacidad para inducir apoptosis y otros procesos celulares. Nuestros resultados demostraron que los tres fármacos provocan un efecto citotóxico dosis dependiente a las 48 horas de tratamiento; además, se evidenció el efecto apoptótico inducido por la Vincristina y el Etopósido principalmente; mientras que el Carboplatino también indujo este tipo de muerte celular en menor proporción. El uso de pifitrina alfa, inhibidor específico de p53, disminuyó la actividad de las caspasas 3/7 inducido por los tres fármacos, más notablemente con Etopósido y Vincristina, infiriendo que p53 podría estar

involucrado; sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la expresión de esta proteína con ninguno de los tratamientos en relación con el control. Estos resultados indican que el Carboplatino, aunque provoca un efecto citotóxico en las células HeLa, tiene un bajo potencial para inducir apoptosis, por lo que podrían estar involucrados otros tipos de muerte celular. Por su parte, el Etopósido y la Vincristina fueron los principales inductores de apoptosis, y al parecer la vía de activación de este tipo de muerte no está regulada directamente por p53, sugiriendo que estarían involucradas otras vías independientes a p53. Se propone el uso de la Vincristina como una alternativa potencial en tratamiento del CaCU, que en combinación con otros fármacos antineoplásicos potencien la citotoxicidad en las células tumorales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Las células tumorales se caracterizan por una rápida proliferación, evasión de la muerte celular por apoptosis, inducción de angiogénesis e invasión a otros tejidos mediante la migración por el torrente sanguíneo, proceso conocido como metástasis (Jacob et al, 2018). En el mundo, el cáncer es la principal causa de muerte, asociado al estado socioeconómico y al crecimiento poblacional. Para el 2020 se reportó una prevalencia de 50.5 millones de casos (GLOBOCAN, 2020). Existen múltiples factores de riesgo para el desarrollo del cáncer incluyendo la genética, y el aumento en las mutaciones, asociadas al envejecimiento o a la

exposición a compuestos químicos, radiación o la presencia de ciertos microorganismos como virus o bacterias (Hassanpour & Dehghani, 2017).

1.2. Cáncer cervicouterino

El agente etiológico del cáncer cervicouterino (CaCU) es el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR); este tipo de tumor se origina cuando las células escamosas o glandulares que recubren el cérvix en la parte inferior del útero comienzan a crecer fuera de control (ACS, 2021). El CaCU es el cuarto cáncer con mayor incidencia, así como el tercero con mayor mortalidad en mujeres a nivel mundial; mientras que, en México, el CaCU es un grave problema de salud pública para las mujeres, ya que ocupa el segundo lugar con mayor incidencia y mortalidad con un estimado para el 2020 de 9,439 casos nuevos y 4,335 muertes (GLOBOCAN).

La infección con el VPH-AR es necesaria mas no suficiente para el desarrollo del CaCU; existen otros factores que incrementan el riesgo tales como el inicio temprano de actividades sexuales, múltiples embarazos, anticonceptivos orales, obesidad, tabaquismo, y se ha asociado también a co-infecciones con otros microorganismos como herpes o virus de inmunodeficiencia humana (Johnson et al, 2019). El tratamiento estándar para pacientes en etapas iniciales de CaCU es mediante cirugía, y en etapas avanzadas se recomienda la radioterapia y/o quimioterapia con el fármaco antineoplásico cisplatino administrado solo o en combinación con otros fármacos como el Carboplatino, Paclitaxel, Topotecán o Ifosamida (Hill, 2020; Kumar et al, 2018).

1.3. Virus de papiloma humano (VPH)

Los VPH son virus pequeños, carentes de envoltura nuclear y con un genoma de ADN bicatenario (Knipe & Howley, 2013), los cuales tienen un tropismo por el epitelio escamoso; a pesar de que existe una gran variedad de genotipos, la mayoría no causa lesiones mayores. Sin embargo, dentro de la clasificación de VPH-AR, principalmente el VPH16 y VPH18 generan neoplasia intraepitelial (de Martel et al, 2012). Su genoma se divide en tres diferentes regiones, una temprana en donde están contenidos aquellos genes involucrados en la replicación viral, la región tardía que transcribe a las proteínas estructurales de la cápside y la tercera región, la LCR que contiene el origen de replicación y las secuencias control de la transcripción (Balasubramaniam et al, 2019)

La infección por el VPH, inicia cuando las partículas virales tienen acceso a la capa basal del epitelio, donde en la superficie celular interactúan con proteoglicanos de heparán sulfato, y receptores secundarios que facilitan la incorporación viral a la célula y la subsecuente transferencia del genoma viral al núcleo, estableciéndose como un episoma con un número bajo de copias en la célula hospedadora (Balasubramaniam et al, 2019)

El desarrollo de CaCU se atribuye principalmente a los oncogenes virales E6 y E7, los cuales se encuentran en la región temprana del genoma viral. La proteína E7 de alto riesgo (E7-AR) está principalmente asociada a la progresión del ciclo celular y la inhibición de la diferenciación celular al asociarse con pRb y otros miembros de la familia de la proteína Retinoblastoma (Doorbar et al, 2012), lo que provoca una activación del factor de transcripción E2F, que a su vez activa numerosos genes requeridos por la célula para promover la progresión del ciclo

celular de la fase G1 a la fase S. Por otro lado, la oncoproteína E6, promueve la inmortalización de las células cancerosas, a través de la activación de la telomerasa e inhibición de la apoptosis al degradar a p53 y a Bax (Mosweu et al, 2020; Sung et al, 2017).

1.4. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada altamente regulado y sin respuesta inflamatoria, está involucrada en múltiples eventos como el desarrollo embrionario, renovación celular, respuesta inmune y la prevención de carcinogénesis (Xu, et al, 2019).

La activación de la apoptosis depende de diferentes cisteín-aspartato proteasas conocidas como caspasas, las cuales se dividen en dos categorías, iniciadoras y ejecutoras (D'Arcy, 2019). Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas ejecutoras y estas inician una cascada de eventos que promueven la fragmentación del ADN a través de la activación de endonucleasas y proteasas que favorecen la degradación de proteínas nucleares y del citoesqueleto, así como la expresión de ligandos para células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos (Martinvalet et al, 2005; Poon et al, 2014).

La apoptosis se divide en la vía la intrínseca y la extrínseca (Figura 1). En la vía intrínseca, el inicio de la apoptosis se activa a través de estímulos como la ausencia de hormonas o citocinas inhibidoras de muerte celular y ciertos factores de crecimiento, así como la radiación, toxinas, hipoxia, infecciones virales y radicales libres. Las señales antes mencionadas favorecen alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial externa promoviendo la generación de un

poro que permite la liberación de proteínas pro-apoptóticas como citocromo c, Smac/Diablo y HtrA2/Omi desde el espacio intermembranal hacia el citosol. Posteriormente, el citocromo c se une a APAF 1 formando el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta a la pro-caspasa 9 activándola e iniciando así la apoptosis (Figura 1),(Carneiro & El-Deiry, 2020).

La vía extrínseca es iniciada por células natural killer o macrófagos cuando sus ligandos se unen a receptores de muerte localizados en la membrana celular de la célula blanco. Algunos receptores miembros de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) son Fas, DR4/DR5, TNF-R1, entre otros. Una vez formado el complejo ligando-receptor recluta a la proteína adaptadora FADD a través de su dominio de muerte (DD); la formación del receptor y FADD recluta a pro-caspasa 8 mediante el dominio efector de muerte (DED) formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC, por sus siglas en inglés). La formación del DISC promueve la dimerización y activación de la caspasa 8. Posteriormente, la caspasa-8 activa a la caspasa-3 (ejecutora) permitiendo así el inicio de la cascada proteolítica de la apoptosis (Figura 1), (D'Arcy, 2019).

Durante la última etapa de la apoptosis, la caspasa-3 escinde al factor de fragmentación de ADN (DFF) el cual es un heterodímero con una subunidad catalítica de 40 kDa (DFF40) y una subunidad regulatoria de 45 kDa (DFF45). DFF40 tiene actividad de endonucleasa, fragmentando el ADN nuclear en segmentos de 180 pb y múltiplos de este (180, 360, 540, 720 pb, etc.) formando un patrón conocido como escalera de ADN (Majtnerová & Rousar, 2018).

Por otro lado, la inducción de apoptosis puede ser independiente a caspasas a través del factor de inducción de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG), los

cuales se translocan desde la mitocondria hasta el núcleo provocando la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina (Ranjan & Iwakuma, 2016).

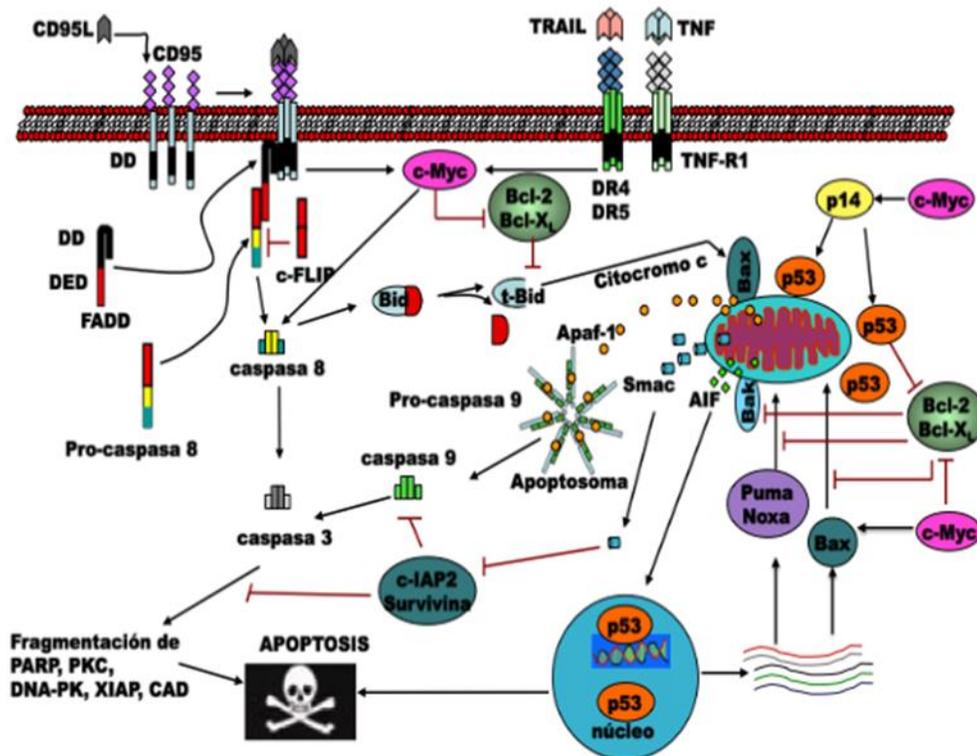


Figura 1. Esquema general de la apoptosis (Modificada de Lagunas-Martínez et al, 2010).

1.5. Proteína p53 y sus funciones celulares

El gen *p53* codifica para una proteína con un peso molecular de 53 kDa, la cual funciona como un factor de transcripción que regula la expresión de 3,000 genes aproximadamente; es considerado el guardián del genoma ya que está fuertemente involucrado en el mantenimiento y la estabilidad genómica, regulando procesos como el arresto del ciclo celular, reparación de ADN, senescencia,

autofagia y apoptosis, regulando así, la supresión del desarrollo de cáncer (Figura 3). Se ha encontrado que p53 se encuentra mutado o inactivado en alrededor del 50% de todos los tipos de cáncer (Liu et al 2019; Aubrey et al 2018).

Esta proteína presenta tres dominios generales (Figura 2), un segmento amino terminal que interactúa con proteínas reguladoras y componentes de la maquinaria de transcripción basal, un dominio de unión al ADN y un dominio carboxilo terminal regulatorio, que permite la tetramerización del polipéptido, permitiéndole interactuar con otras proteínas de p53. La formación de tetrámeros es fundamental para la modificación postraducciona de p53 y su capacidad para activar o reprimir la transcripción de genes diana para inhibir el crecimiento tumoral. (Meek & Anderson, 2010; Nguyen et al, 2014; Joerger & Fersht, 2016, Kamada et al, 2010).

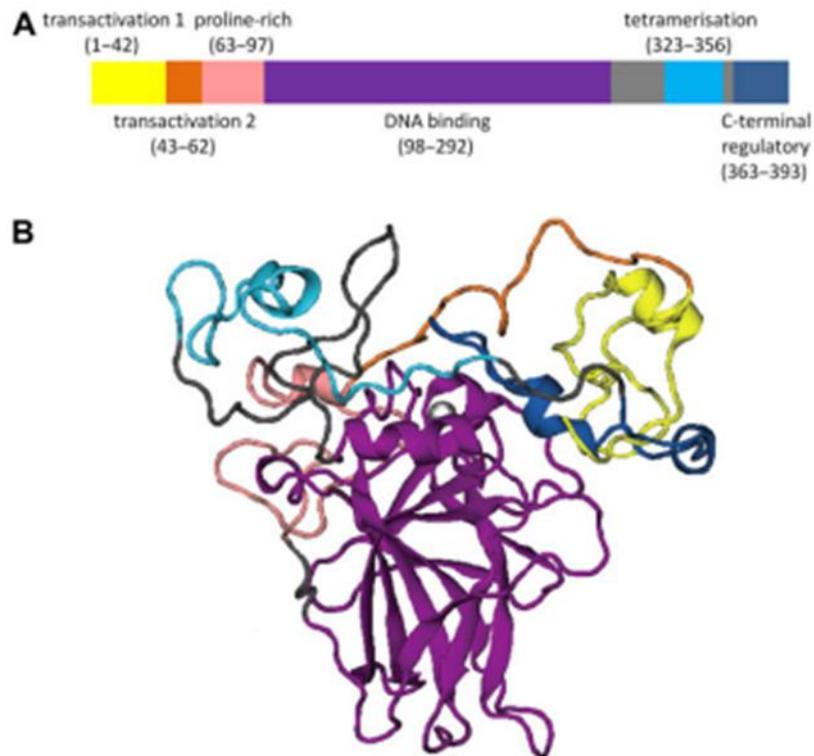


Figura 2. Estructura de p53. (A) Arquitectura de los dominios de p53 (B) estructura tridimensional de p53 (Tomada de Chillemi et al, 2013).

La proteína p53 es traducida constantemente en una célula normal, desempeñando su actividad principalmente en el núcleo celular; su vida media es de 6 a 20 min, ya que es rápidamente degradada al ser ubiquitinada por la E3 ubiquitina ligasa MDM2 (Shen et al, 2013). No obstante, el daño al ADN, la hipoxia o la activación de oncogenes, regulan positivamente a p53 a través de modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación y O-glicosilación que estabilizan a la proteína incrementando su vida media y por tanto sus niveles en la célula (Tan et al, 2019).

Cuando se genera daño al ADN, p53 inhibe la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S para activar los sistemas de reparación del ADN. Alternativamente, cuando este daño es irreparable, p53 induce muerte celular al activar la transcripción de genes que inician la apoptosis intrínseca y/o autofagia como *Bax*, *PUMA*, *Noxa*, *Beclina-1* y *LC3* (Aubrey et al, 2018), o genes que codifican para receptores que activan la vía extrínseca de la apoptosis, como el receptor FAS (Tan et al, 2019). Además, p53 regula la apoptosis de forma independiente a la transcripción, al interactuar con varios miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 en el citoplasma (Tan et al, 2019). Para dilucidar la función de esta proteína se han utilizado diversas estrategias como la mutación o delección de p53 o de inhibidores.

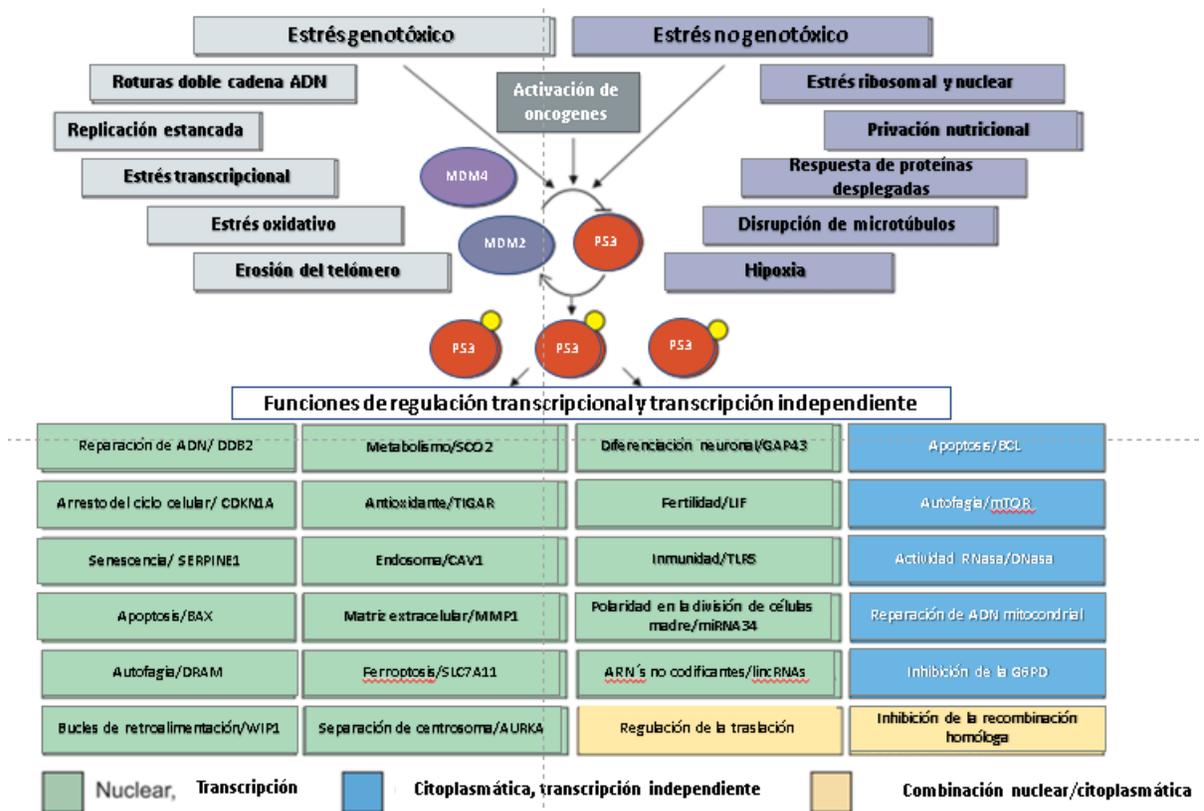


Figura 3. Señalización de p53. En respuesta a estrés genotóxico (daño a ADN, estrés oxidativo, etc.), no genotóxico (hipoxia, deficiencia de nutrientes etc.) y activación de oncogenes, se favorece la modificación postraduccional de p53, promoviendo su liberación de MDM2 y llevando a cabo sus diferentes funciones en el núcleo o en el citoplasma (Imagen modificada de Menéndez et al, 2018).

1.6. Pifitrina- α como inhibidor de p53

Es un compuesto soluble en agua, el cual ha sido identificado como un inhibidor específico de p53 al bloquear su actividad transcripcional, su unión al ADN, así como su translocación nuclear al interactuar directamente con la hsp90, una chaperona que favorece la estabilización de p53 (Zhu et al, 2020). También se ha reportado que la Pifitrina- α puede reducir la estabilidad de p53 dentro del núcleo (Guo et al, 2019). Debido a la actividad inhibitoria de p53, Pifitrina- α es usada para

conocer los mecanismos dependientes de esta proteína como la apoptosis, la respuesta a fármacos y el daño al ADN (Zhu et al, 2020).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. Fármacos antineoplásicos

Los fármacos antineoplásicos o quimioterapéuticos son usados como tratamiento de primera línea en diferentes tipos de cáncer, utilizándose en conjunto con otros tratamientos como cirugía y/o radiación (Kwok et al, 2017). El objetivo de la quimioterapia es eliminar toda aquella célula tumoral viable con el menor daño posible al tejido normal del paciente, esto ocurre al bloquear alguna vía metabólica o bioquímica dentro de la célula. Los fármacos antineoplásicos tienen diferentes mecanismos, ya sea inhibiendo la síntesis de ADN, interfiriendo directamente en las funciones de los ácidos nucleicos o bloqueando la producción de diversas proteínas importantes en el ciclo celular (Kwok et al, 2017).

2.1.1 Carboplatino

El Carboplatino (1,1-ciclobutildicarboxilato) es un agente alquilante perteneciente al grupo de compuestos de platino, es un derivado del Cisplatino; sin embargo, este es menos tóxico y genera menos efectos secundarios (Nabors et. al., 2016). Es usado comúnmente para el tratamiento de cáncer de ovario, testículos, cabeza y cuello y pulmón (de Sousa et al, 2014). Su mecanismo de acción consiste en la unión directa al ADN, donde forma aductos que generan dímeros inter o intracatenarios interfiriendo así con la replicación y transcripción, desencadenando la muerte celular (de Sousa et al, 2014).

Diversos estudios han evaluado el efecto citotóxico del Carboplatino en la línea celular HeLa (VPH18⁺) (Aborehab & Osama, 2019; Tang et al, 2018; Aranda, 2016), en los que se ha observado una disminución dosis dependiente en la viabilidad celular en respuesta al tratamiento. En experimentos previos se utilizaron diversas concentraciones a 48 h de tratamiento estableciendo la IC50 a 200 μ M (Aranda, 2016); y en otro ensayo se obtuvo una IC50 de 870 μ M a 24 h de tratamiento (Aborehab & Osama, 2019). Por su parte Tang y colaboradores utilizaron 67 y 134 μ M de Carboplatino obteniendo un efecto citotóxico del 80% y 90% respectivamente, a las 48 h post-tratamiento (Tang et al, 2018).

Además, en células HeLa tratadas con Carboplatino a 67 y 134 μ M, la disminución en el potencial de membrana mitocondrial y los análisis con Anexina V/Ioduro de propidio señalan la inducción de muerte celular por apoptosis (Tang et al 2018; Aborehab & Osama, 2019). A su vez, se ha reportado un incremento en la expresión de las proteínas p53 y caspasa 3, aunado a la disminución del gen anti-apoptótico *Bcl-2* (Aborehab & Osama, 2019). De manera importante, esta misma inducción de apoptosis por p53 se ha observado en líneas celulares derivadas de CaCU como SiHa y CaSki, ambas VPH16⁺ (Singh et al, 2007; Lee et al, 2010).

2.1.2 Etopósido

Es un inhibidor semisintético de la enzima topoisomerasa comúnmente usado en el tratamiento de cáncer de pulmón, testículo, linfomas y glioblastomas (Zhang et al 2021). El Etopósido inhibe la reparación de ADN dañado por parte de la topoisomerasa II, al unirse al complejo topo II-ADN a través de enlaces covalentes (Osheroff, 1989; Burden et al, 1996), lo que frena la transcripción, síntesis de ADN

y por tanto la mitosis, conduciendo finalmente a la muerte celular (Robinson & Osheroff, 1991).

En un trabajo previo se encontró que el etopósido a diferentes concentraciones (50, 75, 100, 200 y 400 μ M) provoca un efecto citotóxico dosis dependiente a las 48 h de tratamiento en las líneas celulares HeLa y SiHa (Aranda, 2016). También se ha demostrado el efecto sinérgico del etopósido con otros compuestos, entre ellos KG-130 (compuesto extraído del ginseng), inhibiendo el crecimiento celular en un 70% en la línea celular HeLa, con una dosis de 17 μ M de etopósido durante 24 h (Lee et al, 2010).

Por otra parte, en la línea celular HeLa, el Etopósido en combinación con el KG-135 incrementa la actividad de la caspasa 3; además se encontró un incremento en los niveles de expresión de la proteína p53 en sus variantes fosforiladas, así como las proteínas Bax y p21 dependientes de p53 (Lee et al, 2010). En la línea celular CaSki (VPH16⁺) el tratamiento con Etopósido aumenta la expresión de la proteína de p53, y de los genes *Beclina-1* y *LC3*, los cuales son dependientes de p53; y si bien en este estudio no se evaluó apoptosis, la presencia de estos factores podría estar relacionada con este tipo de muerte celular (Lee et al, 2007).

2.1.3 Vincristina

La Vincristina, un vinca alcaloide extraído de la planta *Vinca rosea*, es un compuesto lípo-soluble, el cual se une a las subunidades β -tubulina de las estructuras microtubulares intracelulares provocando su despolimerización y de esta forma, inhibiendo la progresión de la mitosis y promoviendo la muerte celular (Lobert et al, 1996; Carincross et al, 2013). Esta indicado en el tratamiento de

leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, gliomas, oligodendroglioma anaplásico y diversos linfomas (Lee et al,2019; Li et al, 2020).

Se ha reportado que por los mecanismos de unión a β -tubulina, la Vincristina tiene un efecto citotóxico dosis dependiente a las 48 h y 72 h de tratamiento, no solo en células HeLa, sino también en múltiples líneas celulares como SiHa, MCF-7 y SK-OV-3 (Aranda, 2016; Zdioruk et al, 2020).

Se sabe que la Vincristina en células HeLa además de inhibir la progresión del ciclo celular en la fase G2/M e inducir muerte celular por catástrofe mitótica (Zdioruk et al, 2020), puede activar la vía intrínseca de la apoptosis, debido a la presencia de las proteínas pro-apoptóticas Bax y citocromo c, que provocan el aumento en la actividad proteolítica de las caspasas (Groth-Pedersen et al, 2007). Sin embargo, a pesar de conocerse el efecto citotóxico de estos fármacos, aún no se conoce si es a través de p53 o de otras vías.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) es un grave problema de salud pública en México y a nivel mundial por su alta tasa de incidencia y mortalidad en mujeres. El tratamiento actual contra el CaCU consiste en cirugía y quimioterapia con el fármaco Cisplatino; sin embargo, este tratamiento es inespecífico para células tumorales y provoca diversos efectos secundarios en los pacientes, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas de tratamiento con menores efectos secundarios o bien mejorar la especificidad de los fármacos utilizados actualmente.

Los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina se usan para el tratamiento de diversos tumores sólidos y se ha demostrado la reducción del tamaño de éstos; su mecanismo de acción consiste en la generación de enlaces cruzados de ADN, rompimientos de doble hebra y la unión a tubulina inhibiendo la división mitótica, respectivamente; esto provoca la inhibición de la progresión del ciclo celular y posteriormente la muerte celular principalmente en células que están en constante proliferación, como son las células tumorales.

P53 es un factor de transcripción que activa apoptosis y otros procesos celulares cruciales en la eliminación de células cancerígenas y probablemente esté involucrada en la respuesta celular ante Carboplatino, Etopósido y Vincristina; la evidencia experimental indica que estos fármacos antineoplásicos son citotóxicos en células VPH⁺, efecto posiblemente asociado a la inducción de muerte celular por apoptosis. Por este motivo, el presente estudio, además de confirmar la inducción muerte celular por apoptosis de carboplatino, etopósido y vincristina, pretende evaluar la participación de p53 en este proceso. La investigación realizada va encaminada a entender el mecanismo de acción de estos fármacos, y proponerlos como una posible alternativa de tratamiento en combinación con el Cisplatino, para mejorar su especificidad sobre células tumorales, ampliando el panorama de alternativas de tratamiento contra el CaCU.

4. HIPÓTESIS

Los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina inducen muerte celular por apoptosis asociada a la vía de activación de p53 en células HeLa derivadas de cáncer cervicouterino.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar si los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina inducen muerte celular por apoptosis asociada a la vía de activación de p53 en células HeLa VPH18⁺ derivadas de cáncer cervicouterino.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico inducido por los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina en células HeLa.
2. Determinar el efecto apoptótico de Carboplatino, Etopósido y Vincristina en células HeLa.
3. Determinar la participación de p53 en la inducción de apoptosis en células HeLa tratadas con los fármacos mencionados.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cultivo y siembra celular

Se utilizó a la línea celular HeLa VPH18⁺ derivada de CaCU, cultivándola en frascos de 25 cm² con 3.5 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y 1X de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B), y se incubaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂.

6.2 Desprendimiento celular

Debido a que la línea celular utilizada tiene la característica de adherirse al frasco de cultivo, las células se desprendieron usando la siguiente solución: Tripsina 0.1%, EDTA tetrasódico 0.025%, glucosa 0.1%. Se remueve 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 incubando durante 1 a 2 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregó 2 mL de medio DMEM suplementado para inactivar a la tripsina, colectando la suspensión celular por centrifugación a 2,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, desechando el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 1 mL de medio de cultivo suplementado.

6.3 Conteo celular

Para determinar el número y viabilidad celular se tomaron 20 μ L de suspensión celular y 20 μ L de colorante vital azul tripano en un tubo Eppendorf para obtener una dilución 1:2. Posteriormente, se colocaron 10 μ L de esta suspensión en la cámara de Neubauer contando cuatro cuadrantes en un microscopio invertido, y se obtuvo el número total de células de acuerdo con la fórmula descrita a continuación, refiriéndose al número de células totales por mL de suspensión.

Número de células: $\text{Número de células totales} / 4 \times \text{dilución celular} \times 10,000 \times$
volumen total de la suspensión celular.

6.4 Ensayos de citotoxicidad

Las células HeLa se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo con 100 μ L de medio DMEM suplementado. Después de 24 h se incubaron en presencia de los fármacos antineoplásicos a diferentes concentraciones: Carboplatino 150, 200, 225, 250 y 300 μ M; Etopósido 150, 200, 250, 300 y 350 μ M y Vincristina 30, 35, 40 y 50 μ M durante 48 h. Se incluyó un control negativo que fueron las células sin tratamiento. Posterior a la incubación se evaluó la viabilidad celular a través de un ensayo colorimétrico utilizando MTS (CellTiter 96® AQueous MTS reagent powder, Promega) colocando 20 μ L del reactivo por pozo incubándose durante hora y media a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂, y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 490 nm y 690 nm en un espectrofotómetro iMark (BIO-RAD). Para el análisis de los resultados se restó la lectura del fondo de la placa (690 nm) a la de la muestra (490 nm) para cada uno de los valores; donde se normalizó el valor control con células no tratadas como el 100% de viabilidad celular para ajustar los valores de los diversos tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado obteniendo el promedio y desviación estándar. Con estos resultados se estableció para cada uno de los tratamientos la concentración inhibitoria media (IC₅₀), es decir, la concentración a la que se obtiene el 50% de viabilidad celular.

6.5 Actividad de caspasa 3/7 como indicador de muerte celular por apoptosis

Las células HeLa se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo con 100 μ L de medio DMEM suplementado; al día siguiente se incubaron en presencia de los fármacos antineoplásicos a la dosis

IC₅₀: Carboplatino 250 µM, Etopósido 350 µM y Vincristina 50 µM y se incubaron durante 48 h. Se incluyó un control negativo que son células sin tratamiento, y un control positivo con Cisplatino 15 µM, que es el fármaco de primera línea para el tratamiento de cáncer cervicouterino.

En otra serie de experimentos para determinar si la actividad de caspasas 3/7 está regulada por p53 se usó el inhibidor de p53 Pifitrina-α (10 µM) incubando las células con este durante 2 h previas al tratamiento con los fármacos antineoplásicos, y posteriormente incubando durante 24 h. En ambos experimentos la actividad de caspasas se midió utilizando el reactivo Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit de Promega (100 µL/pozo) incubando por 30 minutos en ausencia de luz. La cuantificación se realizó en el Luminómetro Glomax Multi Detection System (Promega). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, y se obtuvo el promedio y la desviación estándar.

6.6 Escalera de ADN como indicador de muerte celular por apoptosis

Este ensayo se realizó sembrando las células HeLa en placas de cultivo de 6 pozos a una densidad de 800,000 células por pozo con 1500 µL de medio DMEM suplementado. Al día siguiente las células se trataron con Carboplatino, Etopósido o Vincristina a la dosis IC₅₀, y se incubaron durante 24 h; se utilizaron también células no tratadas como control negativo. Transcurrida la incubación, se colectaron las células en suspensión por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos, y las células adheridas a la placa se desprendieron con 700 µL de solución para desprender células incubando durante 1 minuto a 37°C, posteriormente se agregó 700 µL de medio DMEM suplementado para inactivar la

tripsina, y las células se colectaron por centrifugación usando las condiciones antes mencionadas, desechando el sobrenadante; el precipitado se resuspendió en 100 μ L de tampón de lisis hipotónico durante 45 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y la suspensión se transfirió a otro tubo que se incubó durante 30 minutos a 50°C en presencia de 0.2 mg/mL de RNasa A y 0.2 mg/mL de proteinasa K. El ADN se precipitó con isopropanol y NaCl durante toda la noche a una temperatura de -20°C, después la muestra se centrifugó a 14,000 rpm y se resuspendió en 20 μ L de Tris-HCL 10 mM pH 8.5. El producto resultante se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 V durante 1.5 h y fue visualizado mediante un iluminador UV. Se realizaron tres experimentos independientes.

6.7 Detección de p53 mediante Western blot

Después del tratamiento con los fármacos antineoplásicos, las células se lavaron y lisaron con buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% SDS y 0.1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas. Se realizó extracción de proteínas totales, incubando durante 30 min los extractos protéicos en hielo y con agitación en vórtex para una completa disgregación de las células; posteriormente, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas totales.

La concentración de proteína se determinó utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Se utilizaron 50 μ g de proteína total para realizar Western Blot separando las proteínas mediante geles de poliacrilamida SDS al 10% en

condiciones desnaturalizantes, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas por una hora con 5% de leche libre de grasa (Svelty, Nestle), e incubadas con el anticuerpo anti-p53 HRP toda la noche a 4°C; y después se lavaron tres veces con PBS-0.1% Tween-20.

Posteriormente, la membrana se incubó utilizando el reactivo de quioluminiscencia del kit SuperSignal West Pico chemiluminiscence (Pierce), y las imágenes fueron adquiridas por quimioluminiscencia en el equipo iBright. El anticuerpo anti-actina-HRP fue utilizado como un control de carga. Adicionalmente, se utilizaron las células C33A como control positivo para la expresión de p53. Se realizaron tres experimentos independientes.

6.8 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la prueba Wilcoxon-Mann-Whitney en el software Minitab versión 20.3, donde el valor de $P \leq 0.05$ consideró estadísticamente significativas a las diferencias entre el control y los tratamientos realizados.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos

Para evaluar el efecto citotóxico del Carboplatino, Etopósido y Vincristina las células HeLa fueron incubadas durante 48 h con los fármacos antineoplásicos a diferentes dosis, tomando como referencia trabajos previos (Aranda, 2016). Se

encontró que los tres fármacos provocaron un efecto citotóxico dosis dependiente, y se estableció la dosis letal media IC_{50} para Carboplatino 250 μM , Etopósido 350 μM y Vincristina 50 μM (Figura 4).

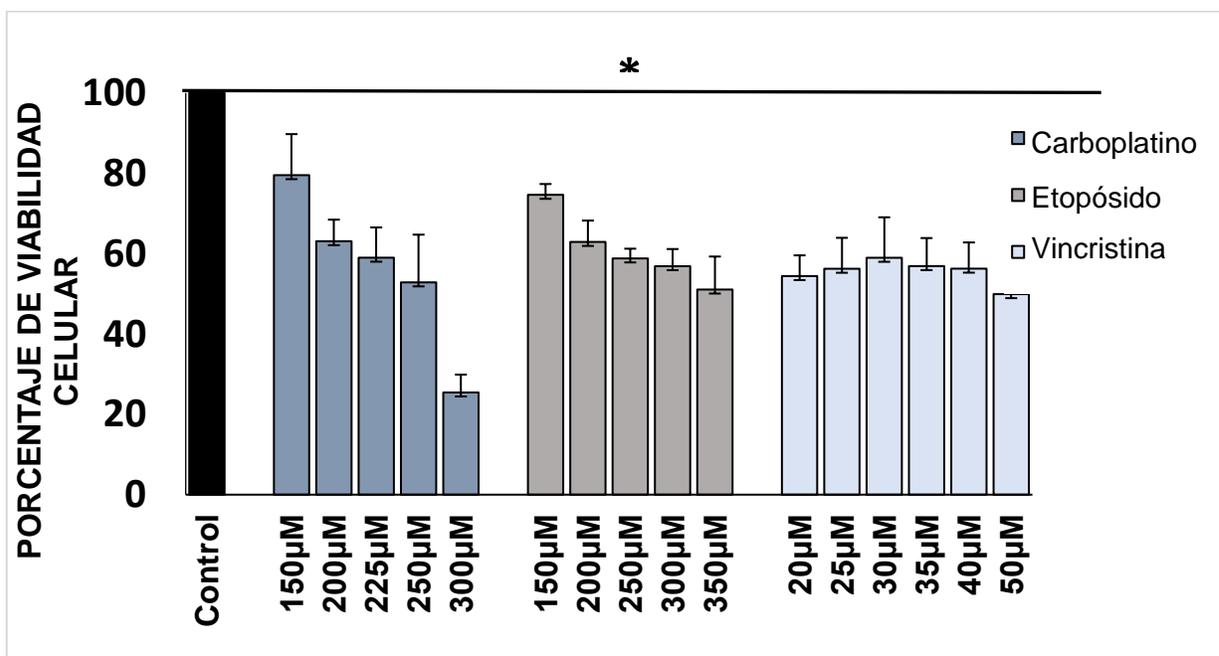


Figura 4. Efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos en la línea celular HeLa. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de los fármacos durante 48 h, y se midió la viabilidad celular por la incorporación del MTS. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes por duplicado \pm Desviación estándar (DE). El asterisco (*) indica un valor de $P \leq 0.05$ estadísticamente significativo.

7.2 Efecto de los fármacos antineoplásicos en la inducción de apoptosis

La fragmentación del ADN en múltiplos de 180 pb es un marcador de muerte celular por apoptosis. Los resultados en el gel de agarosa muestran la fragmentación del ADN en las células HeLa tratadas con los fármacos

antineoplásicos; con Vincristina la formación de la escalera de ADN fue mayor en comparación con el Etopósido; sin embargo, el Carboplatino se observó efecto en la formación del patrón de oligómeros de ADN (Figura 5); lo que indica que la Vincristina fue el principal inductor de muerte por apoptosis en estas células.

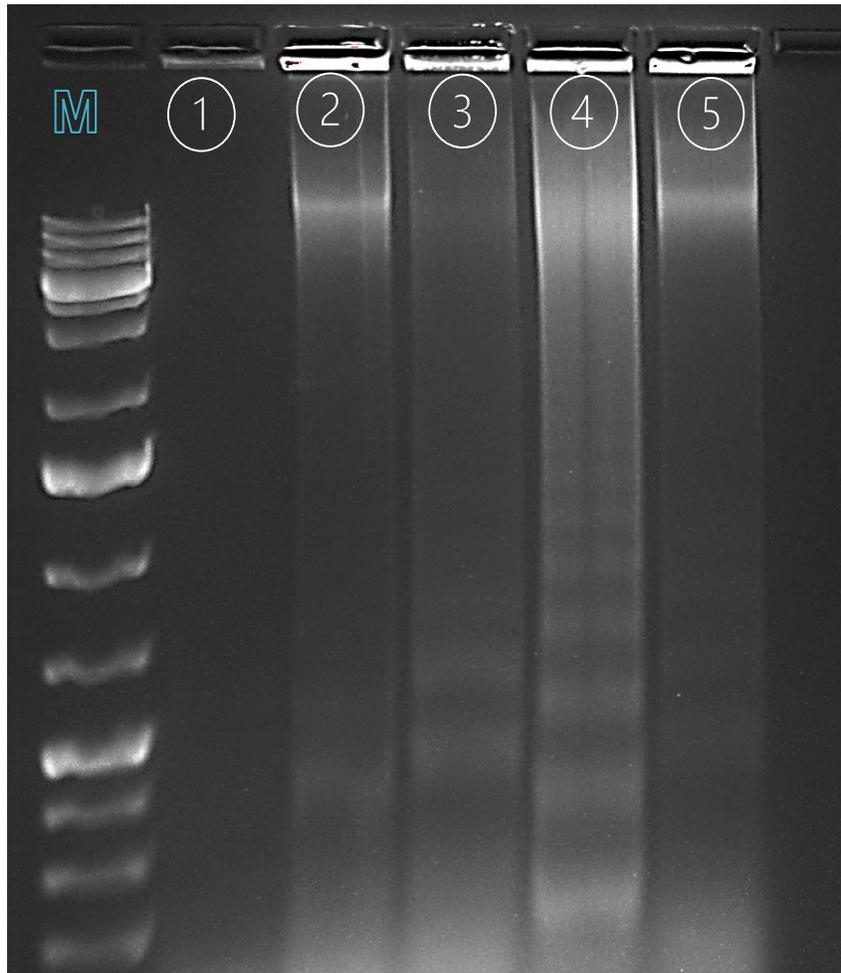


Figura 5. Formación de la escalera de ADN como indicador de apoptosis en células HeLa tratadas con fármacos antineoplásicos. Las células se incubaron con los fármacos a la dosis IC_{50} durante 48 h; se obtuvo el DNA y se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. **(M)** Marcador de peso molecular (1 Kb), **1.** Control negativo con células sin tratamiento, **2.** Carboplatino 250 μ M, **3.** Etopósido 350 μ M, **4.** Vincristina 50 μ M, **5.** Control positivo con Cisplatino 15 μ M. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes.

7.3 Participación de p53 en la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con los fármacos antineoplásicos

Para determinar si la proteína p53 tiene un papel relevante en la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con los fármacos antineoplásicos a las dosis IC₅₀, las células HeLa se incubaron en presencia o ausencia de Pifitrina- α , un inhibidor específico de p53, que bloquea ciertas modificaciones postraduccionales y su traslocación al núcleo, entre otros procesos; y posteriormente se midió la activación de caspasas 3/7 como indicadores de apoptosis.

En las células no tratadas con Pifitrina- α , el Etopósido provocó un incremento de 6.7 veces más en la actividad de caspasas con relación al control sin tratamiento; mientras que el Carboplatino y la Vincristina incrementaron dicha actividad 2 y 3 veces más, respectivamente (Figura 6), indicando que el Etopósido es un mejor inductor de apoptosis.

Por su parte, la Pifitrina- α inhibió considerablemente la activación de caspasas 3/7 con los tres fármacos evaluados; para el Etopósido y la Vincristina el efecto fue similar, la inhibición fue de 8.8 y 9 veces más con relación al control sin PFT- α , respectivamente, por su parte, con el Carboplatino esta inhibición fue de 3.2 veces más (Figura 6). Estos resultados indican que la apoptosis está regulada de manera importante por la activación de p53 inducida por los diversos fármacos.

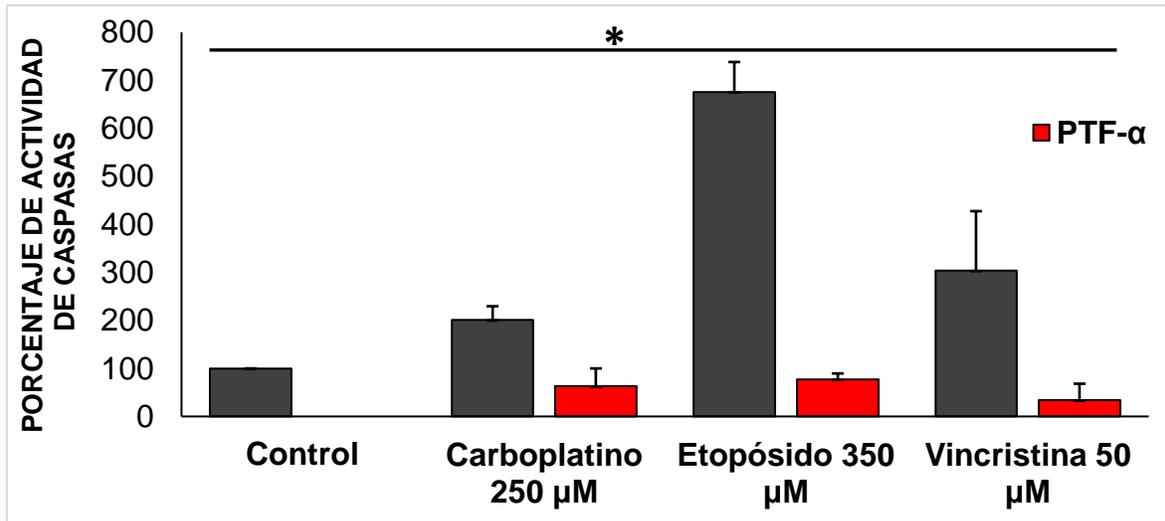


Figura 6. Actividad de caspasas 3/7 en respuesta al tratamiento con fármacos antineoplásicos. Las células HeLa se incubaron con los fármacos antineoplásicos a la dosis IC₅₀ durante 24 h. En otra serie de experimentos las células se trataron con Pifitrina-α (10 µM) 2 h antes del tratamiento con fármacos, incubando durante 24 h. Se evaluó la actividad de las caspasas 3/7 como se indica en la sección de metodología. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con duplicado ± DE. El asterisco (*) indica un valor de P≤0.05 estadísticamente significativo.

Por otro lado, para determinar si el efecto citotóxico y la inducción de muerte celular por apoptosis provocado por los fármacos antineoplásicos está regulada por la proteína p53, se evaluó la expresión de esta mediante western blot.

Encontramos que no hubo cambios en la expresión de p53 con ninguno de los fármacos antineoplásicos en comparación con las células control sin tratamiento (Figura 7). Como se esperaba, las células C33A que se utilizaron como control positivo, ya que sobreexpresan p53 debido a que estas células tienen una mutación en la arginina 273, impidiendo su degradación por MDM2.

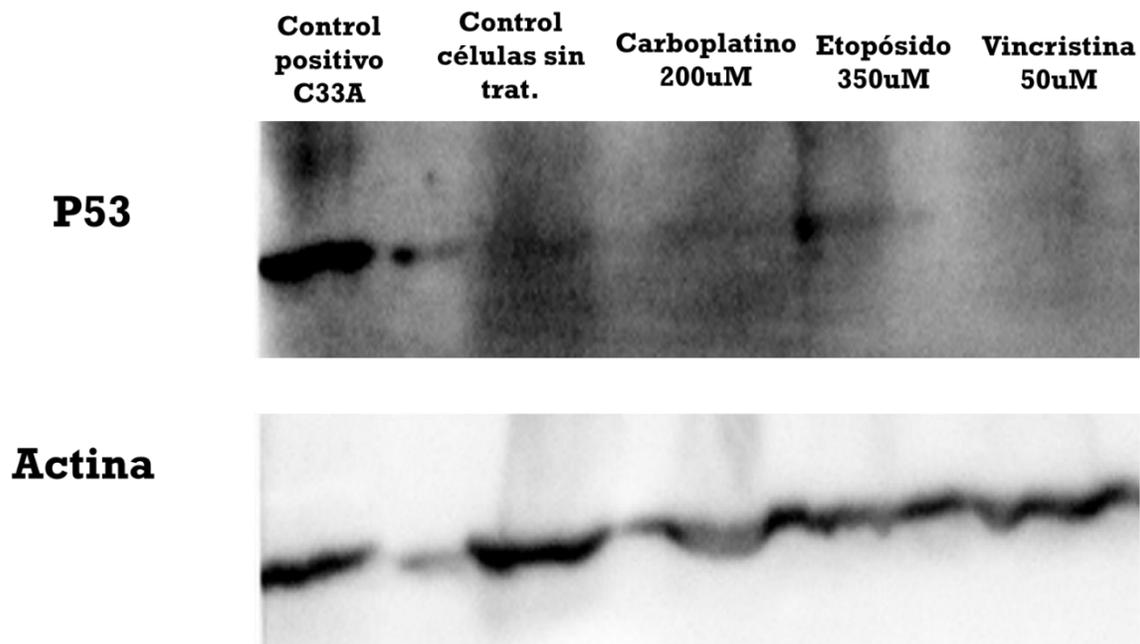


Figura 7. analisis de expresión de p53 mediante western blot en células HeLa tratadas con los fármacos antineoplásicos. El ensayo se realizó 48 h después del tratamiento con los fármacos antineoplásicos como se indica en la sección de metodología. Se utilizó actina como control de carga, y la línea celular C33A (p53⁺) como control positivo. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo evaluamos la capacidad que tienen los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina de provocar un efecto citotóxico en células

HeLa, un modelo de cáncer cervicouterino, y si este efecto se debe a la inducción de apoptosis regulada por p53.

Estos fármacos antineoplásicos se eligieron debido a que se utilizan comúnmente como tratamientos de primera línea en diferentes tipos de cáncer, y se ha reportado su uso en combinación con otros fármacos en el tratamiento de CaCU, además de que cada uno de ellos tiene un mecanismo de acción distinto. A pesar de ello, si bien son fármacos que se utilizan comúnmente en la clínica, no se ha logrado esclarecer completamente su mecanismo de acción en la inducción de muerte celular.

Nuestros resultados demostraron que los tres fármacos provocan un efecto citotóxico dosis dependiente a las 48 h de tratamiento. La Vincristina fue el fármaco más eficaz, debido a que se requiere una menor concentración de esta para disminuir la viabilidad celular al 50% (IC_{50} 50 μ M), en comparación con el Carboplatino y Etopósido (IC_{50} 250 μ M y 350 μ M, respectivamente). Estos hallazgos son importantes debido a que estos fármacos podrían ser propuestos como posibles alternativas de tratamiento para el CaCU, que emplea Cisplatino como fármaco de primera línea, especialmente la Vincristina, que demostró ser el más eficiente.

Otros autores han reportado que la citotoxicidad de distintos fármacos en células Hela se alcanza con dosis diferentes a las que presentamos en este estudio. Tang y cols. (2018), reportan que el Carboplatino 134 μ M provoca un efecto citotóxico del 90% a las 48 h de tratamiento. Otro estudio menciona que 1 mM de Carboplatino reduce un 60% la viabilidad celular a las 24 h (Choi y cols. 2018).

Estas diferencias podrían deberse a las dosis evaluadas, a la variabilidad en los tiempos de incubación, y al sistema de detección de viabilidad.

En cuanto al Etopósido, Lee y cols. (2010), encontraron que este compuesto a una concentración de 17 μM durante 24 h de tratamiento disminuyó la viabilidad celular únicamente un 20% en células HeLa. Mientras que Oh y cols. (2019), encontraron resultados similares a los anteriores utilizando 100 μM de Etopósido durante 24 h. En ambos reportes se mostró un menor efecto citotóxico comparado con nuestros resultados, probablemente debido a que utilizamos una mayor concentración y un tiempo de tratamiento más prolongado. Respecto a Vincristina, Zdioruk y cols. (2020), reportan una IC_{50} de 10.5 μM a las 72 h, que es una dosis menor a la que nosotros empleamos, pero con un tiempo de incubación mayor.

El efecto citotóxico observado puede ser generado a través de diferentes vías en la célula; una de ellas es la inducción de la muerte celular por apoptosis; y en el presente estudio se emplearon dos técnicas distintas para medirla: la actividad de caspasas ejecutoras 3/7, responsables de iniciar la cascada de fragmentación de todos los componentes de la célula (apoptosis intermedia medida a las 24 h); y la escalera de ADN, que permite visualizar el ADN fragmentado a través de geles de electroforesis (apoptosis tardía, medida a las 48 h).

Nuestros resultados demostraron que la Vincristina fue el principal inductor de la fragmentación de ADN, respecto a los demás fármacos; en cambio, el Etopósido activó principalmente a las caspasas 3/7. Esto podría deberse a la participación de otros componentes no evaluados como el caso de AIF o EndoG, los cuales son inductores de apoptosis independientes a caspasas, donde podrían estar desempeñando una mayor actividad en el tratamiento con Vincristina, respecto a

las caspasas 3/7. Por su parte, el Carboplatino, aunque incrementó la actividad de caspasas 3/7, mostró una baja fragmentación del ADN.

Como ya se mencionó, en nuestro modelo de estudio, la Vincristina además de promover la fragmentación de ADN, también incrementó la actividad de las caspasas 3/7 en comparación con el control sin tratamiento. De manera similar a nuestros resultados, dos estudios mostraron también un incremento en la actividad de la caspasa 3 inducido por Vincristina en células HeLa (Groth-Pedersen et al, 2007; Singh et al, 2014); además de observar por otras metodologías la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis. Sin bien es cierto que la inhibición de la progresión de la mitosis provocada por la desestabilización de toda la red de microtúbulos causada por Vincristina induce en mayor medida muerte celular por catástrofe mitótica (Zdioruk et al, 2020), nosotros encontramos que alternativamente o en conjunto, la célula induce otras vías de muerte celular como en este caso la apoptosis, pero el mecanismo por el cual lo hace no está bien definido.

Para el caso del Etopósido, existe un claro efecto tanto en la fragmentación del ADN como en la activación de las caspasas 3/7 (aumentó 7 veces con relación al control). Estos resultados coinciden con lo reportado por Lee y cols. (2010), quienes encontraron que el Etopósido induce apoptosis en HeLa, identificada mediante western blot y microscopía confocal; aunque en el ensayo de caspasa 3 por fluorimetría, no se demostró un aumento significativo en su actividad, probablemente por la baja dosis utilizada (17 μ M). Otros autores han reportado diferencias en los mecanismos de activación de respuesta de daño al ADN cuando se utiliza Etopósido en altas y bajas concentraciones (Jamil et al, 2015).

Con el Carboplatino, aunque incrementó la actividad de caspasas 3/7 (2 veces con relación al control) tuvo una baja inducción de la fragmentación del ADN. En comparación con nuestros resultados, Tang (2018) reportó la inducción de apoptosis en el 35% de las células HeLa tratadas con 134 μ M de Carboplatino a las 24 h, evaluada mediante citometría de flujo. Por otro lado, en líneas celulares de cáncer de mama y de ovario MCF-7, y OVCAR o SK-OV-3 respectivamente, se incrementa significativamente la apoptosis cuando se tratan las células con Carboplatino (Aborehab et al, 2020).

En el presente estudio demostramos que los fármacos antineoplásicos Vincristina, Etopósido y Carboplatino inducen apoptosis en las células HeLa a través de la activación de caspasas 3/7; sin embargo, no evaluamos la actividad de otras caspasas (8 o 9, indicadoras de activación de la vía extrínseca e intrínseca, respectivamente), que también podrían desempeñar un papel importante en el efecto citotóxico observado. Alternativamente, otros tipos de muerte como autofagia podrían activarse con estos fármacos (Aranda, 2016).

Para identificar la posible participación de p53 en la apoptosis inducida por los fármacos estudiados utilizamos un inhibidor de la actividad transcripcional de p53, Pifitrina alfa (PFT- α), y determinamos su participación en la activación de las caspasas 3/7, además se realizaron ensayos de western blot para detectar cambios en la expresión de la proteína p53.

Los resultados de actividad de caspasas 3/7 sugieren que la inducción de la apoptosis en células HeLa por el tratamiento con los tres fármacos antineoplásicos pareciera ser dependiente de p53, debido a que 10 μ M de PFT- α suprime parcialmente este proceso, especialmente con Etopósido. Por otro lado, a pesar

del bajo porcentaje de activación de caspasas en células tratadas con Carboplatino, el 69% de esta actividad fue inhibida por PFT- α . En el caso de Vincristina y Etopósido el resultado fue más notorio, donde PFT- α inhibió las caspasas 3/7 88.8% y 88.6%, respectivamente.

A pesar de los resultados anteriores, los ensayos de western blot no mostraron ningún cambio significativo en los niveles de expresión de la proteína p53 en relación con las células control; lo que sugiere que p53 no forma parte del rol central en la inducción de apoptosis con estos fármacos. Existe evidencia reportada que PFT- α podría inhibir otros elementos involucrados en la apoptosis, tales como la actividad de las caspasas 3 y 9 a través del bloqueo en la fosforilación de Rb en células Saos-2 (Zhu et al, 2020). Esto explicaría en parte nuestros resultados con PFT- α , y la falta de visualización de p53 en los ensayos de western blot.

Con el fármaco Carboplatino, no hay evidencia reportada del uso de PFT- α en la línea celular HeLa; sin embargo, se ha descrito la participación de p53 en líneas celulares de CaMa MCF-7, y cáncer de ovario OVCAR y SK-OV-3 (Aborehab et al, 2020). La evidencia de la expresión de p53 en la línea celular HeLa es escasa, esto probablemente se deba a su degradación constante por la oncoproteína E6 del VPH18⁺ (Aborehab & Osama, 2019). Por otro lado, en el caso de Etopósido, Lee y colaboradores (2010) reportaron el incremento en la actividad de caspasa 3, asociado con el aumento de expresión de la proteína fosforilada en la serina 15 de p53 con 10 μ g/ml de Etopósido en células HeLa, permitiendo discernir la inducción de apoptosis dependiente de p53. Con relación a la Vincristina, hasta el momento no se han reportado estudios que evalúen a p53 en células HeLa

tratadas con este fármaco. Sin embargo, se ha descrito que induce la activación de la vía intrínseca de la apoptosis en dichas células, aunque no se evaluó a p53 en este estudio se encontró un incremento en la proteína Bax, que es dependiente de p53, por lo que es posible que esta última participe en la inducción de apoptosis (Groth-Pedersen et al, 2007). Cabe señalar que no se descarta la posibilidad de un mecanismo independiente de p53; esto coincide con el resultado obtenido en este estudio, donde se confirma la inhibición de la activación de caspasas posterior al tratamiento con PFT- α en la respuesta a Vincristina.

Nuestros resultados sugieren a la Vincristina como una posible alternativa para el tratamiento del CaCU, en combinación con otros fármacos antineoplásicos, debido a la baja concentración requerida para provocar un efecto citotóxico, aunado a la respuesta apoptótica que induce, y la posible participación de p53 en este proceso.

9. CONCLUSIONES

Derivado de la presente investigación se concluye que:

1. Los fármacos antineoplásicos Carboplatino, Etopósido y Vincristina provocan un efecto citotóxico dosis dependiente en células tumorales de CaCU HeLa VPH18⁺.
2. La acción citotóxica de estos fármacos se debe en parte a la inducción de apoptosis sin embargo otras vías de muerte celular podrían estar involucradas por lo que se requiere evaluar a estas
3. La actividad de las caspasas 3/7 pareciera ser dependiente a p53, sin embargo, otros procesos podrían estar activándolas.

4. Bajo las condiciones experimentales empleadas no se logró visualizar a p53 mediante western blot, lo que descartaría su participación en la apoptosis inducida por estos fármacos.

10. PERSPECTIVAS

Derivado de esta investigación, se plantean las siguientes perspectivas:

- Continuar los ensayos en diferentes periodos de incubación para identificar la expresión de la proteína p53 mediante Western blot
- Evaluar el efecto citotóxico sinérgico de estos compuestos
- Explorar otras vías de muerte celular como autofagia
- Evaluar la expresión de genes pro-apoptóticos (Bax, PUMA, Noxa, etc.) y anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL), así como genes involucrados en autofagia (LC3, Beclina-1, ATGs), y su expresión a nivel de proteínas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aborehab, N. M., Elnagar, M. R., & Waly, N. E. (2020). Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*.
- Aborehab, N.M., Osama, N. Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells. *Cancer Cell Int* 19, 154 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0868-0>
- American Cancer Society .(2021). “¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)?”. ACS. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>

- Angioli, R., Plotti, F., Luvero, D. et al. Feasibility and safety of carboplatin plus paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a pilot study. *Tumor Biol.* 35, 2741–2746 (2014).
- Aranda D. Activación de muerte celular por apoptosis y/o autofagia en respuesta a fármacos antineoplásicos en líneas celulares de CaCU Y CaMa (2016) [Tesis de licenciatura no publicada] Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina (Kaunas)*. 2019 Jul 17;55(7):384
- Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Jul;17(7):395-417.
- Choi Y, Chang JE, Jheon S, Han SJ, Kim JK. Enhanced production of reactive oxygen species in HeLa cells under concurrent low-dose carboplatin and Photofrin® photodynamic therapy. *Oncol Rep.* 2018 Jul;40(1):339-345. doi: 10.3892/or.2018.6415. Epub 2018 May 3. PMID: 29749554.
- Costas M, Rubio M. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Medicina (Buenos Aires)*. 2017; 77: 314-320
- Della Fera AN, Warburton A, Coursey TL, Khurana S, McBride AA. Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*. 2021 Feb 20;13(2):321. doi: 10.3390/v13020321. PMID: 33672465; PMCID: PMC7923415.

- de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012; 13:607–615.
- Global Cancer Observatory. (2020). Globocan. <https://gco.iarc.fr/>
- Groth-Pedersen L, Ostensfeld M, Hoyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. Vincristine Induces Dramatic Lysosomal Changes and Sensitizes Cancer Cells to Lysosome-Destabilizing Siramesine. *Cancer Research.* 2007; (67) 5: 2217-2225
- Guo J, Tang Q, Wang Q, Sun W, Pu Z, Wang J, Bao Y. Pifithrin- α enhancing anticancer effect of topotecan on p53-expressing cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* 2019 Feb 1;128:61-72.
- Hill EK. Updates in Cervical Cancer Treatment. *Clin Obstet Gynecol.* 2020 Mar;63(1):3-11.
- Johnson C, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Seminars in Oncology Nursing* 2019; 35: 166-174
- Kamada R, Nomura T, Anderson CW, Sakaguchi K. Cancer-associated p53 tetramerization domain mutants: quantitative analysis reveals a low threshold for tumor suppressor inactivation. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7;286(1):252-8. doi: 10.1074/jbc.M110.174698. Epub 2010 Oct 26. PMID: 20978130; PMCID: PMC301
- Knipe, DM., Howley, PM. *Fields virology.* 6th. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013.

- Kumar L, Harish P, Prabhat S et al. Chemotherapy and Targeted Therapy in the Management of Cervical Cancer, *Current Problems in Cancer* 2018
- Kwok, K. K., Vincent, E. C., & Gibson, J. N. (2017). Antineoplastic Drugs. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, 530–562.
- Lagunas Martínez, Alfredo, sustentante Participación de P53 en la apoptosis mediada por CD95 y MG132 en queratinocitos humanos inmortalizados con E6 del VPH16 / 2017
- Lee SB, Tong SY, Kim JJ, Um SJ, Park JS. Caspase-independent autophagic cytotoxicity in etoposide-treated CaSki cervical carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 2007; (10):713-20.
- Lee WH, Choi JS, Kim HY, Park JH, Park BD, Cho SJ, Lee SK, Surh YJ. Potentiation of etoposide-induced apoptosis in HeLa cells by co-treatment with KG-135, a quality-controlled standardized ginsenoside formulation. *Cancer Lett.* 2010 Aug 1;294(1):74-81. doi: 10.1016/j.canlet.2010.01.024. Epub 2010 Mar 11. PMID: 20226587.
- Liu Y, Tavana O, Gu W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *J Mol Cell Biol.* 2019 Jul 19;11(7):564-577.
- Li GZ, Hu YH, Li DY, Zhang Y, Guo HL, Li YM, Chen F, Xu J. Vincristine-induced peripheral neuropathy: A mini-review. *Neurotoxicology.* 2020 Dec;81:161-171. doi: 10.1016/j.neuro.2020.10.004. Epub 2020 Oct 11.
- Li ZH, Zhu YJ, Chao LS, Li XT. [Wild-type p53 stimulates vincristine-induced apoptosis]. *Yao Xue Xue Bao.* 1997 Aug;32(8):565-8. Chinese.

- Majtnerová, P., Roušar, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 45, 1469–1478 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
- Mantovani F, Banks L. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001; 20: 7874-7887
- Mosweu M, Motadi L, Moela P. Investigating the Effects of RBBP6 Gene Expression on Telomerase Activity in Cervical Cancer Cells. *Cancer Manag Res*. 2020 Oct 29;12:10725-10734.
- Oh BK, Choi Y, Bae J, Lee WM, Hoh JK, Choi JS. Increased amounts and stability of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) following DNA damage induced by etoposide. *PLoS One*. 2019 Nov 22;14(11):e0225302. doi: 10.1371/journal.pone.0225302. PMID: 31756221; PMCID: PMC6874320.
- Ranjan A, Iwakuma T. Non-Canonical Cell Death Induced by p53. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 9;17(12):2068. doi: 10.3390/ijms17122068. PMID: 27941671; PMCID: PMC5187868.
- Singh, Sandeep, Upadhyay, Ankur Kumar, Ajay, Amrendra Kumar and Bhat, Manoj Kumar(2007), p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: A novel target of p53 in apoptosis, *FEBS Letters*, 581, doi: 10.1016/j.febslet.2006.12.035
- Singh A, Zapata MC, Choi YS, Yoon SO. GSI promotes vincristine-induced apoptosis by enhancing multi-polar spindle formation. *Cell Cycle*.

2014;13(1):157-66. doi: 10.4161/cc.26951. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24200971; PMCID: PMC3925728.

- Sung CK, Yim H. Roles of SALL2 in tumorigenesis. Arch Pharm Res. 2017 Feb;40(2):146-151.
- Sun Y, Zhang J, Peng ZL. Beclin1 induces autophagy and its potential contributions to sensitizes SiHa cells to carboplatin therapy. Int J Gynecol Cancer. 2009 May;19(4):772-6.
- Tan, Y. S., Mhoumadi, Y., & Verma, C. S. (2019). Roles of computational modelling in understanding p53 structure, biology, and its therapeutic targeting. Journal of molecular cell biology, 11(4), 306–316.
- Tang ZY, Sheng MJ, Qi YX, Wang LY, He DY. Metformin enhances inhibitive effects of carboplatin on HeLa cell proliferation and increases sensitivity to carboplatin by activating mitochondrial associated apoptosis signaling pathway. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2018 Dec;22(23):8104-8112. DOI: 10.26355/eurev_201812_16501. PMID: 30556847.
- Tsikouras P, Zervoudis S, Manav B et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. JBUON 2016; 21: 320-325
- Wang Y, Zhang H. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. Autophagy: Biology and Diseases. Advances in experimental Medicine and Biology 2019; 1206:3:67-83

- Winer RL, Hughes JP, Feng Q, O'Reilly S, Kiviat NB, Holmes KK, Koutsky LA. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 2006; 354:2645–2654.
- Xie Y, Kang R, Tang D. Role of the Beclin 1 Network in the Cross-Regulation Between Autophagy and Apoptosis. *Molecular Mechanisms* 2016; 8:76-86
- Zdioruk M, Want A, Mietelska-Porowska A, Laskowska-Kaszub K, Wojsiat J, Klejman A, Użarowska E, Koza P, Olejniczak S, Pikul S, Konopka W, Golab J, Wojda U. A New Inhibitor of Tubulin Polymerization Kills Multiple Cancer Cell Types and Reveals p21-Mediated Mechanism Determining Cell Death after Mitotic Catastrophe. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 4;12(8):2161. doi: 10.3390/cancers12082161. PMID: 32759730; PMCID: PMC7463620.
- Zhang W, Gou P, Dupret JM, Chomienne C, Rodrigues-Lima F. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Transl Oncol*. 2021 Oct;14(10):101169. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101169. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34243013; PMCID: PMC8273223.
- Zhu, J., Singh, M., Selivanova, G., & Peugot, S. (2020). Pifithrin- α alters p53 post-translational modifications pattern and differentially inhibits p53 target genes. *Scientific reports*, 10(1), 1049.



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 02 de mayo 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: **ALAN ALEXIS ROJAS TOLEDO**, con el título del trabajo: **Inducción de muerte celular por apoptosis a través de p53 en respuesta a fármacos antineoplásicos en células de 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: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE _____

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE _____

VOCAL: DRA. CARLA OLBIA CONTRERAS OCHOA _____

SUPLENTE: DR. ALEXANDRE CARDOSO TAKETA _____

SUPLENTE: M. EN C. EDITH ALANÍS ROJAS _____

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

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2023-05-02 21:31:35 | Firmante

tsOGw1T5nryXHXreT+ufXdySaxEoPGP1S3INxUl1xlg57rKnigXCkhXLgcpVxCjZYFjZNYifMU6YIW4IB5hnPMBY6oB2mWEg4dNVM5j3leLvA9YwBrVqJgxMYnQxa7j6i4HVhwbuo
uMb1cLbhl+G4lsBmV5iREZg1/6ZFsPnK6L1HxCwuidT88nTfr7X9SDlbtzvVQWOZuv2pPlsR7+0xfsPYY5dglZkezfHqLFk2H7sLJgeB/oBB52R7Xbs6HXCRkqQyYRzOxWymf/LW
m7b7tyRB/PWm0DXFTUskVPHhd64XtSZLv2X3aNEaDu/JwsyrXuqv6KC29mdmdJkwZXQg==

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2023-05-05 13:38:32 | Firmante

innemPAagsUKd4ArTHkY8GFQqWqGCTaq4mc0acycSpipSe3c47tDoBtx79nhgfcOTJTfQ9P/CLBjp9Sk0fFeQC9L/8J+krdWvkQNbdrfsdLja6ncAR96T/HGMjl7xKnHC/ztLJO4OFr
mZktadtYJfcWoAobXhbxCqmsoiOw7f+OEaVt9M1xrgMZIKW4dwzaBAVT4W5NzL46em0vG1et7esVOFsrwxqebE2lkUllW9MxURxezs+ZhgXjUSoPZk8JHTI/5RV5HP2Cw0Mhixm
z/kmYtZ2BVj3ecHq1UPzxDAGsJXW5Mes0aYst0eqdrfrrmt0QMCN+gao6XRfs8DbyleA==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2023-05-17 19:56:59 | Firmante

sCu9Y+CSknBReLksOsmbgR7dm+6Qux4pRefn7pZqOAUrwYpUcD9zbGwVSEnz/51tqL1+AoUSNNhsqtK6PzefZb/7GPIWruGCAzTmvh3g10MaubLZ7xS9mRIHsd4ZF2xFoll
GgN2nd4tMNIWkptEjip0I5WBAOeQw9jKyl/F897JXu2Nzzcu9HrH5N9eGbGhZ9wcU9HBLokOthSrC7qVBh8DTLkosal1tsd4Mca221fjifTkbnDs+5vYRakryOzMEBLalGMny9r+UK
F2sziEt9CnbwYhXcQ/LGBtj4s01RiAPS/VjcGloV2t5mRtUg1QFzNiEb665dz23i7q81ZFw==

CARLA OLBIA CONTRERAS OCHOA | Fecha:2023-06-14 14:09:17 | Firmante

ZuhfekORcFhzq92e0gMEg3e/3VQMAmc1Cn9FrXoyTke4TsmROPCX3qdlwanPuMJgnLXONBjqeZ5YA/U9abTLEAJIHi965aQB2M7Y+YyZzkFuzYG6fc+1HBNWnsN6pV8yCqZ77
oj1gVaA0+hFRMup3scTeMws7O2er062q/+hoqQwKdNFXmU5OY96Ye1kk6oHI5eJsD6W5i/SUGdX7AL8phHHcgnHaZl4kVUqhmMwWPPYIEKEuD6E/p/aaYMJiNf2TfyPZVK7tqH
Ri/OGdzlep7+/oLGW4nCuKRejC+Hs3IkCq1j3Xl3lou86e12YWGKehXM2sZn9jQ9G8aqTHWw==

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



osNrmXedv

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RE1BOhgBWrtz9po8H7T7SsRU34ufH1fQ>



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

EDITH ALANIS ROJAS | Fecha:2023-06-14 23:11:09 | Firmante

sNiqK4TK9JlanLfWO/vLu0gOx1OC9HXATBgukvuYx6FtPubF88OTISPHRCD+P2UYGkijspjTNBmkLF/3pEa4QbnlXBzGfU3UqorptQkxLQXw3BIIDPTujqYJvCyonoKUXca599R4LmXc+A2EaEIOjZ4QUYV+eirq2TVCGP29niz6zpPQ7hyjhsr27CM2u76Y+9L0O1Mb1sg1ms5lpX9rCtoSr/e0XXYIKr17NcnsW13lg49iGeU1wBQMTGUPfOfuTVD+A7yrKBo5ezP5wIoxhA4U1YPm745COioQt/z6OzfvCStIAchlVWjnAkSq4zmdZHGhO6oS4FiJlBETqFL4Q==

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



[ebx7gJqHP](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/A5Z7iMTooGMK48Qsno3YN1jmyHVODg3L>

