



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Instituto Nacional
de Salud Pública

Instituto Nacional de Salud Pública
Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas

Inhibición de la actividad de la proteína Top2 α y su efecto en la apoptosis por paclitaxel en la línea celular de CaMa, SKBR3.

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
HILDA XOCHILT VARA SEDEÑO**

**CODIRECTORES:
DR. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ
DRA. JISELA DIMAS GONZÁLEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2024

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Alfredo Lagunas Martínez por darme la oportunidad de trabajar con él y por su confianza, le agradezco profundamente su paciencia, sus consejos y sobre todo su apoyo. Las enseñanzas que me dio las guarde siempre con mucho cariño.

A la Dra. Jisela, por haberme apoyado, por todo lo que me enseñó en el proceso y su paciencia, su apoyo fue esencial en el proyecto.

A todos los investigadoras e investigadores del CISEI que me facilitaron sus equipos en múltiples ocasiones.

A mis compañeras del laboratorio, a Luz, Andy, Edith, Xime, que siempre me apoyaron incondicionalmente, me guiaron, me ensañaron y sobre todo por haberme ofrecido su amistad sincera que siempre valorare con mucho amor.

A mi amiga Fernanda Peña, gracias por siempre estar para mí, por siempre escucharme, valoro y aprecio muchísimo tu amistad.

A mis amigas y amigos que me acompañaron a lo largo de mi carrera, a Katia Gama, la mitad de la carrera estuvimos juntas apoyándonos y te agradezco por tu sincero apoyo y amistad.

Con profunda gratitud y amor agradezco a mis padres, por su gran apoyo y sacrificio, este logro solo fue posible gracias ellos y a su inmenso amor. Le agradezco profundamente mi mamá que siempre me apoyo en todo, confió y siempre estuvo para mí, ella es mi refugio, mi lugar seguro y mi mayor fuente de inspiración y es la persona a la que más admiro.

A mi papá por toda la sabiduría que me ha compartido, gracias por ser mi ejemplo de perseverancia y dedicación, tus enseñanzas me impulsan a seguir adelante, te agradezco con mucho cariño todo tu esfuerzo.

A mi hermana, no conozco el mundo sin caminar de su mano, es mi mejor amiga, mi alma gemela y la otra mitad de mi corazón, gracias por siempre darme esa paz que necesitaba.

A mi hermano por siempre escucharme, por las muchas veces que me dio su apoyo, las cosas bonitas de su ser me inspiran en mi vida.

A Dios por siempre iluminar mi mente y darme la fortaleza para siempre seguir adelante.

Especiales agradecimientos a mi amor más sincero, a mi compañerito, quien siempre me acompañó en mis periodos de estudio.

Reconozco y me agradezco a mí misma el trabajo que realice en este proyecto, la dedicación y todo el tiempo que le destine.

Dedicatoria

A mis padres con mucho cariño y amor les dedico mi esfuerzo y mi trabajo, todos mis logros siempre serán posibles gracias a ustedes, son mi bendición más grande, los admiro y los amo con todo mi ser.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	iii
1 Resumen.....	3
2 Introducción.....	1
3 Marco teórico	2
3.1 Principales causas de muerte en mujeres a nivel nacional.....	2
3.2 Cáncer	3
3.2.1 CaMa	4
3.3 Epidemiología del CaMa	4
3.4 Estadios del CaMa	5
3.4.1 Estadio 0.....	5
3.4.2 Estadio I.....	5
3.4.3 Estadio II.....	6
3.4.4 Estadio III.....	6
3.4.5 Estadio IV	6
3.5 Clasificación histopatológica del CaMa	7
3.5.1 Receptores hormonales (RE y RP)	7
3.5.2 Triple negativo (TN)	7
3.5.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (Her2).....	8
3.6 Loci <i>HER2</i>	8
3.7 <i>TOP2α</i>	10
3.7.1 <i>TOP2α</i> y su relación en el CaMa.....	11
3.8 Tratamiento del subtipo Her2+	12
3.9 Quimioterapia.....	13
3.10 Resveratrol.....	14
4 Antecedentes específicos.....	15
5 Mapa conceptual.....	16
6 Justificación.....	17
7 Planteamiento del problema.....	17
8 Pregunta de investigación	18
9 Hipótesis.	18

10	Objetivos	18
10.1	Objetivo general	18
10.2	Objetivos específicos	18
11	Materiales y métodos	19
11.1	Diagrama general.....	19
11.2	Cultivo de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3.....	20
11.3	Análisis de la amplificación de <i>TOP2α</i> a través de qPCR.....	20
11.4	Detección de la proteína Top2α	21
11.5	Evaluación de viabilidad celular	22
11.6	Evaluación de apoptosis	23
11.7	Análisis estadísticos	23
12	Resultados	23
12.1	Ensayo de número de copias <i>TOP2α</i> a través de qPCR	23
12.2	Detección de la proteína Top2α	25
12.3	Evaluación de la viabilidad celular.....	26
12.4	Evaluación de apoptosis	30
13	Discusión	31
14	Conclusión	34
15	Perspectivas.....	34
16	Referencias bibliográficas	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la incidencia de los tipos de cáncer más comunes en mujeres de todas las edades registrados en el 2020.	2
Figura 2. Distribución de la amplificación genética en el cromosoma 17q12-q21 en CaMa Her2+	9
Figura 3. Mecanismo catalítico de la Top2 α	11
Figura 4. Mecanismo de acción del resveratrol en la inhibición de Top2 α	14
Figura 5. La línea SKBR3 presenta amplificación del gen TOP2 α	24
Figura 6. Expresión de la proteína Top2 α en distintas líneas celulares	25
Figura 7. Efecto de paclitaxel en la viabilidad celular de las células SKBR3.....	26
Figura 8. Efecto de resveratrol en la viabilidad celular de las células SKBR3.....	27
Figura 9. Efecto del tratamiento combinado de los fármacos paclitaxel más resveratrol en la viabilidad celular de las células SKBR3 tratadas durante 48 horas.....	28
Figura 10. Efecto de paclitaxel en la viabilidad celular de células MCF7.....	29
Figura 11. Efecto de resveratrol en la viabilidad celular de células MCF7.....	29
Figura 12. Actividad de las caspasas 3/7 de células SKBR3.....	30

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADP Adenosindifosfato

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ATP Adenosín trifosfato

BRCA1 Breast cancer gen 1 (gen de cáncer de seno 1)

BRCA2 Breast cancer gen 2 (gen de cáncer de seno 2)

CaMa Cáncer de mama

CMSP Células mononucleares de sangre periférica

Ct Cycle threshold (umbral de ciclos)

DMSO Dimetilsulfóxido

Her2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (proteína)

HER2 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (gen)

kDa Kilodalton

Mb Megabase

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativo en tiempo real

RNasa P Ribonucleasa P

Top2 α Topoisomerasa 2 alfa (proteína)

TOP2 α Topoisomerasa 2 alfa (gen)

RIPA Radioimmunoprecipitation assay buffer (Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación)

1 Resumen

El cáncer de mama (CaMa) se clasifica por inmunohistoquímica en tres subtipos: Receptores hormonales positivos (receptor de estrógeno, RE, y receptor de progesterona, RP), receptor del factor de crecimiento epidérmico Her2+ y triple negativo (TN). SKBR3 es una línea celular de CaMa humano generada a partir de la biopsia de un paciente con el subtipo Her2+ que sobreexpresa a la proteína Her2. Se ha determinado que en alrededor del 15% del CaMa se amplifica, es decir se generan más copias del gen *HER2* el cual se localiza en el cromosoma 17q (Chr17q). Además de *HER2*, se amplifican otros 11 genes como *MED1*, *RAR α* y *TOP2 α* ; este último ubicado a 2 Mb de *HER2*. Se ha reportado que en el 71% de los casos el gen *TOP2 α* se encuentra amplificado acompañado de una sobreexpresión de la proteína mientras que en el 29% de los casos el gen se encuentra amplificado, pero sin sobreexpresión de la proteína debido a que se genera una proteína truncada. *TOP2 α* es una enzima blanco de las antraciclinas cuando este gen se encuentra amplificado y hay sobreexpresión de la proteína. Otro compuesto que puede unirse a la Top2 α es el resveratrol, el que al unirse al dominio ATPasa de esta inhibe su actividad catalítica. Por otro lado, paclitaxel es un quimioterapéutico ampliamente utilizado en el tratamiento del CaMa, el cual ha sido clasificado como un agente antitumoral que inhibe la polimerización de la tubulina evitando que se forme el huso mitótico y por tanto inhibe la división celular en la fase G2/M.

En este proyecto de investigación, para demostrar que *TOP2 α* , similar a *HER2* también se amplifica, se evaluó el número de copias de *TOP2 α* a nivel de ADN y de proteína de la línea celular SKBR3, a través de PCR cuantitativo en tiempo real (qpcr) y por Western Blot. La hipótesis planteada es que la inhibición de la actividad de la proteína Top2 α por resveratrol induce la apoptosis de las células SKBR3 tratada con paclitaxel.

Los resultados del presente estudio mostraron que la línea celular de CaMa SKBR3 amplifica al gen *TOP2 α* y que la proteína se sobreexpresa. Además, tanto paclitaxel como resveratrol tienen un efecto inhibitorio tanto en la línea celular SKBR3 (Her2+) y MCF7 (RE y RP). Sin embargo, en combinación no presentaron un efecto aditivo al menos para la línea celular SKBR3. Además, se evaluó si resveratrol y paclitaxel inducen muerte celular por apoptosis en la línea celular SKBR3. Se observó que solo paclitaxel indujo actividad residual de las caspasas 3/7 en las células SKBR3.

2 Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce al CaMa como el tipo de cáncer más común en el mundo, con más de 2,2 millones de casos en el año 2020. (Organización Mundial de la Salud, 2023).

En México, el CaMa se clasifica por inmunohistoquímica en tres subtipos: positivo a receptores hormonales (receptor de estrógeno, RE, y receptor de progesterona, RP), positivo a receptor Her2+ y triple negativo (TN) (Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario, 2023). En investigación se han utilizado líneas celulares representativas de estos subtipos, como MCF-7 (RE y RP), SKBR3 (Her2+) y MDA-MB-231 (TN).

El gen *TOP2α*, el que codifica para una topoisomerasa, se encuentra en el cromosoma 17, cercano al oncogén *HER2* (Järvinen & Liu, 2003). El CaMA subtipo Her2+ representa del 15% al 30% del total de los casos de CaMa (Wang, *et al.*, 2008). La importancia clínica de Top2α radica en que es un blanco molecular de varios fármacos anticancerígenos denominados inhibidores de topoisomerasa (Champoux, 2001).

Por otro lado, el resveratrol es un compuesto de origen natural proveniente de varias fuentes vegetales, el cual tiene diversos efectos como cardioprotector, neuroprotector, antiinflamatorio, de los cuales destaca su función como un potente inhibidor de Top2α al prevenir la dimerización del dominio ATPasa, deteniendo así su actividad catalítica (Leung, *et al.*, 2019).

Por su parte, paclitaxel es un compuesto derivado de fuentes naturales, sin embargo, actualmente se obtiene mediante síntesis química (Centelles & Ródenas, 2010). Paclitaxel es un fármaco quimioterapéutico el cual inhibe la mitosis celular porque impide la despolimerización de la tubulina, esencial para formar el huso mitótico requerido en la división celular (Leung, *et al.*, 2019)

Por lo tanto, la hipótesis planteada es que la inhibición de la actividad de la proteína Top2α por resveratrol induce la apoptosis de las células SKBR3 tratada con paclitaxel.

3 Marco teórico

3.1 Principales causas de muerte en mujeres a nivel nacional

Las principales causas de muerte en mujeres en el año 2021 fueron las enfermedades del corazón, seguida de diabetes mellitus, COVID 19, tumores malignos, enfermedades cerebrovasculares, influenza, neumonía e insuficiencia renal en último lugar (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021), donde el cáncer ocupa el 4º lugar. En el año 2020, a la distribución porcentual de los 105, 963 casos de cáncer en mujeres de México, el CaMa es el principal cáncer que afectó a la población femenina con un total de 29, 929 (28.2% de los casos totales), seguido del cáncer de útero con 9, 439 casos (8.9%), cáncer de tiroides con 9,142 casos (8.6%), cáncer colorrectal con 6, 965 casos (6.6%), cáncer de cuello uterino con 5, 508 casos (5.2%), cáncer ovárico con 4, 963 casos (4.7%), cáncer de estómago con 4, 164 casos (3.9%) y 35, 853 casos que representaron el 33.8% correspondieron a otros tipos de cáncer (Global Cancer Observatory, 2020).

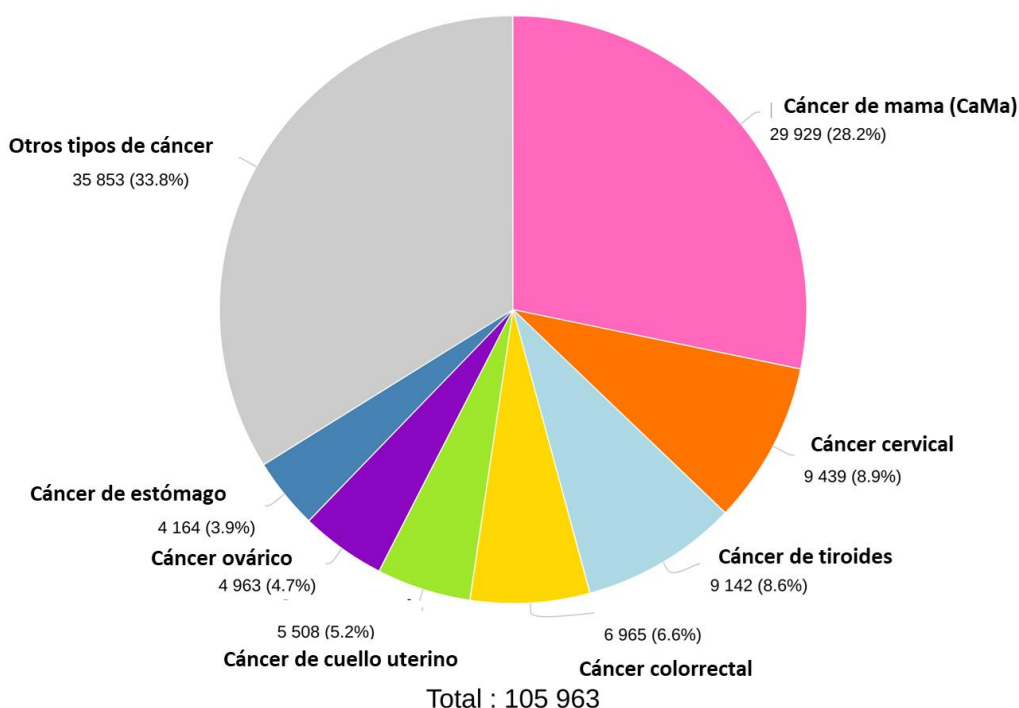


Figura 1. Distribución de la incidencia de los tipos de cáncer más comunes en mujeres de todas las edades registrados en el 2020. Modificado de "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN.

3.2 Cáncer

El cáncer es un término para referirse a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en cualquier órgano o tejido del cuerpo a partir de células anormales. Las células anormales (cancerosas) proliferan de manera descontrolada y producen tumores malignos, que potencialmente poseen la capacidad de invadir el tejido sano circundante en un proceso denominado metástasis (Organización Mundial de la Salud, 2023).

El cáncer puede iniciar en cualquier parte del cuerpo humano. En condiciones normales, las células del cuerpo proliferan de acuerdo con los estímulos externos e internos. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y nuevas células las reemplazan. En ocasiones, células anormales o con alteraciones genéticas, se multiplican generando sus propios factores de crecimiento promoviendo una proliferación descontrolada. Por esta razón estas células anormales pueden formar tumores, generando protuberancias en el tejido. Los tumores pueden ser cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos). A diferencia de los tumores benignos, los tumores cancerosos se diseminan a través de los ganglios linfáticos, invadiendo órganos o tejidos cercanos y a distancia (Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

Actualmente, se conocen más de 100 tipos de cáncer, los cuales llevan el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman. Por ejemplo, el cáncer de pulmón recibe ese nombre debido a que el tumor se ubica en el pulmón, mientras, que si se origina en el encéfalo recibe el nombre de cáncer de encéfalo. En otras ocasiones el cáncer se denomina por la estirpe celular que integra el tumor; es decir, se denomina carcinoma si se origina en las células epiteliales, que son las células que recubren las partes internas y externas del cuerpo y es el tipo de cáncer más común. Los diferentes tipos de cáncer de células sanguíneas de la médula se denominan leucemias; en contraste, los linfomas se inician en los linfocitos presentes en el sistema linfático y los sarcomas a partir de las células del hueso y del tejido conectivo (Instituto Nacional del Cancer, 2021).

A nivel general, los tipos de cáncer más comunes son los de CaMa, pulmón, colón, recto y próstata. Siendo el cáncer una de las principales causas de muerte en todo el mundo con cerca de 10 millones de defunciones en el año 2020 (Organización Mundial de la Salud, 2021).

3.2.1 CaMa

El CaMa es una enfermedad compleja y biológicamente heterogénea, es decir, sus características clínicas, así como su comportamiento biológico varía entre pacientes, por lo cual la supervivencia varía de una persona con respecto a otra (Arpino, *et al.*, 2015). El principal factor de riesgo es el sexo, puesto que las mujeres son más propensas a padecer CaMa y solo el 1% de los tumores de mama se presentan en hombres (Vich, *et al.*, 2014). Existen diferentes factores de riesgo que afectan la prevalencia del CaMa, como lo son: antecedentes familiares, tabaquismo, alcohol, la edad, amenorrea temprana, menarquía tardía, nuliparidad, obesidad, dieta rica en grasas, anticonceptivos orales, entre otros (Miles, *et al.*, 2019; Wong, *et al.*, 2017).

3.3 Epidemiología del CaMa

El CaMa es el cáncer ginecológico más común en la población femenina y con la tasa de mortalidad más alta. Más de 1,5 millones de mujeres son diagnosticadas con CaMa cada año a nivel mundial, y este número sigue en aumento (Shamsi & PirayeshIslamian, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

En 2020, a nivel mundial se diagnosticaron a 2,3 millones de mujeres con CaMa, de las cuales 685,000 fallecieron por esta enfermedad. Aproximadamente una de cada 12 mujeres enfermará de CaMa a lo largo de su vida (Organización Mundial de la Salud, 2021).

En México, durante el año 2019 se registraron 15,286 nuevos casos de CaMa en la población de 20 años en adelante. De estos, 167 correspondieron a hombres y 15,119 a mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021).

Específicamente, por tumores malignos fallecieron 97, 323 personas, de estas 7, 880 fueron por tumores malignos de mama, que corresponden al 8% del total. Por sexo, fallecieron más mujeres por CaMa (7,822 casos) que hombres (58 casos). Por edad al momento del fallecimiento, son pocas las mujeres jóvenes de 20 a 29 años que mueren por CaMa (0.64 defunciones por cada 100 mil mujeres de este grupo de edad), seguidas del grupo de 30 a 44 años con una tasa de 7 defunciones por cada 100 mil muertes por CaMa. Las tasas más altas se registran en los grupos de 45 a 59 años y de 60 años en adelante (26 y 49 defunciones de mujeres por cada 100 mil mujeres, respectivamente); es decir, que mueren

más mujeres por este padecimiento conforme envejecen (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021).

3.4 Estadios del CaMa

Para clasificar a las pacientes con CaMa se utiliza el sistema TNM de la *American Joint Committee on Cancer* (por sus siglas en inglés, AJCC), el cual consiste en evaluar el tamaño tumoral (T), la afectación ganglionar (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M). Por lo tanto, describe la extensión del tumor en el tejido mamario y potencialmente diseminado a otras partes del cuerpo (Angulo *et al.*, 2013). El CaMa presenta 5 estadios que se describirán a continuación.

3.4.1 Estadio 0

Este estadio se conoce como carcinoma *in situ*. No existe evidencia de afectación de ganglios linfáticos regionales, tampoco existe evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia (American Joint Committee on Cancer, 2010).

3.4.2 Estadio I

Este estadio es un cáncer que no ha crecido profundamente en los tejidos adyacentes. Se le denomina cáncer en estadio temprano. El estadio I se divide en dos subcategorías: IA y IB. En la subcategoría IA el tumor mide menos o igual de 20 milímetros de diámetro, sin evidencia de afectación de los ganglios linfáticos regionales y sin evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia. Para la subcategoría el estadio IB una pequeña cantidad de células cancerosas se han diseminado a los ganglios linfáticos axilares debajo del brazo y forman pequeños grupos de células cancerosas de más de 0.2 milímetros, pero de menos de 2 milímetros de tamaño. No hay evidencia de tumor en la mama o el tumor en la mama mide 20 milímetros o menos (American Society of Clinical Oncology, 2018; Giuliano, *et al.*, 2017).

3.4.3 Estadio II

El estadio II se divide en dos subcategorías: IIA y IIB. En la subcategoría IIA el cáncer presenta alguna de las siguientes características: El tumor mide 20 milímetros o menos y se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares, el tumor mide entre 20 y 50 milímetros, y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares. Mientras que en la subcategoría IIB, se presentan dos situaciones, en la primera el tumor puede medir entre 20 y 50 milímetros, y se ha diseminado entre 1 y 3 ganglios linfáticos axilares, mientras que, en la segunda situación, el tumor mide más de 50 milímetros, pero no se ha diseminado a los ganglios linfáticos axilares (American Society of Clinical Oncology, 2018; Giuliano, *et al.*, 2017).

3.4.4 Estadio III

El estadio III, se subdivide en tres subcategorías: IIIA, IIIB y IIIC. En el estadio IIIA se observan dos situaciones, en la primera el tumor puede ser de cualquier tamaño, y se ha diseminado entre 4 y 9 ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos mamaros internos; sin embargo, no se ha diseminado a otras partes del cuerpo. En la segunda situación, en la subcategoría IIIA puede existir un tumor de más de 50 milímetros que se ha diseminado a pequeñas áreas en los ganglios linfáticos. Mientras que en la subcategoría IIIB, el tumor se ha diseminado a la pared torácica, generando hinchazón o ulceración de la mama, razón por la que se ha diagnosticado como cáncer inflamatorio de mama. Es posible que se haya diseminado o no a los ganglios linfáticos mamaros internos o axilares debajo del brazo; sin embargo, no se ha diseminado a otras partes del cuerpo. En la subcategoría IIIC el tumor puede ser de cualquier tamaño, se ha diseminado a 10 o más ganglios linfáticos axilares o a los ganglios linfáticos mamaros internos u otros ganglios linfáticos debajo de la clavícula y no se han diseminado a otras partes del cuerpo (American Society of Clinical Oncology, 2018; Giuliano, *et al.*, 2017).

3.4.5 Estadio IV

En este estadio el tumor puede ser de cualquier tamaño, con la característica distintiva de que se ha diseminado a otros sitios distantes en el cuerpo, es decir, existe metástasis (American Society of Clinical Oncology, 2018; Giuliano, *et al.*, 2017).

3.5 Clasificación histopatológica del CaMa

El CaMa en México se divide con base a resultados de inmunohistoquímica en subtipos, de acuerdo a los marcadores que presentan tales como el que es positivo a receptores hormonales (receptores a estrógeno (RE) o receptores a progesterona (RP)), al receptor del factor del crecimiento epidérmico 2 (Her2), o triple negativo (TN) en caso de no contar con ningún receptor.

3.5.1 Receptores hormonales (RE y RP)

El 75% de los CaMa sobreexpresan RE y un 70% de éstos co-expresan RP (de Dios, 2017). El RE es un factor de transcripción que se une al ADN, perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares (Beato & Klug, 2000). Existen dos isoformas RE α y RE β (Zhu, *et al.*, 2006), donde RE α promueve la proliferación del epitelio normal y neoplásico, es por esta razón que es de importancia en el desarrollo del CaMa (de Dios, 2017).

Los RP también pertenecen a la superfamilia de receptores hormonales nucleares y se han reportado tres isoformas RP-A, RP-B y RP-C (Hill, *et al.*, 2013; Kariagina, *et al.*, 2008). La expresión de receptores hormonales (RE y RP) en CaMa se asocian clínicamente a un buen pronóstico (Dunnwald, *et al.*, 2007). La línea celular representativa de este subtipo es MCF7, la cual expresa receptores de estrógeno y de progesterona, además es una línea celular poco agresiva y no invasiva (Ali, *et al.*, 2023; Gest, *et al.*, 2013). Esta línea celular deriva a partir de una mujer de 69 años con adenocarcinoma maligno de mama (American Type Culture Collection, 2024).

3.5.2 Triple negativo (TN)

El subtipo histopatológico triple negativo (TN) no expresa RE, RP o Her2 y representa aproximadamente del 12% al 17% de los subtipos de CaMa (Foulkes, *et al.*, 2010). Sin embargo, una alta proporción de las muertes por CaMa en este subtipo es debido a su agresividad (Podo, *et al.*, 2010). El subtipo TN presenta una mayor incidencia en mujeres jóvenes, afroamericanas y portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 (Bae, *et al.*, 2016). La línea celular representativa de este subtipo es MDA-MB-231 la cual es negativa a receptores hormonales y Her2, son células agresivas e invasivas de CaMa triple negativo

(Razak, *et al.*, 2019; Gest, *et al.*, 2013). Esta línea celular deriva a partir de una mujer de 51 años con adenocarcinoma maligno de mama (American Type Culture Collection, 2024).

3.5.3 Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (Her2)

Her2 es un receptor transmembrana perteneciente a la familia de receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (EGFR, por sus siglas en inglés) (Dahabreh, *et al.*, 2008; Joerger & Fersht, 2007). Este presenta actividad intracelular tirosina-cinasa; a través de la cual activa vías de señalización involucradas en la regulación de procesos celulares como: proliferación celular, movilidad y angiogénesis, funciones que al estar alteradas suelen estar involucrados en la carcinogénesis (Mukohara, 2011; Moasser, 2007). Este oncogen se localiza en el cromosoma 17 en el locus 17q12–21 (Jacot, *et al.*, 2013) codifica para una proteína de 185 kDa localizada en la membrana celular (Olayioye, *et al.*, 2000; Yarden & Sliwkowski, 2001). Una célula humana diploide normal presenta dos copias del gen y aproximadamente 50,000 moléculas de la proteína. En cambio, las células cancerosas que presentan *HER2* amplificado poseen más de dos copias del gen y aproximadamente 1,000,000 de moléculas de la proteína (Gutiérrez, 2011). El subtipo Her2+ supone del 15% al 30% del total de los casos de CaMa (Wang, *et al.*, 2008). La línea celular representativa de este subtipo es SKBR3 la cual expresa a Her2, este subtipo es de mayor agresividad (Pirsko, *et al.*, 2018). Esta línea celular se estableció en 1970 a partir del derrame pleural de una mujer caucásica de 43 años con adenocarcinoma maligno de mama (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 2024).

3.6 Loci *HER2*

El loci *HER2* se encuentra ubicado en el cromosoma 17 en la posición Chr17q12-21; en condiciones de transformación, este fragmento del cromosoma integrado por varios genes incluido *HER2*, puede amplificarse y suele abarcar una región de 34.73 hasta 35.48 Mb (Smith, *et al.*, 2007; Joensuu, *et al.*, 2006). Además de *HER2*, en esta región también se amplifican otros 11 genes, los cuales son: *MED1*, *STARD3*, *GRB7*, *THRA*, *RAR α* , *IGFPB4*, *CCR7*, *KRT20*, *KRT19*, *GAST* y *TOP2 α* (Figura 2) (Jacot, *et al.*, 2013).

En el amplicón, el gen *HER2* presenta el mayor valor y frecuencia de amplificación con respecto a cualquier otro gen incluido en el amplicón (Lamy, *et al.*, 2011). Los tumores Her2+ tienen niveles más altos de inestabilidad genómica que los tumores Her2-, apoyando la teoría de que la amplificación de *HER2* está funcionalmente implicada en la inestabilidad cromosómica en el brazo largo del cromosoma 17 (Chr17q) (Ellsworth, *et al.*, 2008; Nielsen, *et al.*, 2010).

La amplificación de *HER2* es un factor de mal pronóstico, la cual está directamente asociada con un aumento en la metástasis y por lo tanto en la reducción de la supervivencia; de igual forma es un factor predictivo de respuesta a tratamientos que tiene como blanco a la proteína Her2 (Susini, *et al.*, 2010; Vranic, *et al.*, 2011).

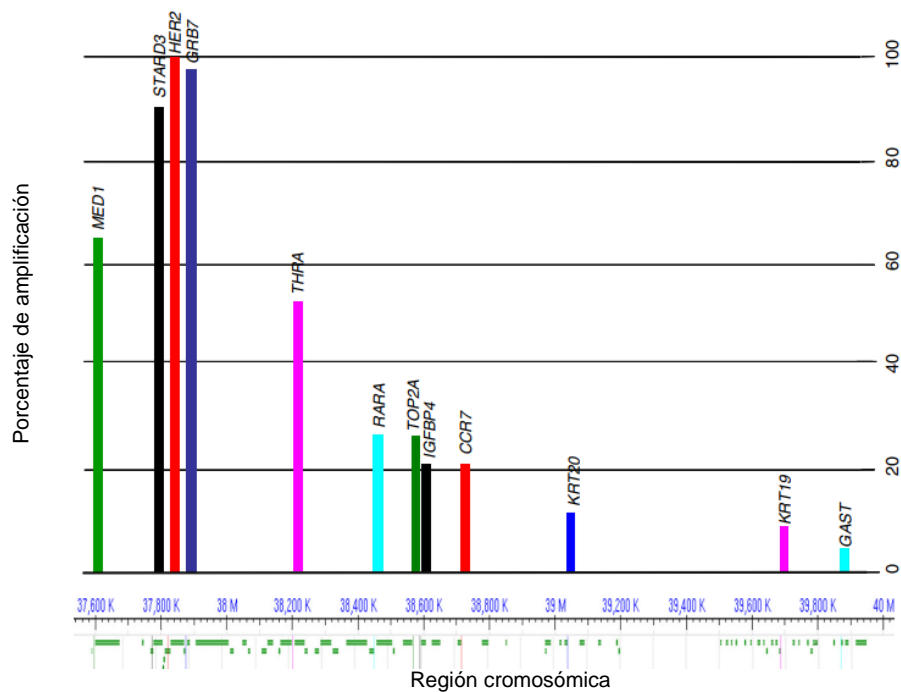


Figura 2. Distribución de la amplificación genética en el cromosoma 17q12-q21, en el subtipo de CaMa, Her2+. Modificado de Jacot, 2013.

3.7 TOP2 α

El gen *TOP2 α* genera un ARNm de 4,593 nucleótidos, y codifica para una proteína de 1,531 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa (Pommier, *et al.*, 2022).

Top2 α es una topoisomerasa vital ubicua en todas las células, que regula el estado topológico del ADN durante la replicación, la condensación y la segregación de los cromosomas en los problemas topológicos que se presentan durante la transcripción y la replicación del ADN (Pommier, *et al.*, 2022).

Top2 α es una enzima dimérica, su mecanismo de acción es el siguiente: (1) la enzima se encuentra en una conformación “abierta”, para unirse con el segmento G-ADN, llamado así porque formará la compuerta (gate, en inglés) a través de la cual pasará una segunda cadena denominada segmento T-ADN (ADN transportado) a través de la rotura (inciso a, Figura 3). En el paso 2, la enzima ha sufrido un cambio conformacional formando una abrazadera cerrada en la cual está unida el segmento G (inciso b, Figura 3). En el paso 3, la enzima en su configuración cerrada también puede capturar el otro segmento T-ADN que pasará a través de la rotura realizada por el segmento G (inciso c, Figura 3). En el paso 4 y 5 la enzima se une a una molécula de ATP, el segmento G se escinde y el segmento T pasa a través de la rotura realizada por el segmento G (inciso d y e, Figura 3). En el paso 6, los dos extremos del segmento G se unen de nueva cuenta y el segmento T se libera (inciso f, Figura 3). La hidrólisis del ATP se produce en 2 pasos del ciclo de reacción. El primer ATP hidrolizado participa en el paso de la hebra. El segundo paso de hidrólisis (junto con la liberación de ADP y Pi) permite que la abrazadera de la enzima se vuelva a abrir y permite la liberación del segmento T. Top2 α puede iniciar otro ciclo catalítico sin liberarse del segmento G o liberándolo (inciso g, Figura 3). (Nitss, *et al.*, 2009).

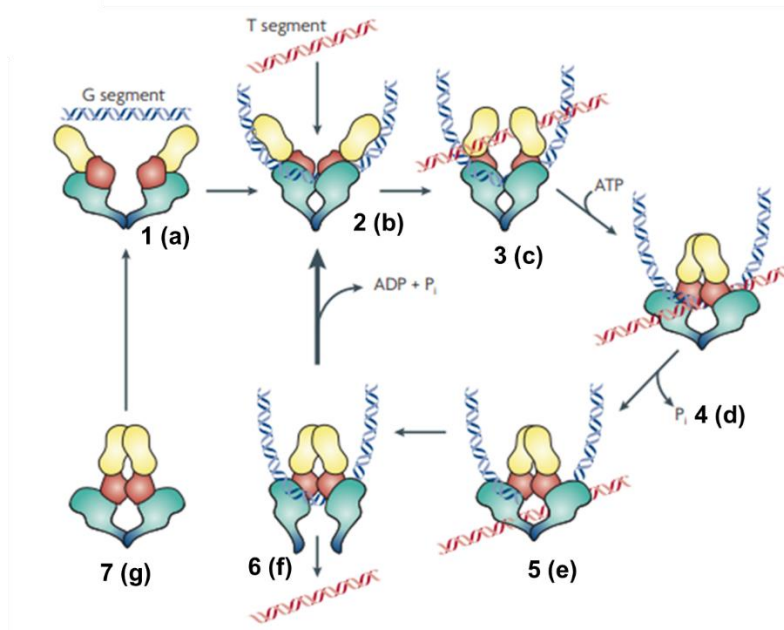


Figura 3. Mecanismo catalítico de la Top2 α . Modificado de Nitss, 2009.

3.7.1 TOP2 α y su relación en el CaMa

El gen *TOP2 α* se localiza río abajo del oncogén *HER2*, en la región cromosómica 17q12-q21, por lo que también se puede amplificar o deletar, con la misma tasa, al menos en el 90% de las neoplasias de CaMa primarios con amplificación de *HER2* (Järvinen & Liu, 2003).

Entre el 10% y el 50% del CaMa muestran amplificación del gen *TOP2 α* para el subtipo Her2+ (Chibon, *et al.*, 2009; Wolff, *et al.*, 2007). La sobreexpresión de Top2 α es considerada como un factor predictivo de sensibilidad a las antraciclina debido a que es un blanco de dichos fármacos, mientras que su delección se asocia con resistencia al tratamiento (Bartlett, *et al.*, 2010; Won *et al.*, 2014). De la misma manera, la sobreexpresión de Top2 α es considerada un factor de buen pronóstico (Györfy *et al.*, 2010; Qiao, *et al.*, 2015).

Además, Top2 α es blanco molecular de un grupo de medicamentos puesto que es vital en la división celular por lo que la interrupción de la función de la enzima puede inducir la formación de daños citotóxicos en el ADN (Lee, *et al.*, 2017). Los fármacos pueden ser de dos tipos: inhibidores de topoisomerasa, ejemplos de estos son el resveratrol, la

doxorubicina, la cual pertenece al grupo de las antraciclinas o los que estabilizan al complejo de Top2 α e interfieren con la capacidad de la enzima para religar el ADN (Champoux, 2001).

3.8 Tratamiento del subtipo Her2+

Los tratamientos anti-Her2 bloquean la actividad tirosina-cinasa de Her2 para detener el crecimiento de las células cancerosas (American Society of Clinical Oncology, 2018).

Para determinar el tratamiento más efectivo, este deberá ser individualizado para cada paciente realizando pruebas especializadas para identificar los genes, proteínas u otros factores específicos del tumor. (American Society of Clinical Oncology, 2018).

En la actualidad existen tratamientos basados en inmunoterapia aprobados por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos, (por sus siglas en inglés, FDA) para el tratamiento del subtipo Her2+.

Entre los anticuerpos utilizados en la inmunoterapia son: Trastuzumab, Pertuzumab, y T-DM1. El Trastuzumab y Pertuzumab, son anticuerpos monoclonales específicos contra Her2, que se unen a Her2 en su dominio extracelular e inhiben la señalización activada por este receptor (American Society of Clinical Oncology, 2018., Burstein, 2010). Actualmente Trastuzumab es elemental para el tratamiento de pacientes con CaMa del subtipo Her2+ (de las Heras, *et al.*, 2017). Por su parte, T-DM1 es un compuesto que incluye el anticuerpo anti-HER2 y el agente citotóxico antimicrotúbulos, DM1 (emtansina). T-DM1 incorpora las propiedades antitumorales dirigidas a Her2 del trastuzumab con la actividad citotóxica del agente inhibidor de microtúbulos DM1 (Verma, *et al.*, 2012). Adicionalmente, el tratamiento involucra el uso de fármacos conocidos como moléculas pequeñas como son Neratinib y Lapatinib, las cuales se unen al dominio intracelular de Her2, actuando como inhibidores de tirosina-cinasa evitando la señalización de Her2 y también del otro receptor Her1 y Her4 (Wood, 2004, Guo, *et al.*, 2023).

Sin embargo, a pesar de los diferentes tratamientos específicos disponibles para este subtipo en muchas ocasiones las células generan resistencia a los tratamientos de primera línea, por lo que la alternativa para estos pacientes es el tratamiento con quimioterapia.

3.9 Quimioterapia

La quimioterapia es uno de los pilares del tratamiento sistémico del CaMa se refiere al uso de fármacos que tienen el propósito de eliminar a las células cancerosas inhibiendo su proliferación (American Society of Clinical Oncology 2018).

Su uso es considerado en tres posibles escenarios: quimioterapia adyuvante a cirugía, neoadyuvante o prequirúrgica y en la enfermedad metastásica. La quimioterapia adyuvante pretende eliminar las células que pueden haber quedado en el cuerpo (residuales) después de haberse extirpado el tumor quirúrgicamente en un estadio temprano. Mientras que la terapia neoadyuvante o también conocido como tratamiento sistémico primario es administrado antes del tratamiento local, comúnmente antes de la cirugía y tiene el objetivo de reducir el tamaño del tumor de estadio tardío. Se considera que la enfermedad metastásica permite una supervivencia de 2 a 3 años; por lo tanto, la finalidad es prolongar la supervivencia del paciente, mejorar los síntomas y tener una mejor calidad de vida, debido a que en este estadio la enfermedad ya no es curable (Angulo, *et al.*, 2013). Actualmente, existen una gama de fármacos quimioterapéuticos, uno de los más utilizados en el tratamiento de diversos tipos de tumores es paclitaxel (Bressand, *et al.*, 2019).

El paclitaxel (PTX), es un fármaco quimioterapéutico comúnmente utilizado en la práctica clínica (Bressand, *et al.*, 2019). Su mecanismo de acción consiste en inhibir la mitosis celular en la fase G2/M, evitando la despolimerización de la tubulina al unirse a la subunidad β -tubulina (Leung & Cassimeris, 2019). En México, el paclitaxel es usado como quimioterapia adyuvante de segunda línea para tratar el CaMa (Cardenas *et al.*, 2017). Además, el paclitaxel se puede utilizar en combinación con otros fármacos, que en su conjunto pretenden tratar una diversidad de neoplasias, que incluyen el cáncer de cuello uterino, cánceres de cabeza y de pulmón (Ma, *et al.*, 2019). El paclitaxel puede ser utilizado en combinación con otros quimioterapéuticos de acción general o fármacos inhibidores, como lo son los inhibidores de topoisomerasa.

3.10 Resveratrol

El resveratrol, es un polifenol que se encuentra en diversas fuentes vegetales (Lee, *et al.*, 2017) como las bayas, los frutos secos, las medicinas tradicionales asiáticas y el vino tinto (Novelle, *et al.*, 2015). Diversas investigaciones han mostrado que tiene efectos pleiotrópicos, incluyendo una potencial actividad, antiinflamatoria, cardioprotectora y neuroprotectora, antioxidante (Jang, *et al.*, 1997; Foti, *et al.*, 2011). Además de estas propiedades, el resveratrol posee potencial como agente complementario a la quimioterapia convencional por sus propiedades anticancerígenas (Harikumar, *et al.*, 2010).

Actualmente se ha demostrado su eficacia contra los tipos de cáncer que están asociados con la obesidad, como lo es el cáncer hepático, pancreático, de mama, de próstata y colón, así como contra el cáncer de pulmón (Carter, *et al.*, 2014; Yousef, *et al.*, 2017; Adhami, *et al.*, 2003). Asimismo, se ha demostrado que el resveratrol puede inhibir la proliferación en líneas celulares de CaMa al inhibir el ciclo celular e inducir muerte celular por apoptosis. (Wu, *et al.*, 2019). Una estrategia actual en el combate del cáncer es la combinación de compuestos quimioterapéuticos clásicos con moléculas en estudio, como lo es el resveratrol.

En la Figura 4 se muestra el mecanismo de acción propuesto del resveratrol, el cual consiste en la unión al dominio ATPasa de la enzima Top2 α inhibiendo así su actividad catalítica. Las flechas negras indican el ciclo enzimático de la Top2 α activada mientras que las líneas rojas indican los pasos inhibitorios. El segmento G del ADN se muestra en naranja y el segmento T se muestra en verde (Lee, *et al.*, 2017).

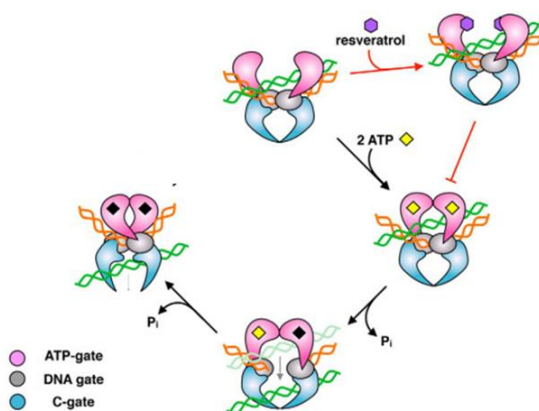


Figura 4. Mecanismo de acción del resveratrol en la inhibición de Top2 α . Modificado de Lee, 2017.

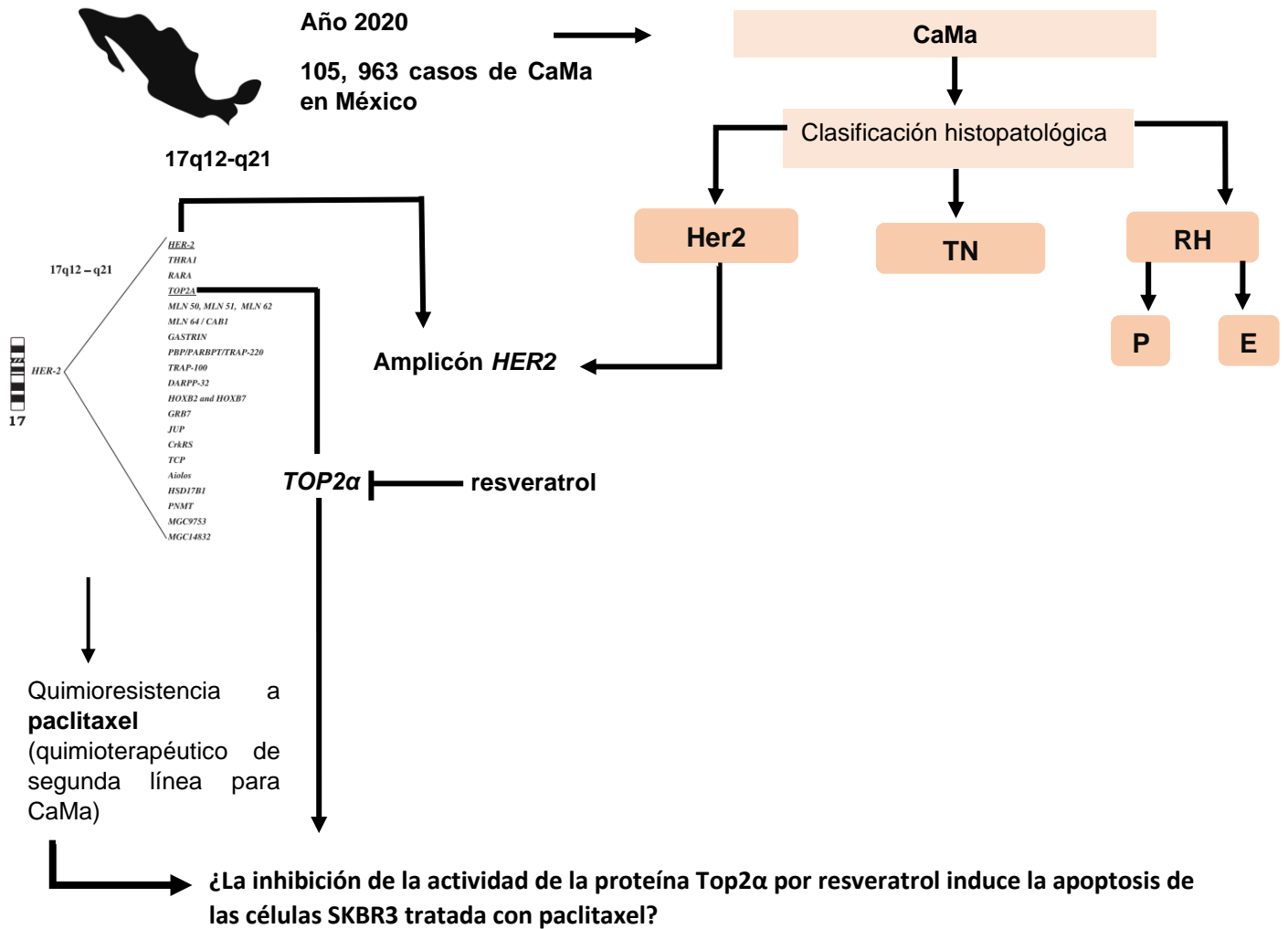
4 Antecedentes específicos

Li y colaboradores, demostraron que paclitaxel es un eficaz quimioterapéutico, el cual ejerce su efecto al inhibir la proliferación de las células MCF7 de CaMa, induciendo la apoptosis al regular el nivel de expresión de las proteínas Bax, caspasa 3 escindida y Bcl-2 (Li, *et al.*, 2020).

Otro fármaco relevante es resveratrol. Lee y colaboradores reportaron que dicho polifenol es un inhibidor de Top2 α , el cual previene la dimerización del dominio ATPasa de la enzima, inhibiendo así su actividad catalítica, además puede usarse en combinación con otros fármacos (Lee, *et al.*, 2017).

Por otra parte, Meng y colaboradores demostraron que la proteína Top2 α se expresó en 57 de 86 del total de los casos de CaMa que mostraron amplificación del gen *TOP2 α* representando el 66.27%. La expresión de esta proteína es importante debido a que es un blanco para ciertos fármacos como lo es el resveratrol (Meng, *et al.*, 2012).

5 Mapa conceptual



6 Justificación

El CaMa es el tipo de cáncer más común, con más de 2,2 millones de casos en el 2020 a nivel mundial. De los tres subtipos histopatológicos de CaMa, el subtipo Her2+ es considerado de mal pronóstico y se caracteriza por presentar amplificaciones en la región 17q12-q21, alteraciones que generan el amplicón de *HER2*. Además, los genes cercanos a este gen que integran el amplicón *HER2* presentan un número mayor de copias, como en el caso del gen *TOP2α*. El gen *TOP2α* codifica para una proteína que funciona como blanco terapéutico de varios agentes anticancerígenos y de fármacos inhibidores, como lo es el resveratrol. Por lo que el presente estudio pretende identificar si la inhibición de la actividad de la Top2α en células SKBR3 tratadas con paclitaxel induce la muerte celular por apoptosis.

7 Planteamiento del problema

El CaMa es una de las principales afecciones de salud a nivel mundial y es el tipo de tumor maligno más frecuente en las mujeres. Esta enfermedad es catalogada como la principal causa de muerte en mujeres por cáncer, aproximadamente una de cada 12 mujeres enfermará de CaMa a lo largo de su vida.

Existen diversos factores relacionados con el desarrollo del CaMa, tales como factores hereditarios, mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *P53*, factores reproductivos y el estilo de vida. Los tratamientos dependen del tipo de CaMa y de la etapa del tumor. El subtipo histopatológico de CaMa Her2+ presenta alteraciones en el número de copias del gen *HER2*, así como de *TOP2α*, y se ha reportado que existe coamplificación de ambos genes en un 31.7% de las pacientes con CaMa. Asimismo, la proteína Top2α, codificada por el gen *TOP2α* es un blanco para fármacos inhibidores como lo es el resveratrol, el cual además proviene de fuentes naturales. Por lo que la inhibición de Top2α con resveratrol podría promover la apoptosis de las células cancerosas utilizando bajas concentraciones del quimioterapéutico clásico paclitaxel.

8 Pregunta de investigación

- ¿La inhibición de la actividad de la Top2 α en células SKBR3 tratadas con paclitaxel induce la muerte celular por apoptosis?

9 Hipótesis.

La inhibición de la actividad de la proteína Top2 α por resveratrol, induce la apoptosis de las células SKBR3 tratadas con paclitaxel

10 Objetivos

10.1 Objetivo general

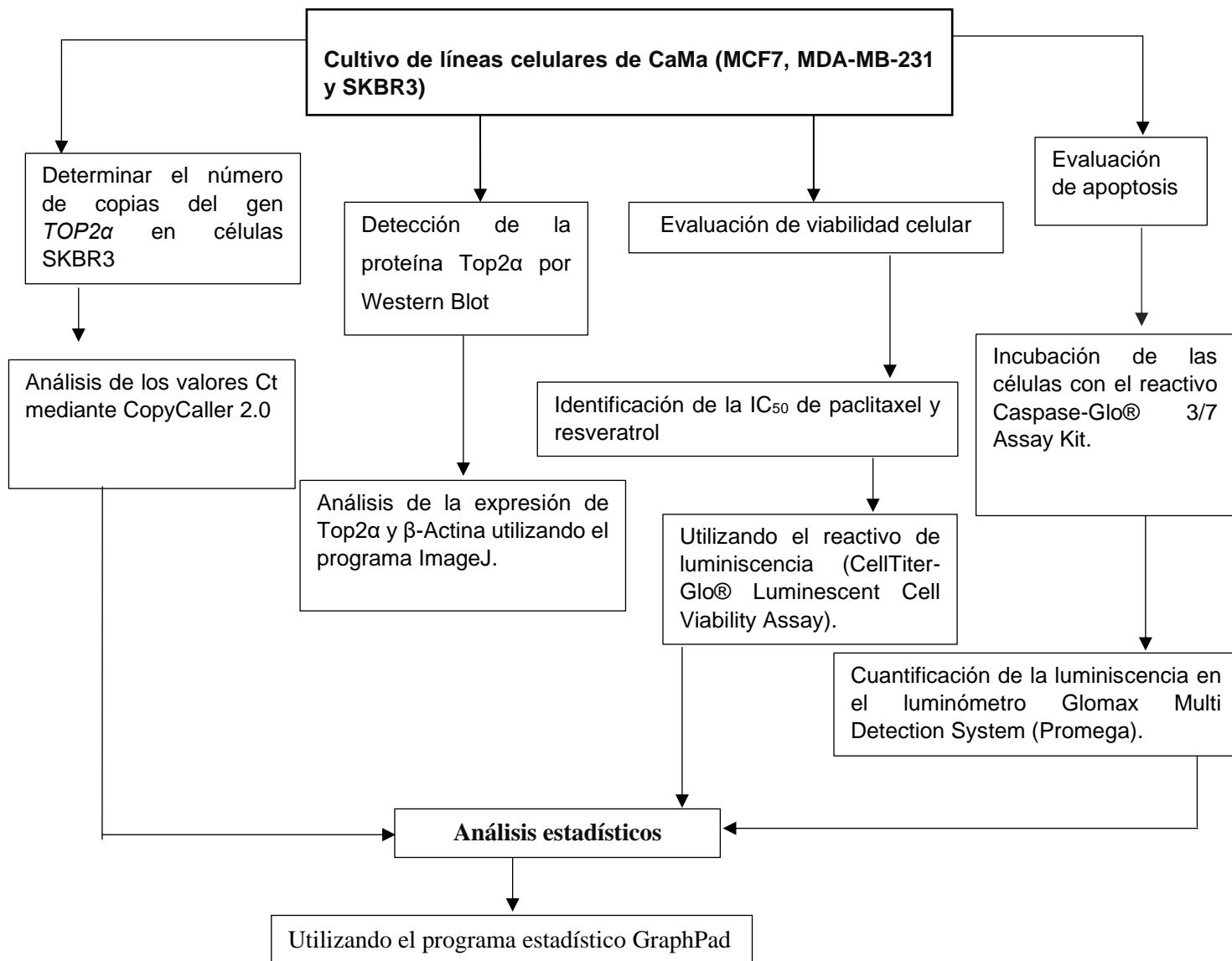
Evaluar la inducción de apoptosis de las células SKBR3 por el resveratrol, inhibidor de la proteína Top2 α en sinergia con el efecto de paclitaxel.

10.2 Objetivos específicos

- Analizar la expresión de la proteína Top2 α en las células SKBR3.
- Determinar la amplificación de *TOP2 α* en las células SKBR3.
- Evaluar la viabilidad celular en células SKBR3 tratadas con el inhibidor de Top2 α y paclitaxel.
- Analizar la activación de la apoptosis en células SKBR3 tratadas con el inhibidor de Top2 α y paclitaxel.

11 Materiales y métodos

11.1 Diagrama general



11.2 Cultivo de las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3

Las células MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 fueron adquiridas en ATCC (American Type Cell Culture) y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Se utilizó la línea celular SKBR3, línea celular representativa del subtipo Her2+ ya que estas células sobreexpresan Her2. Además, se utilizaron dos líneas celulares como control; la línea celular MCF-7 perteneciente al subtipo receptores hormonales y la línea celular MDA-MB-231 la cual carece de la expresión de receptores hormonales y Her2, perteneciente al subtipo TN. En estas dos últimas líneas celulares al no haber una sobreexpresión de Her2 fueron utilizadas como controles.

11.3 Análisis de la amplificación de *TOP2α* a través de qPCR

Para determinar el número de copias del gen *TOP2α*, se realizaron ensayos de qPCR. Para lo cual se extrajo ADN genómico de líneas celulares de CaMa, MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR3 y de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) utilizando el kit de extracción de ADN para cultivo celular y de sangre (QIAGEN, n° de catálogo 13323), posteriormente el ADN genómico obtenido se cuantificó en el NanoDrop (Thermo Scientific) para cada línea celular y se verificó su integridad mediante un gel de agarosa al 1%.

Se realizó qPCR a partir de 20 ng de ADN, además se utilizó el sistema de sondas TaqMan para determinar el número de copias de *TOP2α* (TaqMan Copy Number Assay Hs00270618_CN, 20X), la longitud del amplicón es de 107 pares de bases. Las sondas fueron marcadas con el fluoróforo FAM. También, se utilizó la sonda de referencia RNasa P (TaqMan Copy Number Reference 4403326, 20X), el cual fue etiquetado con el fluoróforo VIC, la longitud del amplicón es de 87 pares de bases. Se utilizaron 0.5 µL de cada sonda 20X para las reacciones de qPCR. Las amplificaciones se realizaron utilizando el reactivo 2X Universal TaqMan Master Mix del cual se utilizaron 5 µL y agua grado biología molecular necesaria para un volumen total de 10 µL. Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, posteriormente 40 ciclos

con una fase de desnaturalización de 95°C durante 15 segundos y una fase de extensión a 60°C durante 1 minuto. Se realizaron tres repeticiones técnicas independientes cada una por duplicado.

Los valores de Ct obtenidos de cada línea celular se analizaron mediante el software CopyCaller versión 2.0 (Applied Biosystems™). Como control del número de copias diploides, se extrajo ADN genómico de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de mujeres sanas. Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

11.4 Detección de la proteína Top2 α

Para determinar los niveles de expresión de la proteína Top2 α , se sembraron células MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 en una caja de 6 pozos (1×10^6 células). Posteriormente, las células se desprendieron y se extrajeron las proteínas, en aproximadamente 50 μ L de buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (que contiene 50 mM de Tris HCL pH 7.4, 50 mM de cloruro de sodio, 0.5 % de SDS, inhibidores de proteasas, 27.7 μ L de aprotinina, 10 μ L de antipaina, 10 μ L de quimiostatina, 25 μ L de leupeptina, 10 μ L de pepstatina). Las células se incubaron durante 30 minutos en hielo, tiempo en el que se lisaron a través de pipeteo y agitación por vórtex. Después, la suspensión celular se centrifugó a una velocidad de 14,000 g durante 30 minutos. Las proteínas extraídas (sobrenadante) se cuantificaron con el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) y se les añadió 7 μ L de buffer de muestra (el cual contiene 0.61912 mM de Tris-Base, 69.3 μ M de SDS, 7.1 mM de β -mercaptoetanol, 1 mililitro de glicerol, 3.5 mililitros de H₂O de grado biología molecular, 14.9 μ M de azul bromofenol). Se carga una cantidad igual de proteínas (30 μ g) en cada carril del gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% (SDS-PAGE), en el primer carril se añadieron 3 μ L del marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific n° de catálogo 26616). Al término de la electroforesis se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (Difluoruro de polivinilideno); posteriormente la membrana se bloqueó durante una hora con BSA (Bovine Serum Albumin) al 5% en TBS1X (Tris-Buffered Saline) a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó toda la noche con un anticuerpo anti-Top2 α (Abcam n° de catálogo ab52934; dilución 1:1000) en agitación a 4°C. Finalizada la incubación, la membrana se lavó cada 10 minutos (3 veces) con PBS

(Phosphate-Buffered Saline) 1X/ 0.1% Tween-20. A continuación se realizó una incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con peroxidasa (Cell Signaling; n° de catálogo 7074S dilución 1:10,000). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti- β -Actina marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich n°de catálogo SAB4301137; dilución 1:40,000). La detección de la interacción antígeno-anticuerpo-HRP fue evidenciada al adicionar el sustrato presente en el kit Supersignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) en el equipo iBright (BioRad). El análisis de las bandas de Top2 α y β -Actina se realizó con el programa ImageJ. La línea celular MCF-7 fue utilizada como un control de expresión de Top2 α debido a que no presenta amplificación del gen a diferencia de SKBR3 y MDA-MB-231 que pertenecen a un subtipo de mal pronóstico. Los valores de la densitometría de MCF7 fueron ajustadas a 1 debido a que no presenta alteraciones en el número de copias de Top2 α , los valores de MCF7 fueron utilizados para obtener la expresión relativa de Top2 α de las líneas celulares restantes.

11.5 Evaluación de viabilidad celular

Se cultivaron 30,000 células SKBR3 y 7,500 células MCF7 en cada pozo en una placa de 96 pozos. Después de 16 horas de cultivo, las células fueron incubadas durante 48 horas en presencia de concentraciones crecientes de los fármacos paclitaxel y resveratrol. Los fármacos paclitaxel y resveratrol fueron disueltos en DMSO. Transcurridas 48 horas de incubación, se evaluó la viabilidad celular agregando 100 μ L por pozo del reactivo de luminiscencia (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C, en una atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se determinó la luminiscencia en un luminómetro Glomax Multi Detection System (Promega). Se ha reportado que un volumen mayor al 10% de DMSO en los medios de cultivo celular promueve toxicidad en las células, por tal motivo, todos los tratamientos de los grupos de células control se colocaron porcentajes menores al 10%. Por ejemplo, el grupo control de células MCF7 fueron incubadas en presencia de 8% de DMSO; este volumen corresponde al tratamiento que utilizó mayor concentración de resveratrol (200 nM). Se normalizó el valor de células control como el 100% de viabilidad celular para ajustar los valores de los diversos tratamientos.

11.6 Evaluación de apoptosis

Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 30,000 células SKBR3 por pozo. Se incubaron durante 48 horas en presencia de la IC_{50} previamente determinada de paclitaxel y resveratrol en el apartado de viabilidad. Se agregaron 100 μ L de reactivo Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit a cada pozo. Las placas se incubaron durante 30 minutos en ausencia de luz. Posteriormente se cuantificó la luminiscencia en un luminómetro Glomax Multi Detection System (Promega).

11.7 Análisis estadísticos

Para los ensayos de viabilidad celular de las líneas celulares SKBR3 y MCF7 se realizaron tres experimentos independientes por duplicado, se obtuvo el promedio y la desviación estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico GraphPad. Para analizar las diferencias entre los tratamientos en las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 con paclitaxel y resveratrol se realizó la prueba U de Mann Whitney, en el cual un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Para comparar los resultados de los datos del ensayo de número de copias entre las CMSP y la línea celular SKBR3 a través de qPCR se realizó la prueba T-Student no pareada. Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$.

12 Resultados

12.1 Ensayo de número de copias *TOP2 α* a través de qPCR

En la Figura 5A se muestra el ADN genómico de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y de las líneas celulares de CaMa: MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 en el cual se observa una banda de ADN genómico de alto peso molecular con integridad adecuada para cada línea celular. En la Figura 5B se observan los resultados del ensayo de número de copias de *TOP2 α* . Los resultados muestran que la línea celular SKBR3 presenta 6 copias del gen *TOP2 α* con respecto al número de copias de las CMSP, este resultado fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

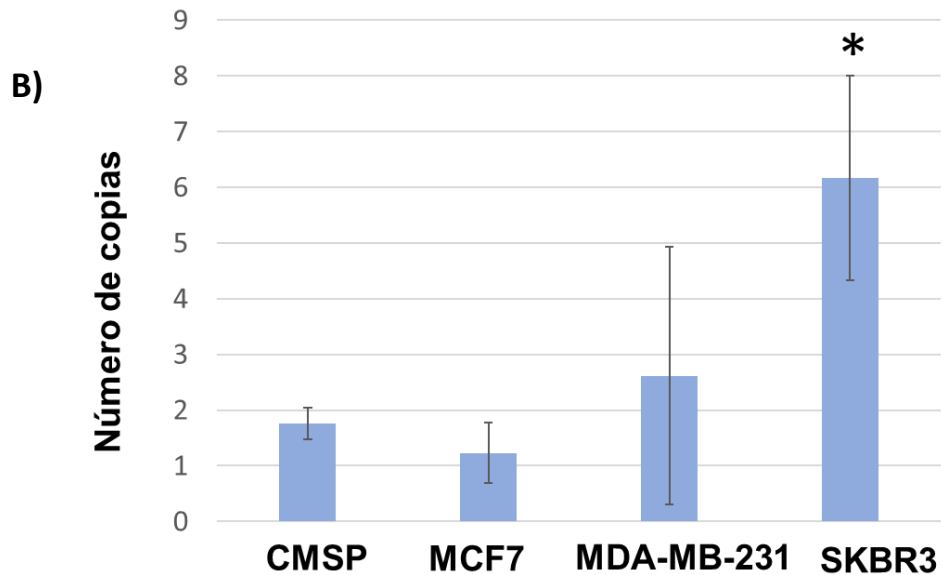
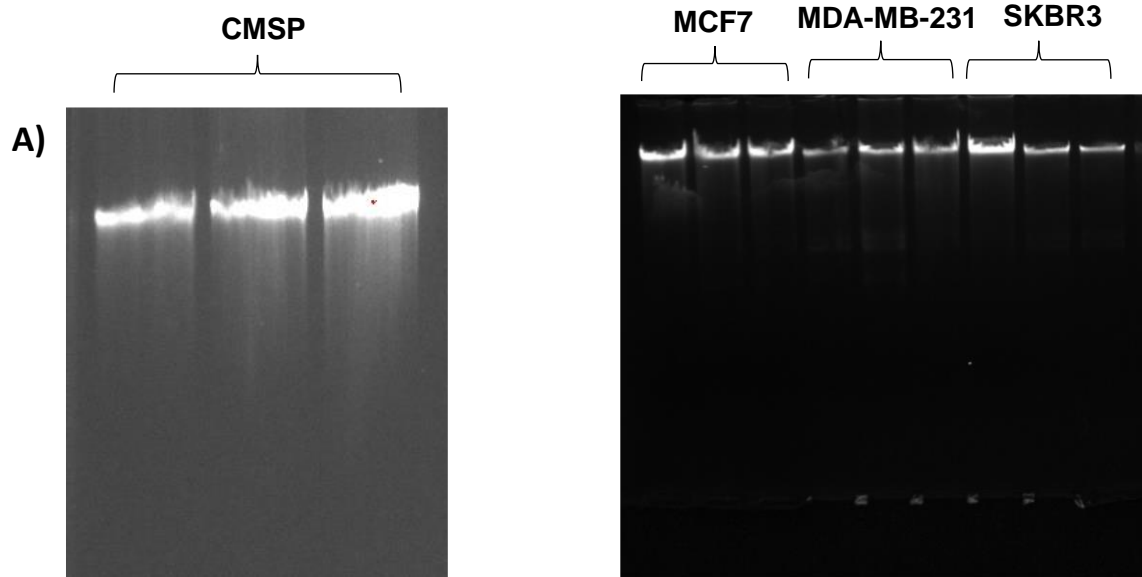


Figura 5. La línea SKBR3 presenta amplificación del gen TOP2 α . A) Imagen representativa de un gel de agarosa al 1% en el cual se muestra la integridad del ADN de las CMSP en la parte superior y en la parte inferior las líneas celulares MCF7 (carril 1, 2 y 3) MDA-MB-231 (carril 4, 5 y 6) y SKBR3 (carril 7, 8 y 9). B) Análisis del número de copias del gen TOP2 α en tres líneas celulares de CaMa (MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3) y de las CMSP. El asterisco muestra aquellos resultados estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

12.2 Detección de la proteína Top2 α

Para determinar los niveles de expresión de la proteína Top2 α en las líneas celulares MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3, se realizó un ensayo de Western Blot. En la Figura 6A se observa una imagen representativa de los diferentes ensayos; en la parte superior corresponde a la expresión de la proteína Top2 α y en la parte inferior el control de carga (β -Actina). La detección de β -Actina se realizó en una misma membrana en donde fue detectada Top2 α , por lo que las bandas observadas en la parte superior de la inmunodetección de β -Actina corresponden al peso molecular de la proteína Top2 α . Se observa mayor expresión de Top2 α en la línea celular SKBR3, resultado que fue confirmado al realizar el análisis de densitometría (Figura 6B).

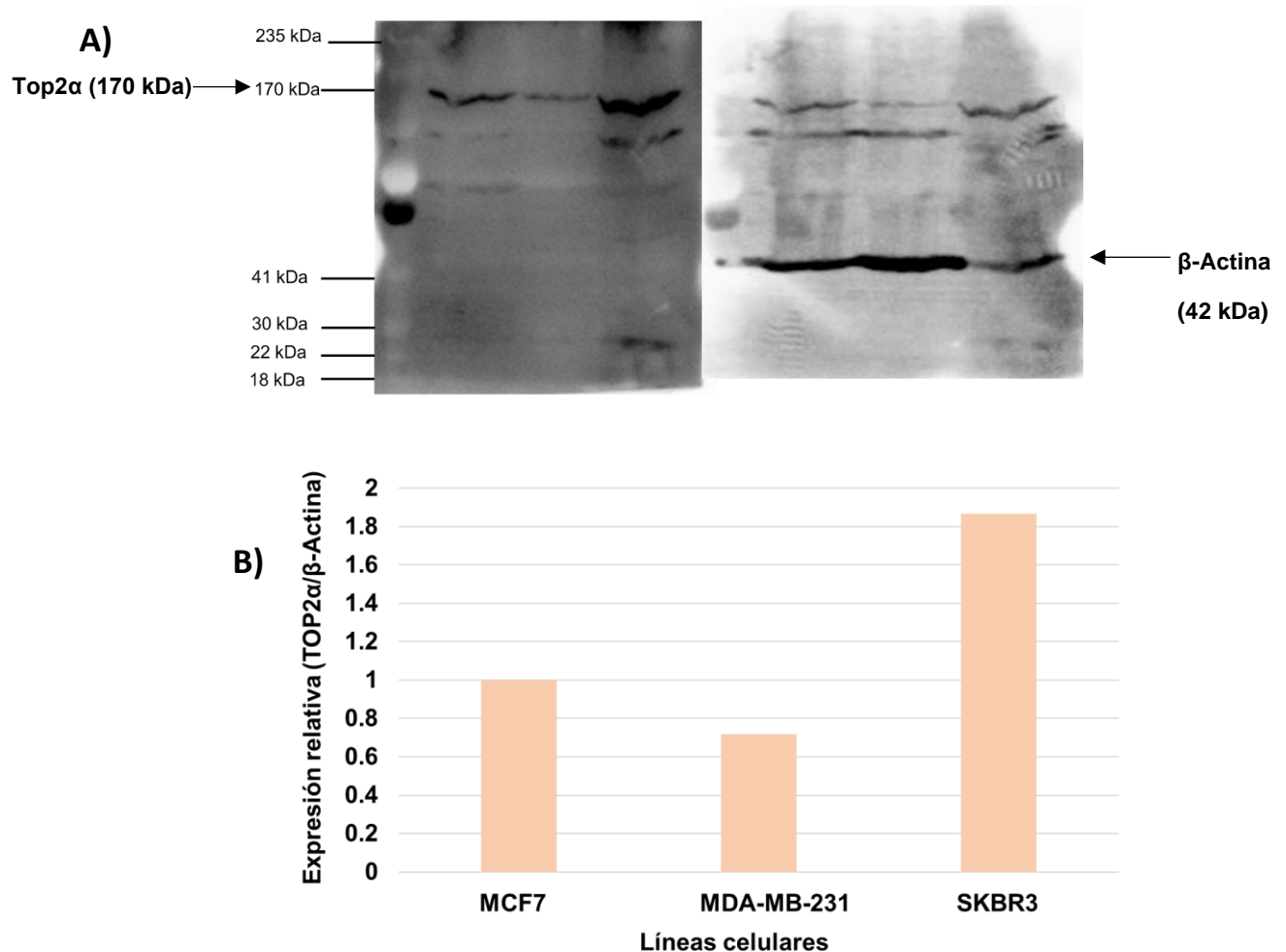


Figura 6. Expresión de la proteína Top2 α en distintas líneas celulares. A) Expresión de Top2 α en las líneas celulares de CaMa, MCF7, MDA-MB-231 y SKBR3 a través de Western Blot. Panel superior Top2 α y panel

inferior β -Actina. **B)** Análisis de densitometría de las bandas de la proteína Top2 α con respecto a β -Actina utilizando el programa Image J. Las proteínas de MCF7 fueron utilizadas como control ya que corresponden al subtipo de CaMa de mejor pronóstico. Los valores de MCF fueron ajustados a 1, información que fue utilizada para comparar la expresión de Top2 α en las líneas celulares SKBR3 y MDA-MB-231.

12.3 Evaluación de la viabilidad celular

Una vez que confirmamos que la línea celular SKBR3 tiene un número mayor de copias de *TOP2 α* y una aparente mayor expresión de la proteína, se realizaron ensayos de viabilidad al incubar a las células con concentraciones crecientes de los fármacos paclitaxel (40 nM, 60 nM, 80 nM, 100 nM, 120 nM) y resveratrol (50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M) durante 48 horas. Con los resultados se encontró que la IC₅₀ de paclitaxel fue de 120 nM (Figura 7) y para resveratrol fue de 150 μ M (Figura 8). En ambos casos, todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes comparado con el control, DMSO, ($p < 0.05$).

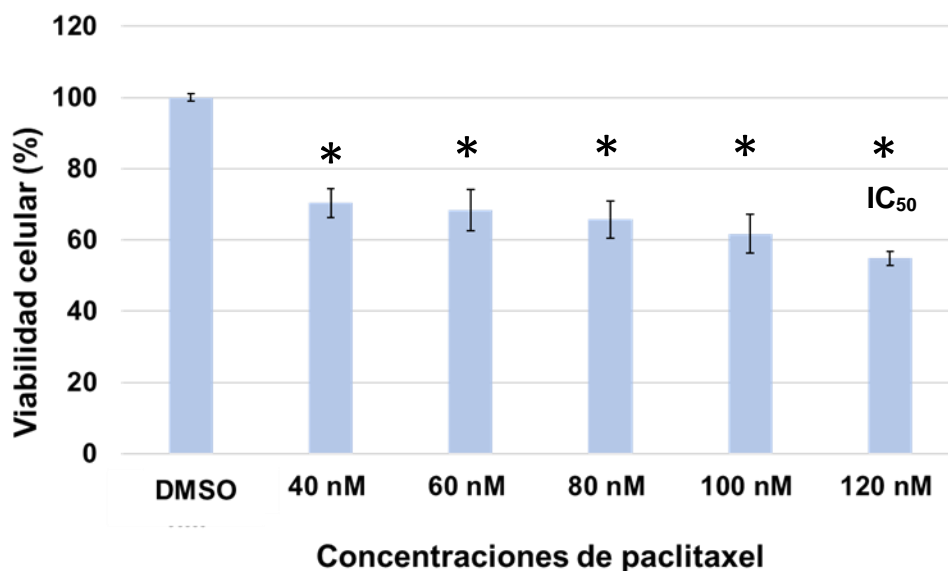


Figura 7. Efecto de paclitaxel en la viabilidad celular de las células SKBR3. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de paclitaxel durante 48 horas. Se realizaron 3 experimentos técnicos independientes cada uno por duplicado. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney. El asterisco representa aquellos resultados estadísticamente significativos con una $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

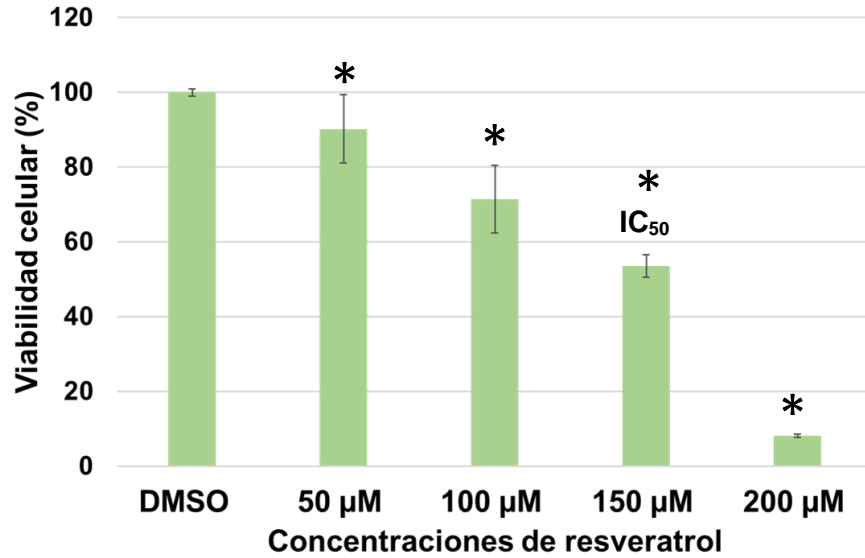


Figura 8. Efecto de resveratrol en la viabilidad celular de las células SKBR3. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de resveratrol durante 48 horas. Se realizaron 3 experimentos técnicos independientes cada uno por duplicado. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos aquellos con una $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

Para determinar el efecto aditivo de las IC₅₀ de ambos fármacos (paclitaxel y resveratrol) en las células SKBR3 se realizaron las combinaciones de las IC₅₀ de los diferentes fármacos. No se observaron diferencias de la viabilidad en las células que fueron tratadas con ambos fármacos (Figura 9). Sin embargo, los tratamientos individuales y combinados fueron encontrados estadísticamente significativos con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

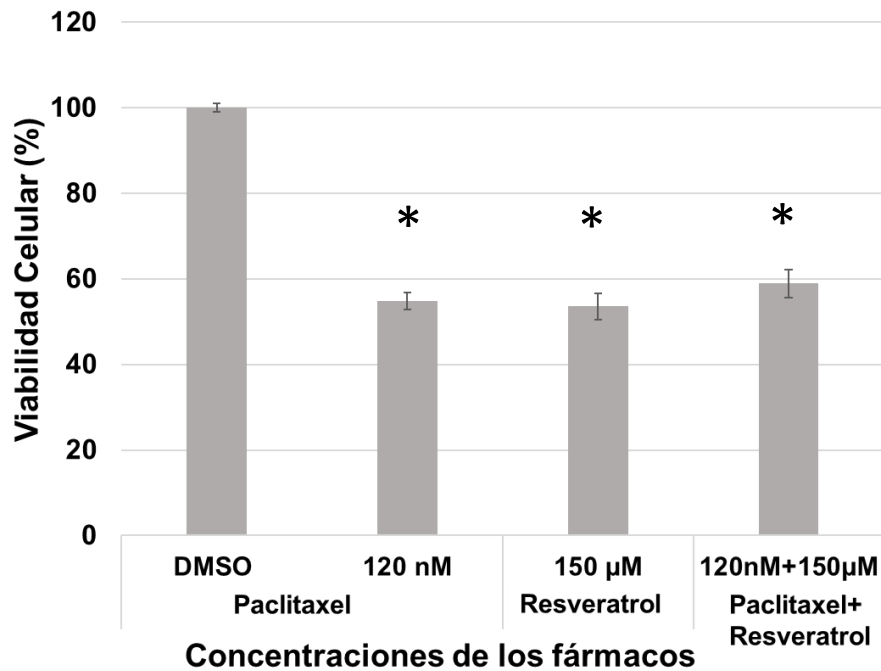


Figura 9. Efecto del tratamiento combinado de los fármacos paclitaxel más resveratrol en la viabilidad celular de las células SKBR3 tratadas durante 48 horas. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

Los resultados de viabilidad de las células Her2+, SKBR3, tratadas con paclitaxel y resveratrol fueron comparados con los resultados de la línea celular MCF7 la cual pertenece al subtipo receptores hormonales.

Las células MCF7 se incubaron durante 48 horas en presencia de concentraciones crecientes de los fármacos paclitaxel (100 nM, 150 nM, 200 nM) y resveratrol (150 μM, 175 μM, 200 μM). En ambos casos se observó un efecto dosis dependiente, donde la IC_{50} de paclitaxel fue de 200 nM (Figura 10) y para resveratrol fue de 150 μM (Figura 11). Todos los tratamientos fueron encontrados estadísticamente significativos con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

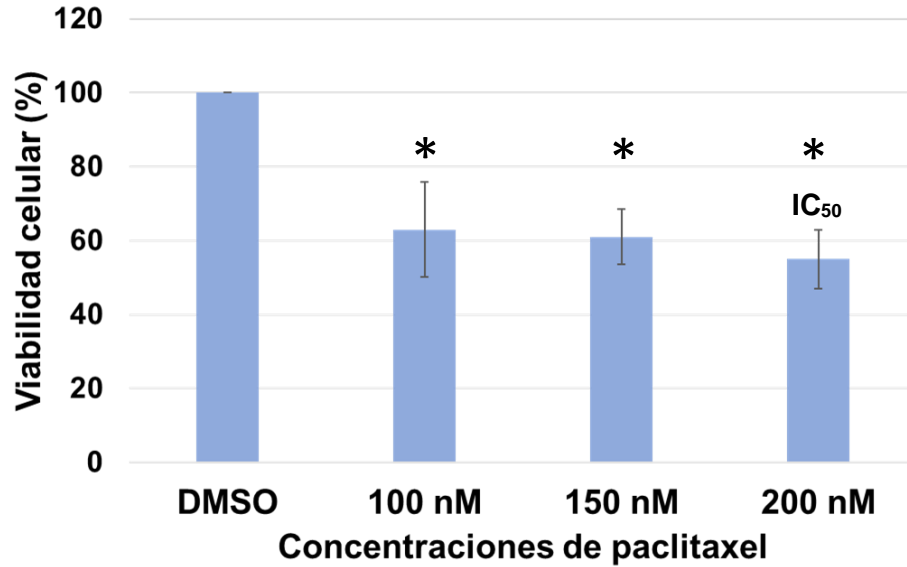


Figura 10. Efecto de paclitaxel en la viabilidad celular de células MCF7. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

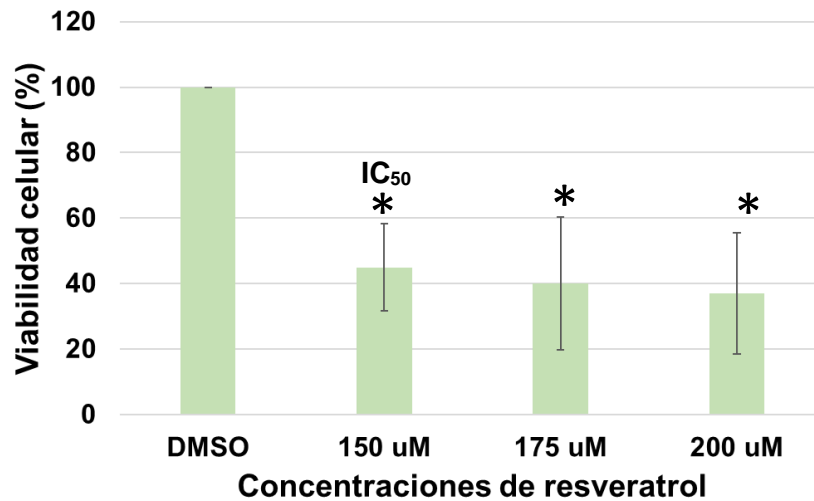


Figura 11. Efecto de resveratrol en la viabilidad celular de células MCF7. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno por duplicado. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos, aquellos con una $p < 0.05$ comparado con el control (DMSO).

12.4 Evaluación de apoptosis

Para determinar si la muerte celular por apoptosis se activa después del tratamiento con paclitaxel y resveratrol, las células SKBR3 fueron tratadas con la IC_{50} previamente determinada incubando las células durante 48 horas. En la Figura 12 se observa la actividad de las caspasas 3/7 en las células SKBR3. Para el grupo control de células SKBR3 se utilizó 8.4% de DMSO; este volumen corresponde al tratamiento combinado de 150 μ M de resveratrol y 120 nM de paclitaxel, el cual fue considerado como la actividad basal de la actividad de caspasas 3/7. Respecto al grupo tratado con paclitaxel, se observó una activación de la actividad de caspasa 3/7 menor que el grupo control sugiriendo un potencial desfase en el tiempo para realizar el ensayo. Respecto a las células SKBR3 tratadas con resveratrol y combinación de los fármacos (paclitaxel+resveratrol) no se observó actividad de las caspasas 3/7 probablemente por una interferencia del fármaco con la reacción de luminiscencia. Debido a la interferencia del resveratrol sobre la reacción ya no se realizaron más experimentos.

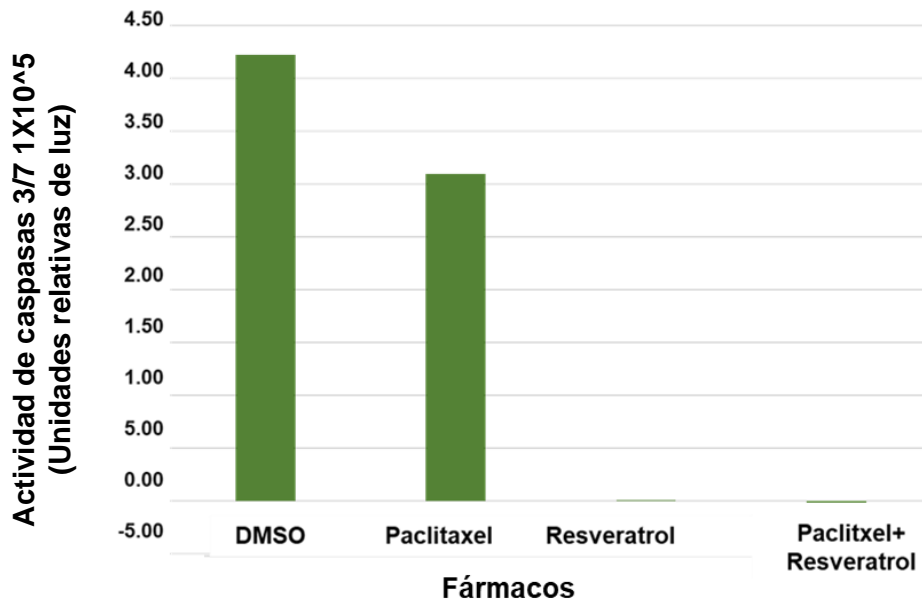


Figura 12. Actividad de las caspasas 3/7 de células SKBR3. Las células SKBR3 se incubaron durante 48 horas en presencia de la IC_{50} previamente determinada de paclitaxel y resveratrol. Se realizó un experimento independiente.

13 Discusión

En la presente investigación, similar a lo previamente reportado se encontró que la línea celular de CaMa SKBR3 presenta amplificación del gen *TOP2α*. Este resultado se encuentra acorde con los estudios de Jacot, y col., (2013) quienes sugirieron que al estar el gen *TOP2α* ubicado río abajo del oncogén *HER2* en la región cromosómica 17q12-q21, puede amplificarse como *HER2*. En concordancia, Arriola, y col., (2008) y Fountzilias y col., (2012) han demostrado que la línea celular SKBR3 coamplifica a los genes *HER2* y de manera interesante, Fasching y col., (2012) documentó que el 31.7% de las pacientes con CaMa mostraban coamplificación de los genes *HER2* y *TOP2α*

Respecto a expresión de la proteína Top2α se verificó que la línea celular SKBR3 expresa Top2α en mayor proporción que otras líneas celulares de CaMa MCF7 y MDA-MB-231 que no son Her2+. Cabe mencionar, que esta sobreexpresión solo se observó en un experimento, sin embargo, esto ya ha sido previamente comprobado por Varis y col., (2004) quienes reportaron que la amplificación del gen *TOP2α* y el aumento de la expresión de la proteína son concordantes, sugiriendo que la amplificación del gen es parte responsable de la sobreexpresión de la proteína Top2α. Las investigaciones de Cardoso y col., (2004) y Fountzilias y col., (2012) reportaron una relación entre la amplificación del gen *TOP2α* y la expresión de la proteína en los casos de pacientes con CaMa en un 54 y 65% respectivamente. No obstante, también existen estudios que debaten este hecho, como lo es el trabajo de Dubercq y col., (2014) quienes encontraron en su estudio que la amplificación del gen *TOP2α* no siempre conlleva una sobreexpresión de la proteína, al menos cuando ésta se evalúa mediante inmunohistoquímica

Por otra parte, el presente estudio demuestra que paclitaxel disminuye la proliferación celular de las líneas celulares de CaMa SKBR3 y MCF7 de forma dosis dependiente. De forma similar, Li y col., (2019) reportaron que paclitaxel inhibe la proliferación de células cancerosas (MCF7, MDA-MB-231, T47D, BT-549) de forma dosis dependientes. Asimismo, Weaver y col., (2017) reportaron que paclitaxel induce muerte celular como consecuencia de la inhibición del ciclo celular en la fase G2/M, siendo este uno de los quimioterapéuticos más utilizados actualmente debido a su actividad en las células cancerosas, el cual es utilizado no solo para el tratamiento de CaMa, sino también para otros tipos de neoplasias.

También, se evaluó el efecto de resveratrol en la viabilidad celular, el cual posee efectos pleiotrópicos, así como una potencial actividad anticancerígena, antiinflamatoria, cardioprotectora y neuroprotectora. Adicionalmente, Aggarwal, y col., (2004) encontraron que resveratrol tiene efectos citotóxicos *in vitro* contra una gran variedad de células tumorales humanas, incluidas las células de cáncer mieloide y linfoide, células de carcinoma de mama, piel, cuello uterino, ovario, estómago, próstata, colon, hígado y páncreas. Resveratrol impacta diversos estadios de la carcinogénesis desde el inicio hasta la progresión al afectar las diversas vías de transducción de señales que controlan el crecimiento y la división celular, inflamación, apoptosis, metástasis y angiogénesis. Además, el resveratrol es una adecuada opción para usar en combinación con paclitaxel, ya que al ser obtenida de fuentes naturales lo hacen una alternativa como terapéutico contra el cáncer, con menor cantidad de efectos secundarios comparado con paclitaxel. De igual forma el trabajo de Lee, y col., (2017) demostró que el resveratrol es un fármaco inhibidor de Top2 α , el cual afecta la dimerización del dominio ATPasa de la enzima, inhibiendo su mecanismo de acción, lo cual provoca la pérdida de actividad celular, debido a que participa en procesos celulares importantes, tales como la replicación, transcripción y segregación de los cromosomas, fungiendo, así como una terapia dirigida hacia Top2 α

En este estudio se encontró que la IC₅₀ para paclitaxel en la línea SKBR3 corresponde a una concentración de 120 nM a las 48 horas. Mientras que la IC₅₀ para paclitaxel en la línea celular MCF7 corresponde a una concentración de 200 nM a las 48 horas. Otro estudio realizado por Haghnavaz, y col., (2018) en el cual utilizaron la línea celular de CaMa SKBR3 y MCF7 reportaron que la IC₅₀ para paclitaxel fueron de 3.5 μ M y 4 μ M respectivamente a las 24 horas. El estudio hecho por Li y col., (2019) en donde utilizaron a la línea celular de CaMa, MCF7 reportaron que la IC₅₀ para paclitaxel correspondió a 1000 nM a las 48 horas. Estas diferencias en las concentraciones podrían deberse a las diferentes estrategias metodológicas utilizadas para cuantificar la viabilidad celular. En el caso del estudio de Haghnavaz, y col., (2018) reportaron una concentración mayor a la que se utilizó en el presente proyecto, podría deberse al tiempo de incubación con el fármaco.

Para el caso de las células tratadas con resveratrol se encontró que la IC₅₀ en la línea celular SKBR3 y MCF7 corresponde a una concentración de 150 μ M a las 48 horas. Khan, y col., (2014) reportaron que la IC₅₀ para resveratrol correspondió a 80 μ M a las 24, 48 y 72 horas en la línea SKBR3, Alkharashi, y col, (2023) reportaron en su estudio que el tratamiento con resveratrol redujo la viabilidad de las células MCF7 en aproximadamente el 57.5 % con una

concentración de 51.18 μM a las 24 horas. Las diferencias de las proporciones de viabilidad en los grupos tratados con resveratrol podrían explicarse debido al tiempo de incubación con el fármaco, así como las diferentes estrategias metodológicas utilizadas en cada una de las diferentes investigaciones.

En el presente estudio no se observó un efecto aditivo de las IC_{50} de ambos fármacos en la viabilidad de la línea celular SKBR3. Fukui y col., (2021) reportaron resultados similares, en donde evaluaron la combinación de paclitaxel y resveratrol en donde demostraron que resveratrol reduce la acción anticancerígena de paclitaxel en células de CaMa que expresan Her2 y Her3, como es el caso de la línea células SKBR3. Wang y col., (2010) proponen el mecanismo por el que resveratrol confiere resistencia a las células SKBR3 frente a paclitaxel. Los autores mencionan que en las células SKBR3, resveratrol promueve una alta expresión de Her2 y Her3. Her3 activa por heterodimerización a Her2, activando su dominio intracelular tirosina-cinasa a través del cual activas vías de señalización como PI-3K/Akt, la cual promueve la proliferación y supervivencia de las células cancerosas; además se regula la proteína survivina la cual inhibe la apoptosis. Por lo que el uso combinado de resveratrol y paclitaxel puede no ser adecuado para ciertos tipos de cánceres humanos que expresan Her2 o Her3, sin embargo, en otras líneas celulares como MCF7 podría ser una opción viable.

Es importante mencionar que al inicio del proyecto se tenía establecido utilizar a HU-331, otro inhibidor de Top2 α , el cual podría ser una opción interesante para usar en combinación con paclitaxel. Al igual que resveratrol proviene de origen natural; sin embargo, al ser este un cannabinoide existieron limitaciones en cuanto a su importación por lo que fue imposible evaluar a este fármaco inicialmente propuesto y se tuvo que optar por resveratrol.

Se detecto un nivel basal de activación de caspasa 3/7 en las células control. En el caso de las células tratadas con paclitaxel se observó un nivel disminuido de actividad de caspasa 3/7 comparado con el grupo control sugere de algún otro tipo de muerte que preferencialmente activa este fármaco. Diversos reportes mencionan del potencial proapoptótico de resveratrol. En los ensayos realizados en las células SKBR3 no fue factible determinar la actividad de caspasa 3/7 inducida por resveratrol, probablemente por un proceso de interferencia con el sistema de luminiscencia. No obstante, Lin y col., (2011) demostraron que resveratrol induce muerte celular por apoptosis.

Y lo más importante, en la discusión haces algunas conclusiones, como que el ensayo de actividad de caspasa no funcionó porque hubo un problema con la bioluminiscencia por el resveratrol, sin embargo, no mencionas por qué o si otros estudios han visto este efecto.

14 Conclusión

En la línea celular SKBR3 perteneciente al subtipo Her2+ de CaMa se observó la amplificación del gen *TOP2α*, y una potencial mayor expresión de la proteína Top2α con respecto a las demás líneas celulares de CaMa evaluadas, que son distintas ya que no sobreexpresan el amplicon de *HER2*.

Por otra parte, los fármacos analizados en el presente proyecto, paclitaxel y resveratrol demostraron por separado tener un efecto inhibitorio de la viabilidad celular en las líneas celulares SKBR3 y MCF7.

15 Perspectivas

Utilizar otros fármacos inhibidores de Top2α que pueden ser evaluados respecto al efecto en la viabilidad y apoptosis como NK314, ICRF-187 y HU-331.

El ensayo para la evaluación de apoptosis con el reactivo Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit no resultó ser compatible con resveratrol y por lo tanto no fue posible determinar la actividad de las caspasas 3/7. Se propone otra metodología para evaluar apoptosis, como la detección de caspasa 3 activada a través de Western Blot. También se propone realizar el ensayo a las 24 horas por el tiempo de degradación de la proteína.

16 Referencias bibliográficas

Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>

Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research*, 24(5A), 2783-2840.

Albi, E., Mandarano, M., Cataldi, S., Ceccarini, M. R., Fiorani, F., Beccari, T., ... & Codini, M. (2023). The Effect of Cholesterol in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5935.

Alkharashi, N. A. (2023). Efficacy of resveratrol against breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines. *Saudi Medical Journal*, 44(3). <https://doi.org/10.15537/smj.2023.44.3.20220768>

American Society of Clinical Oncology. (2018). Cáncer de mama. https://www.cancer.net/sites/cancer.net/files/asco_answers_guide_breast_esp_0.pdf

American Type Culture Collection. (2024). MCF7. <https://www.atcc.org/products/htb-26>

American Type Culture Collection. (2024). MDA-MB-231. <https://www.atcc.org/products/htb-26>

Angulo, M.M., Yustos, M.A., León. M. V & de Mon Sot, M. Álvarez de Mon Sot. (2013). Cáncer de mama. *Medicine-programa de formación médica continuada acreditado*, 11(27), 1633. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(13\)70517-1](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(13)70517-1)

Argüello, E. (2015). Cáncer de la mujer. Centro nacional de equidad de género y salud reproductiva. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/248801/CancerdelaMujer.pdf>

Arriola, E., Marchio, C., Tan, D. S., Drury, S. C., Lambros, M. B., Natrajan, R., & Reis-Filho, J. S. (2008). Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Laboratory Investigation*, 88(5), 491-503. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.19>

Bonilla, J. M., Tabanera, M. T., & Mendoza, L. R. (2017). El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiología*, 59(5), 6-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rx.2017.06.003>

Cárdenas, J., Bargalló, J.E., Bautista, V., Cervantes, G., Erazo, A.A., Flores, C.H., Maffuz, A., Pérez, V.M., Poitevin, A., Salas, E., Torrecillas, L., Valero, V. (2017). *Consenso Mexicano sobre el diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario*. 8ª edición. México; Elsevier. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.m19000180>

Cardoso, F., Durbecq, V., Larsimont, D., Paesmans, M., Leroy, J. Y., Rouas, G., & Di Leo, A. (2004). Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II- α gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *International journal of oncology*, 24(1), 201-209. <https://doi.org/10.3892/ijo.24.1.201>

Centelles, J. J., & Ródenas, S. I. (2010). Paclitaxel: descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Offarm: farmacia y sociedad*, 29(4), 68-75

Colomer, R., Montero, S., Ropero, S., Menéndez, J. A., Cortés, H., Solanas, M., & Escrich, E. (2001). El oncogén HER2 como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en cáncer de mama. *Revista de senología y Patología mamaria*, 14(1), 8. <https://doi.org/10.1016/j.senol.2017.02.001>

Colonia A., Rivera J., Orozco J., Marín D. (2015). HER-2: Un marcador molecular usado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. *Revista Médica de Risaralda*. 21 (1): 31-37

Consenso Mexicano sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. (2023)

http://consensocancermamario.com/documentos/FOLLETO_CONSENSO_DE_CANCER_DE_MAMA_10aRev2023a.PDF

de Dios, M. A., Escrivá de Román S. & Bellet Ezquerria, M. (2017). Receptores hormonales. En Fundación Española de Senología y Patología Mamaria. (Ed). *Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama*. (89-93). Fundación Española de Senología y Patología Mamaria.

de las Heras, B. B., Martínez Martínez, M. T & Hernández A.L. (2017). Oncogén HER2. En Fundación Española de Senología y Patología Mamaria. (Ed). *Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama*. (108-110). Fundación Española de Senología y Patología Mamaria.

Durbecq, V., Desmed, C., Paesmans, M., Cardoso, F., Di Leo, A., Mano, M., & Larsimont, D. (2004). Correlation between topoisomerase-II α gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *International journal of oncology*, 25(5), 1473-1479. <https://doi.org/10.3892/ijo.25.5.1473>

Fasching, P. A., Weihbrecht, S., Haeberle, L., Gasparyan, A., Villalobos, I. E., Ma, Y., & Press, M. F. (2014). HER2 and TOP2A amplification in a hospital-based cohort of breast cancer patients: associations with patient and tumor characteristics. *Breast cancer research and treatment*, 145, 193-203. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2922-x>

Fountzilas, G., Christodoulou, C., Bobos, M., Kotoula, V., Eleftheraki, A. G., Xanthakis, I., & Kalogeras, K. T. (2012). Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1-13. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/212>

Fukui, M., Choi, H. J., Wang, P., & Zhu, B. T. (2021). Mechanism underlying resveratrol's attenuation of paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells: Role of the SIRT1-FOXO1-HER3 signaling pathway. *Cancer Treatment and Research Communications*, 28, 100386. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100386>

Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L. L., Petit, A., Dulong, C., & Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC cancer*, 13, 1-14.

Giuliano, A. E., Connolly, J.L, Edge, S.B, Mittendorf, E.A, Rugo, H.S, Solin, L.J, Weaver, D.L, Winchester, D.J, Hortobagyi, G.N. (2017). Breast Cancer Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 00 (0), 1-13. <https://doi.org/10.3322/caac.21393>

Gobierno del Estado de México. (2018). Cáncer. *Secretaría de Salud*.
<https://salud.edomex.gob.mx/salud/cancer>

Guo, L., Shao, W., Zhou, C., Yang, H., Yang, L., Cai, Q., & Zhang, J. (2023). Neratinib for HER2-positive breast cancer with an overlooked option. *Molecular Medicine*, 29(1), 134.

Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(1), 55-62.

Haghnava, N., Asghari, F., Elieh Ali Komi, D., Shanebandi, D., Baradaran, B., & Kazemi, T. (2018). HER2 positivity may confer resistance to therapy with paclitaxel in breast cancer cell lines. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(3), 518-523.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). *Características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2020*. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/D defuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_N al.pdf

Instituto Nacional del Cáncer. (2021). ¿Qué es el cáncer? <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular Biology International*, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/852748>

Jacot, W., Fiche, M., Zaman, K., Wolfer, A. & Lamy, PJ (2013). The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1836 (1), 147-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.04.004>

Järvinen, T. A & Liu, E.T (2003). HER-2/neu and topoisomerase Ila in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78 (3), 299-311. <https://doi.org/10.1023/A:1023077507295>

Järvinen, T.A.H & Liu, E.T (2003). Topoisomerase Ila gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer more common than anticipated. *Cytopathology*, 14 (6), 309-311. <https://doi.org/10.1046/j.0956-5507.2003.00105.x>

Khan, A., Aljarbou, A. N., Aldebasi, Y. H., Faisal, S. M., & Khan, M. A. (2014). Resveratrol suppresses the proliferation of breast cancer cells by inhibiting fatty acid synthase signaling pathway. *Cancer Epidemiology*, 38(6), 765-772. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.09.006>

Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P. & Ahn, K. S. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2589. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>

Lee J. H., Wendorff T.J & Berger J.M. (2017). Resveratrol: A novel type of topoisomerase II inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 22;292(51), 21011–21022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810580>

Li G., Xu D, Sun J, Zhao S & Zheng D. (2020). Paclitaxel inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by blocking activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 29(11), 1338 <https://doi.org/10.17219/acem/127681>

Lin, H. Y., Tang, H. Y., Davis, F. B., & Davis, P. J. (2011). Resveratrol and apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 79-88. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05846.x>

Memorial Sloan Kettering Cancer Center. (2023). SK-BR-3: Human Breast Cancer Cell Line (ATCC HTB-30). <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-breast-cell-line-sk-br-3>

Meng, H., Chen, R., Li, W., Xu, L., & Xu, L. (2012). Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase II α protein and TOP2A mRNA expression in primary breast cancer: a retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Pathology international*, 62(6), 391-399.

Nitiss, J. L. (2009). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 327-337.

Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Organización Mundial de la Salud. (2023). Cáncer de mama. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=En%202020%2C%20en%20todo%20el,000%20fallecieron%20por%20esa%20enfermedad.>

Organización Mundial de la Salud. (2023). Cancer, https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1

Pirsko, V., Cakstina, I., Priedite, M., Dortane, R., Feldmane, L., Nakazawa-Miklasevica, M., ... & Miklasevics, E. (2018). An effect of culture media on epithelial differentiation markers in breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-436 and SkBr3. *Medicina*, 54(2), 11. doi.org/10.3390/medicina54020011

Pommier, Y., Nussenzweig, A., Takeda, S., & Austin, C. (2022). Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(6), 407-427.

Razak, N. A., Abu, N., Ho, W. Y., Zamberi, N. R., Tan, S. W., Alitheen, N. B., & Yeap, S. K. (2019). Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Scientific reports*, 9(1), 1514.

Varis, A., Zaika, A., Puolakkainen, P., Nagy, B., Madrigal, I., Kokkola, A., & Knuutila, S. (2004). Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *International journal of cancer*, 109(4), 548-553.

Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., & Blackwell, K. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England journal of medicine*, 367(19), 1783-1791.

Vich, P., Brusint, B., Álvarez-Hernández, C., Cuadrado-Rouco, C., Diaz-García, N., & Redondo-Margüello, E. (2014). Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (I/V). *Semergen-Medicina de Familia*, 40(6), 328-330. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2014.02.012>

Wang, S., Huang, X., Lee, CK y Liu, B. (2010). La expresión elevada de erbB3 confiere resistencia a paclitaxel en células de cáncer de mama que sobreexpresan erbB2 a través de la regulación positiva de Survivin. *Oncogen* , 29 (29), 4225-4236.

World Health Organization. (2023). Cáncer de mama. <https://gco.iarc.fr/today/home>

Wu, H., Chen, L., Zhu, F., Han, X., Sun, L., & Chen, K. (2019). The cytotoxicity effect of resveratrol: cell cycle arrest and induced apoptosis of breast cancer 4T1 cells. *Toxins*, 11(12), 731. doi: [10.3390/toxins11120731](https://doi.org/10.3390/toxins11120731)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Secretaría de Extensión
Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 15 de abril del 2024

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: **C. HILDA XOCHILT VARA SEDEÑO**, con el título del trabajo: **Inhibición de la actividad de la proteína Top2 α y su efecto en la apoptosis por paclitaxel en la línea celular de CaMa, SKBR3**. En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente

Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SECRETARIO: DRA. MARIA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

VOCAL: DR. ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ

SUPLENTE: DRA. MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



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

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2024-04-15 18:07:45 | Firmante

OiAW1nvZ/PQ4IYX83qaHKrw2HXHiAlb/P4ITmqxFsDnG1375dPuumMG5Ab3743PI0qJt83SqTpzhwq/3EI3xQu0UBhShQm2fpNZ9GB+FzJfUCya77Syp2lz+Q/Z2TPTEmA3tstL/ePAcgRtLpg65Mn6clDbHKuUmi5QvtlyIBAlJrRDiDHVVOyK+5bGD0cdXtPUryjU9Y7Jyf00Fs1fdpyfoolxucb0RAhwYH4PYeygWUHP2sXMFzKlc9ZpOxiPbIKDy5rmpQDLAqtZSU/NdriiTA9B7eNMacCitidKkG8B7WbO7Fcgv2yJpQvqTwOk9ChvTv1/7TiOYd8RDelqQ==

ALFREDO LAGUNAS MARTÍNEZ | Fecha:2024-04-16 18:29:11 | FIRMANTE

h0LP++myplsuRJRfucEDy8Fz6chfhOH/0nT00ZyhZOjA7hsfiqYVAVHduHzW3Jo11/UDLZYKrQtn5Riq+ZcvnPMj6PjKve1AJxy8C+civpLm2iDSA1raUsCikwzdyuO8+VvorAtSuzF4TdozpTHAh3ksgN89PNGdMpmAjVffy8WLeTQRVvk3p7WaPWA6clb0jilHyQyJX/szZkocyM35HJdh0ZNdRv2vSOcJBqQiO9sRGTH0VwUOeelDF43L/X7jwb3CzRUtejnqbbzAaPObYyPq5mQxA7H+hdNF7v0asWrgzn1b7bB46F7x5uJm31okxC8EwzSCY84vkTyCxMlw==

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2024-04-17 21:20:51 | FIRMANTE

XNbnA3ffTrhKsqgCKsXBd2/zbT/MqoKacW3EAulozzyx/aSH8jRMpK4qHXAxN/SpJxkqHICobHeM9/IX1b2M9D80OqT8Qrtjztr+JAP/E5hr6EWS8MkDmrh4pBRb+0ivyqYCdBz1qpH0BILUgKzHwjboJTFwqEq16tobohGkN2xcn93naDUjsl3x2juA8+hzsFJzGd4rwh+c0+9CIMBoTUffEX/bNfftJCUXhlm1plr85KQvrCBynkRcbZmKDHsUIKGA5IVxqCnBYNubCbTPME4YKc3ZL8ZwNf8UaMtLIKkI1dMNwgQWaYMvuyvBsyTQ3lqfbJhQJoPfQellaTw==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2024-04-17 23:06:28 | FIRMANTE

KXm6TPc1AyKiVFWHIT/4NBzQ3K0xMn1zRxA/draF79X+m3dQjy34livtURLxqcOzYxlqegDlqRhx+e+i120ja6vu/v/u5899Pip7ohALG3ARui+5c8eSotXV2YDY42LsrQ1b1885OP794O1L0ngTQRckfPoZ1MJ5C7L80MwBV35L54KIX2Fsn8OErxsQbvcxnrYhJ1DgxFxCON6wkbUBTWtzt3PCuSsQ957g02/IVbrC2KE2IKoxy3Si8JwS1laMoL4d3nXJpftyJVzFJO6Tg7Qn7ZAIN5vF+0kijAozUgc6NMYATiVojpZn9CkRLa7a6KwyhD3MK9ntahR/cArGw==

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



176yhW3p2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CDibV8yt9ad80dXsz6lnU9DujnA1ia>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029