



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT
POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA

L.F MARÍA JOSÉ RIVERO CORTÉS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

CUERNAVACA MORELOS

ENERO 2020

Cuernavaca, Morelos a 11 de noviembre de 2019
Folio: FF/D/SAc/ CIP /MF/053/2019

L.F. MARÍA JOSÉ RIVERO CORTES
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado le asigno el siguiente jurado para evaluar la tesis "ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

- PRESIDENTE:** Dra. Verónica Rodríguez López
SECRETARIO: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza
V.1. Dra. Laura Patricia Álvarez Berber
V.2. Dr. Erick Ayala Calvillo
V.3. Dr. Tomas Villaseñor Toledo

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



Dr. Julio César Rivera Leyva.
Jefatura de Posgrado



Facultad
de Farmacia
POSGRADO

ccp: archivo: Dra. Verónica Rodríguez López, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, Dr. Erick Ayala Calvillo, Dr. Tomas Villaseñor Toledo
mitv

**UA
EM**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Cuernavaca, Morelos

2020

El presente proyecto de tesis se desarrolló en el laboratorio 7 de Diagnóstico Molecular de la Facultad de Farmacia de la UAEM, bajo la asesoría de la Dra. Leticia González Maya. Agradezco el apoyo financiero otorgado por CONACYT (889625)

DEDICATORIA

Es mi deseo, como sencillo gesto de agradecimiento, dedicar mi trabajo de grado a las siguientes personas, quienes son muy importantes para la culminación de este objetivo.

A mi persona favorita, quien me ha apoyado durante estos 10 años, a quien amo incondicionalmente gracias David.

A mis padres que me dieron la vida, pilares fundamentales en mi formación humana, gracias por brindarme los consejos, la confianza y sobre todo la oportunidad de poder contar con una formación académica.

A mis hermanos, quienes son mis compañeros de vida, gracias por su amor y apoyo durante todo este camino recorrido.

A mis amigos, aquellos que son mi familia por elección, mis cómplices y proveedores de consejos, alegrías, diversión y culpables de momentos inolvidables.

Y principalmente dedico este trabajo, como todo en mi vida, a mi creador quien me da la sabiduría para tomar cada una de mis decisiones y la serenidad para enfrentar cada reto presentado.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a la Dra. Leticia González Maya, mi directora de tesis por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Por su confianza en mí, para realizar este proyecto y por brindar sus conocimientos.

Agradezco a la facultad de farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme realizar mis estudios de posgrado en esta casa de estudios, de igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los recursos financieros aportados puntualmente, los cuales me brindaron la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

También doy gracias a mi comité tutorial, por el tiempo dedicado y sus observaciones tan objetivas y específicas, siempre en beneficio del proyecto de investigación.

Gracias a los doctores; Leonel, Tomas y Enrique del Instituto de Biotecnología de la UNAM, ya que sin su generosa y desinteresada colaboración el presente proyecto no habría de poder realizarse.

En especial quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio; Mariana, Diana, Ariadna, Itzel, Melissa, y en un merecido reconocimiento a la Dra. Jessy y el Dr. Aldo quienes fueron mis maestros en técnicas de biología molecular y un gran apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

I.- RESUMEN	12
I.I ABSTRACT	13
2.- INTRODUCCIÓN	15
2.1 CÁNCER	15
2.1.1 RASGOS CARACTERÍSTICOS DEL CÁNCER	15
2.2 INFLAMACIÓN Y CÁNCER	18
2.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT	19
2.3.1 SECUENCIA DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT	20
2.4 CARCINOMA HEPATOCELULAR	22
2.4.1 ESTADÍSTICA DEL CÁNCER Y CHC	23
2.4.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CHC	24
2.4.3 TRATAMIENTO DE CHC	25
2.5 COMPUESTOS FENÓLICOS	27
2.5.1 ÁCIDO GÁLICO	28
3.- ANTECEDENTES.....	29
3.1 Vía JAK/STAT EN CARCINOMA HEPATOCELULAR	29
3.2 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE ÁCIDO GÁLICO	30
4.- JUSTIFICACIÓN.....	33
5.- HIPÓTESIS.....	33
6.- OBJETIVOS	34
6.1 OBJETIVO GENERAL	34
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
7.- MATERIALES Y METODOS.....	35
7.1 LÍNEAS CELULARES Y MOLÉCULAS	35
7.2 MANTENIMIENTO DE CÉLULAS	36
7.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y DETERMINACIÓN DE LA CI50	36
7.4 RT- PCR: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES BLANCOS (DNMT1 Y FLI-1)	37
7.5 INMUNOFLORESCENCIA: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE STAT3.....	39

7.6 WESTERN BLOT: ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA JAK FOSFORILADA.....	39
8.- RESULTADOS.....	41
8.1 EFECTO CITOTÓXICO DE ÁCIDO GÁLICO, STATTIC E INHIBITOR JAK I EN CÉLULAS HEP3B	41
8.2 EFECTO CITOTÓXICO DE ÁCIDO GÁLICO, EN CÉLULAS IHH	43
8.3 ÁCIDO GÁLICO DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL GEN DNMT1 EN CÉLULAS HEP3B.....	43
8.4 ÁCIDO GÁLICO DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL GEN FLI-1 EN CÉLULAS HEP3B	44
8.5 ÁCIDO GÁLICO NO ALTERA LA EXPRESIÓN DEL GEN DNMT1 EN CÉLULAS IHH	45
8.6 FLI-1 NO SE ENCUENTRA EXPRESADO EN CÉLULAS IHH.....	45
8.7 EFECTO DE ÁCIDO GÁLICO SOBRE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS HEP3B	46
8.8 EFECTO DE ÁCIDO GÁLICO SOBRE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS IHH	48
8.9 EFECTO DE ÁCIDO GÁLICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA JAK FOSFORILADA EN CÉLULAS HEP3B	49
8.10 EFECTO DE ÁCIDO GÁLICO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA JAK FOSFORILADA EN CÉLULAS IHH	49
9.- DISCUSIÓN.....	50
10.-CONCLUSIONES	54
10.1 GENERAL	54
10.1 ESPECÍFICAS	54
11.- BIBLIOGRAFÍA	55
12.- ANEXOS.....	60
12.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RASGOS CARACTERÍSTICOS DEL CÁNCER.....	13
FIGURA2. ESTRUCTURA DE JAK Y STAT.....	17
FIGURA 3. SECUENCIA DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA JAK/STAT.....	19
FIGURA 4 TASAS DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCER 2018	21
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FENOL.....	25
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO GÁLICO.....	26
FIGURA 7. LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS CON TRATAMIENTO DE ÁCIDO GÁLICO.....	29
FIGURA 8. PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS Hep3B	40
FIGURA 9. PORCENTAJE DE VIABILIDAD EN CÉLULAS IHH.....	41
FIGURA 10. ANÁLISIS RT-PCR, PARA LA EXPRESIÓN DE DNMT1 EN CÉLULAS Hep3B.....	42
FIGURA 11. ANÁLISIS RT-PCR, PARA LA EXPRESIÓN DE FLI-1 EN CÉLULAS Hep3B.....	42
FIGURA 12. ANÁLISIS RT-PCR, PARA EXPRESIÓN DE DNMT1 EN CÉLULAS IHH.....	43
FIGURA 13. ANÁLISIS RT-PCR, PARA LA EXPRESIÓN DE FLI-1 EN CÉLULAS IHH.....	43
FIGURA 14. ANÁLISIS DEL EFECTO DE AG EN LA ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS Hep3B	45
FIGURA 15. ANÁLISIS DEL EFECTO DE AG EN LA ACTIVACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS IHH	46
FIGURA 16. ANÁLISIS DEL EFECTO DE AG EN LA ACTIVACIÓN DE p-JAK	47
EN CÉLULAS Hep3B	
FIGURA 17. ANÁLISIS DEL EFECTO DE AG EN LA ACTIVACIÓN DE p-JAK	47
EN CÉLULAS IHH	
FIGURA 18. MODELO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE AG EN CÉLULAS Hep3B.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERISTICAS DE LÍNEAS CELULARES Hep3B E IHH	33
TABLA 2. CONCENTRACIONES PARA DETERMINACIÓN DE CI_{50} EN CÉLULAS Hep3B.....	34
TABLA 3. CONCENTRACIONES PARA DETERMINACIÓN DE CI_{50} EN CÉLULAS IHH.....	34
TABLA 4. SECUENCIA DE OLIGOS dnmt1, Fli-1 Y GAPDH.....	35
TABLA 5. CONDICIONES RT-PCR PARA dnmt1.....	36
TABLA 6. CONDICIONES RT-PCR PARA Fli-1 y GAPDH.....	36
TABLA 7. IC_{50} DE ÁCIDO GÁLICO E INHIBIDORES EN CÉLULAS Hep3B.....	39
TABLA 8. IC_{50} DE ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS IHH.....	41

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CHC: Carcinoma hepatocelular

AG: Ácido gálico

DNMT1: ADN metiltransferasa 1

AU: Ácido ursólico

CP: Compuestos fenólicos

MTS: 2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

GLOBOCAN: Estadísticas globales sobre el cáncer

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

JAK: Janus quinasa

STAT: Transductores y activadores de las señales de transcripción

STAT3: Transductores y activadores de las señales de transcripción isoforma 3

IHH: Hepatocitos inmortalizados humanos

Hep3B: Línea celular de carcinoma hepatocelular

EGFR: Factor de crecimiento epidérmico

HER2: Factor de crecimiento epidérmico humano 2

MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógeno

EMT: Transición de epitelio mesenquimatoso

GLUT1: Transportador de glucosa 1

NK: Natural killer

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

VHB: Virus de hepatitis B

VHC: Virus de hepatitis C

SOCS: Supresores de señalización de citocinas

PIAS: Proteínas inhibidores de activación de STAT

PTPs: Proteína tirosina fosfatasa

ISRE: Elementos de respuesta estimulada por interferón

GAS: Secuencias activadas por gamma interferón

Fli-1: Factor de transcripción de integración de leucemia Friend 1

INT: Interferón

DEN: Dietilnitosamina

IL-6: Interleucina 6

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

ATCC: American Type Culture Collection

EMEM: Eagle's minimal essential médium

RNA: Ácido ribonucleico

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

ANOVA: Análisis de varianza

PEM: Pipes, EGTA y MgCl₂

PIPES: Sal de sodio de ácido piperazinedietanosulfónico

EGTA: Etilenglicol-bis (2-aminoetileter)

SFB: Suero fetal bovino

PBS: Buffer fosfato salina

BSA: Albumina de suero bovino

PVDF: Polidivilino de fluoruro

I.- RESUMEN

Introducción. En la actualidad una de las problemáticas en salud a nivel mundial, es la búsqueda constante de nuevas moléculas citotóxicas con un alto potencial terapéutico, dicha importancia radica en las altas tasas de incidencia y mortalidad, está última a consecuencia de diagnósticos tardíos, la baja respuesta y/o adherencia que presentan los pacientes a los tratamientos y la resistencia a fármacos. Y es precisamente el Carcinoma Hepatocelular (CHC) uno de los tipos de cancer con más altos índices de mortalidad ocupando el 4° lugar a nivel mundial. Compuestos fenólicos aislados de extractos vegetales han mostrado actividad citotóxica en diversas líneas celulares cancerosas, tal es el caso del AG que se presenta como un atractivo compuesto fenólico para su estudio en el tratamiento del cancer.

Objetivo. El presente estudio pretende identificar el posible mecanismo de acción de AG sobre la línea celular Hep3B, específicamente en la vía de señalización JAK/STAT.

Metodología. Se evaluó el efecto citotóxico de AG en células Hep3B y Hepatocitos Inmortalizados Humanos (IHH), mediante ensayo MTS. Posteriormente se evaluó la expresión de genes blancos de la vía JAK/STAT, como es el caso de dnmt1 y Fli-1, por medio de RT-PCR. Además, se evaluó la expresión y localización de STAT3 por medio del ensayo de inmunofluorescencia, por microscopia confocal. Finalmente se determinó el nivel de fosforilación de Jak (p-Jak) por medio de western blot, en ambas líneas celulares.

Resultados. Inicialmente nuestros resultados muestran un efecto citotóxico específico de AG hacia células cancerosas; con una CI_{50} de 48.41 μ M para células Hep3B, mientras que para células IHH fue de CI_{50} 127.7 μ M. Se logro identificar que AG reduce la expresión de blancos transcripcionales de la vía JAK/STAT tal fue el caso de dnmt1 y Fli-1, ambos sufrieron una disminución estadísticamente significativa con el tratamiento de AG respecto al control negativo en celulas Hep3B. Por el contrario, en células normales (control negativo) IHH la expresión de dnmt1, no se vio afectada, mientras que la expresión de Fli-1 no fue detectable, lo cual podría ser indicativo de que este último se presentase como un marcador molecular en CHC, sin embargo, se requieren más estudios para poder aseverarlo. Por otro lado, se observó que AG modula tanto la expresión como la translocación nuclear (activación) de STAT3 en células Hep3B, mientras que en células IHH, se observó una expresión débil de STAT3 y prácticamente nula translocación nuclear, este resultado podría indicar, que la vía de señalización JAK/STAT, solo se encuentra activa en células cancerosas Hep3B, y no en las inmortalizadas IHH. Finalmente, la fosforilación de la proteína Jak (p-Jak) muestra una disminución con el tratamiento de AG, respecto al control en células Hep3B, en tanto que en las células IHH, no se observó expresión

alguna de esta proteína. Por lo anterior, nuestros resultados sugieren que, la vía de señalización JAK/STAT, se encuentra activa en células de CHC y que AG ejerce un efecto en la modulación sobre esta vía de señalización.

Conclusión: El presente trabajo muestra que AG reprimió la vía de señalización JAK/STAT en células Hep3B de CHC.

I.I ABSTRACT

Introduction. Currently one of the main problems in health worldwide, is the failure or a poor outcome of the cancer treatments, then it is necessary a constant research for new cytotoxic molecules with a high therapeutic potential. Moreover, the high incidence and mortality rates of a great number of cancers, is at least, due to late diagnosis, low response and/or the no adhesion of patients to the treatments, and also due to the drug resistance phenotype. Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the cancer types with the highest mortality rates occupying the 4th place worldwide (GLOBOCAN, 2018). Phenolic compounds isolated from plant extracts have shown cytotoxic activity in various cancer cell lines, such is the case of Gallic acid that is presented as an attractive phenolic compound for study in the treatment of cancer.

Objective. The purpose of this study was to provide evidence about the mechanism of action of gallic acid on Hep3B cells line, specifically its modulation on JAK / STAT signaling pathway.

Methodology. The cytotoxic effect of gallic acid on Hep3B and IHH cells was tested by MTS assay. Subsequently, the expression of target genes of the JAK / STAT pathway, such as dnmt1 and Fli-1, was evaluated by RT-PCR. In particular, the expression and location of STAT3 was evaluated by means of the immunofluorescence assay, images taken by confocal microscopy. And finally, the expression of p-Jak ((Protein Jak phosphorylated) was determined by means of western blot, in both cell lines.

Results. Our results showed a specific cytotoxic effect of gallic acid towards cancer cells, since an CI_{50} of 48.41 μ M was obtained for Hep3B cells, while for IHH cells it was CI_{50} 127.7 μ M. In addition, gallic acid reduce the expression of transcriptional targets of the JAK / STAT pathway, dnmt1 and Fli-1, both suffered a statistically significant decrease with the treatment of gallic acid with respect to the control in

Hep3B cells. Contrary, in IHH cells the expression of dnmt1 was not affected, and fli-1 was not observed in none of the conditions, suggesting that fli-1 was only expressed in the cancer cells. Likewise, it was observed that gallic acid modulates both the expression and nuclear translocation of STAT3 on Hep3B cells, while in IHH cells, a weak expression of STAT3 and no detectable nuclear translocation was observed. Finally, the expression of the p-Jak protein was diminished with the treatment of gallic acid, with respect to the control in Hep3B cells. For IHH cells, no expression of this protein was observed. Taken together, these findings suggest that the signal pathway JAK / STAT could be only active in HCC cells, however more studies are required to assert it, and that gallic acid exerts an effect on its modulation.

Conclusion. The present work provides conclusive evidence that AG repressed the JAK/STAT signaling pathway in CHC Hep3B cell.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer

El término cáncer engloba a un grupo de más de 100 diferentes tipos de la enfermedad, que tiene como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales. En la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos, por lo tanto, sus incidencias y tasas de mortalidad tienden a incrementarse con la edad.(Bustamante, et al., 2011). Las características de una célula cancerosa comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de la carcinogénesis en la figura 1 se muestran algunas de las más representativas:



Figura 1. Rasgos característicos del cáncer. (adaptado de Hanahan y Weinberg 2011)

2.1.1 Rasgos Característicos del cáncer

1.- *Evasión de supresores de crecimiento y mantenimiento de la señalización proliferativa*; Las células normales necesitan recibir señales de crecimiento antes de que puedan comenzar a crecer y dividirse. Las células cancerosas adquieren la capacidad de conducir a través de una luz roja, evitando el requisito de las señales de crecimiento y evitando las señales anti-crecimiento; esto forma la base de los 2 primeros sellos, que son la evasión de los supresores de crecimiento y mantenimiento de la señalización

proliferativa. Hay varias formas en que las células cancerosas pueden estimular su propio crecimiento. Pueden alterar las señales de crecimiento extracelular, ya sea estimulando las células normales en su entorno circundante para producir factores de crecimiento, o bien produciendo factores de crecimiento a los que ellos mismos responden. (Barberis, et al., 2011)(Wang & Sun, 2014)

Las células cancerosas pueden modificar la expresión de los receptores de la superficie celular que traducen estas señales de crecimiento, el ejemplo más destacado son los receptores de tirosina quinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), ambos comúnmente sobre expresados en diferentes tipos de cáncer. (Cruz, 2003). Finalmente, se pueden alterar las redes de señalización intracelular que traducen las señales de crecimiento en acción, a través de la sobreexpresión de los componentes de las vías que estimulan el crecimiento o defectos en los mecanismos de retroalimentación que atenúan la señalización del crecimiento. Las vías PI3K / Akt y Ras / Raf / proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) desempeñan un papel clave a este respecto, que se refleja en el hecho de que la vía PI3K / Akt es una de las más perturbadas en el cáncer, y que una cuarta parte de todos los cánceres hay alteraciones de Ras.(Cruz, 2003)

2.- *Resistencia a muerte celular*: La eliminación eficiente de células defectuosas a través de la muerte celular programada (apoptosis) es una parte integral de la función normal de los organismos multicelulares. La maquinaria celular que coordina la apoptosis se divide en 2 clases: sensores que detectan señales de "supervivencia" y "muerte" en el medio ambiente (incluido el receptor del factor de crecimiento GFR y el receptor FAS) y efectores que provocan o suprimen apoptosis en respuesta a esas señales (incluidos p53 y miembros de la familia Bcl-2). Las células cancerosas adquieren la capacidad de evitar la apoptosis, de varias maneras. El más común es la pérdida de p53, que normalmente inicia la apoptosis, y se pierde en más del 50% de los cánceres. Otros mecanismos incluyen el aumento de la expresión de miembros de la familia Bcl-2 anti apoptóticos.(Pérez, et al., 2017)

3.- *Inmortalidad replicativa*; Sorprendentemente, la adquisición de estos primeros 3 rasgos característicos del cáncer no son suficientes para el crecimiento celular ilimitado dentro de los tumores. Las células normales también tienen un potencial finito para dividirse, después de un cierto número de divisiones, el acortamiento de los telómeros, que protegen los extremos de los cromosomas evita que la célula se divida aún más para evitar el daño cromosómico. Algo que no ocurre con las células tumorales, que presentan una reprogramación génica que les permite dividirse sucesivamente sin correr el riesgo de morir acumulando mutaciones mortales.(Weinberg, et al .,2000)

4.- *Inducción angiogénesis*; Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar residuos metabólicos y dióxido de carbono, la nueva vasculatura asociada al tumor, es generada por el proceso de angiogénesis, lo cual ayuda a sostener su expansión. Datos más recientes indican que la angiogénesis también contribuye a la fase microscópica premaligna de la progresión neoplásica.(Vaca, et al., 2017)

5.- *Activación de la invasión y metástasis*; La alteración mejor caracterizada, involucra la pérdida de E-cadherina en células cancerosas, una molécula clave para la adhesión celular, formando uniones adherentes con células epiteliales adyacentes. Un programa regulador del desarrollo, denominado "Transición de epitelio mesenquimatoso" (EMT), se ha convertido en un programa destacado implicado como un medio por el cual las células epiteliales transformadas puede adquirir las habilidades para invadir, para resistir la apoptosis, y para diseminarse.(Weinberg, et al., 2000).

6.- *Desregulación metabólica*; En células tumorales, ciertas mutaciones y la presencia de un medio pobre en oxígeno conducen al efecto Warburg, una reprogramación del metabolismo energético hacia el glicólisis a pesar de tener oxígeno disponible. La sobreexpresión de transportadores de glucosa (principalmente GLUT1) aumentan su disponibilidad dentro de la célula. Se hipotetiza que los tumores requieren una modificación en su metabolismo para cumplir las demandas bioenergéticas y biosintéticas del rápido crecimiento. Además, se propone que este status protegería a la célula de los estados fluctuantes de hipoxia- normoxia que derivan del crecimiento y la reorganización de la nueva vasculatura tumoral.(Sánchez, 2013)

7.- *Evitar destrucción inmune*. Cuando se desarrollan clones tumorales, estos son normalmente detectados y eliminados por mecanismos inmunológicos, que incluyen el sistema inmune innato (monocitos, macrófagos, células naturales killers (NK), etc.) y adaptativo (inducción de linfocitos T y B). Fallas en la inmuno vigilancia tumoral podría explicar la mayor incidencia de ciertos tipos de tumores en individuos inmuno- comprometidos.(Sánchez, 2013)

8.- *Promoción de la inflamación tumoral*. Paradójicamente la inflamación que puede provocar un tumor es beneficiosa para él, ya que fomenta el transporte de diversas sustancias que le son útiles, como factores de crecimiento, un mayor riego sanguíneo o limitantes de la muerte celular o apoptosis.(Shrihari, 2017)

9.- *Inestabilidad genómica y mutaciones.* La adquisición de las múltiples capacidades celulares que se enumeran arriba depende en gran parte en una sucesión de alteraciones en los genomas de células neoplásicas. En pocas palabras, ciertos genotipos mutantes, confieren una ventaja selectiva sobre los sub clones de células, permitiendo su crecimiento y eventual dominio en un entorno tisular local. En consecuencia, la progresión del tumor se puede representar como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales se activa por la adquisición casual de un genotipo mutante, debido a los fenotipos hereditarios, por ejemplo, la inactivación del tumor, que también pueden ser adquiridos a través de mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y modificaciones de histonas.(Barberis et al., 2011).

2.2 Inflamación y Cáncer

La inflamación es la respuesta del cuerpo a estímulos nocivos, como agentes infecciosos, fisiológicos o químicos, que libera varios mediadores inflamatorios a través de células inmunes como los neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Estos mediadores inflamatorios son factores de crecimiento, quimiocinas y citoquinas. El estrés oxidativo se perfila como un elemento iniciador y propagador de inflamación, tal es el caso de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies de nitrógeno (RNS) que activan algunos factores transcripcionales (NF-KB, STAT-3) y provocan la proliferación celular, inestabilidad genómica, angiogénesis, resistencia a la apoptosis, invasión y metástasis.(Shrihari, 2017).

El vínculo crítico entre la inflamación crónica y el cáncer se ilustra claramente por el hecho de que los principales factores de transcripción proinflamatorios, el factor nuclear-κB (NF-κB) y los transductores de señales y activadores de la transcripción 3 (STAT3), pueden activarse por varios factores de riesgo importantes en cáncer. Se ha encontrado que estos dos factores de transcripción oncogénicos desempeñan funciones clave en la tumorigénesis y, por lo tanto, pueden considerarse objetivos potenciales en estrategias para prevenir o tratar el cáncer.(Sikka et al., 2014) .

Alrededor del 25% de los cánceres están asociados con inflamación crónica por agentes infecciosos, algunas de las afecciones inflamatorias crónicas que conducen al cáncer son la infección por H. Pylori que conduce a un carcinoma gástrico; Hepatitis B o C asociado a CHC y carcinoma oral de células escamosas inducido por liquen plano, gingivitis o periodontitis crónica.(Shrihari, 2017)

De forma particular , de la inflamación crónica del hígado, se ven afectadas muchas vías celulares de señalización, lo que conduce a la fibrosis, cirrosis y por último, a la hepatocarcinogénesis..(Capece et al., 2013).

Estos eventos son de suma importancia y son el objetivo de este proyecto, particularmente la vía de señalización JAK/STAT.

2.3 Vía de señalización JAK/STAT

El Janus quinasa / Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (JAK / STAT) es una vía dentro de un gran conjunto de vías pleiotrópicas utilizadas para traducir una multitud de señales para el desarrollo y la homeostasis en animales. JAK / STAT es la vía principal de señalización para una amplia gama de citoquinas y factores de crecimiento. La activación de JAK estimula la proliferación celular, diferenciación, migración celular y apoptosis.(Mendiola & Cruz, 2005).

Las proteínas JAK son la única clase de proteínas con actividad de tirosina cinasa que se asocian con receptores de citoquinas. Hasta la fecha, se han identificado en los mamíferos cuatro miembros de la familia JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2) todas ellas poseen más de 1000 aminoácidos y se encuentran en un rango de peso molecular que va desde 120 a 130 kDa y siete factores STAT (STAT1-STAT6), con dos isoformas de STAT5, llamadas STAT5a y STAT5b, que existen como dos genes estrechamente relacionados. Cada receptor de citoquina se acopla a una serie específica de JAKs y STATs, aunque existe un traslapamiento sustancial entre los diferentes receptores en diversos contextos biológicos. Hay tres clases principales de reguladores negativos de esta vía de señalización: SOCS (supresores de señalización de citoquinas), PIAS (proteína inhibidores de activación de STAT) y PTPs (proteína tirosina fosfatasas).(Duarte & Frank, 2000).

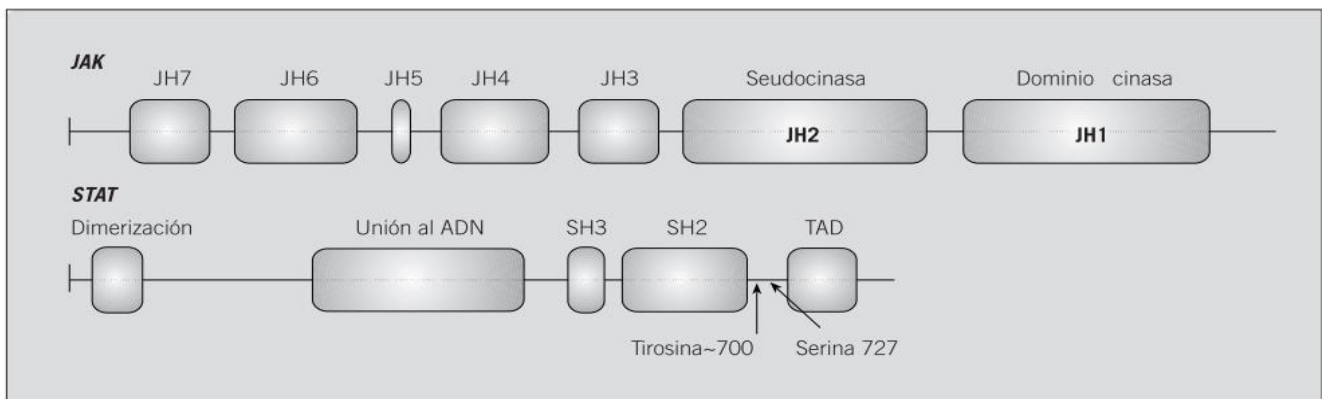


Figura 2. Estructura de JAK y STAT. (Duarte & Frank, 2000)

Aunque hay docenas de citoquinas y receptores de citoquinas, cuatro Jaks y siete STATs, parece que la activación de STAT3 mediada por interleucina-6 es una vía principal implicada en la promoción de la tumorigénesis. Este factor de transcripción regula la expresión de numerosos mediadores críticos de la formación de tumores y la progresión metastásica.(Sansone & Bromberg, 2012).

Entre todos los miembros de la familia STAT, Stat3 se correlaciona más frecuentemente con la tumorigénesis, y se considera un oncogén, ya que es el punto de convergencia de muchas otras vías de señalización, activadas por citoquinas y factores de crecimiento. (Sikka et al., 2014)

Se ha encontrado que las células cancerosas que albergan una actividad aberrante de STAT3, poseen niveles elevados de moléculas anti-apoptóticas (Mcl-1 y Bcl-xL) y proteínas reguladoras del ciclo celular (ciclina D1 y c-Myc). Por lo tanto, las células cancerosas que expresan STAT3 constitutivamente activadas son más resistentes a la apoptosis y quimioterapias destinadas a iniciar la apoptosis.(Sikka et al., 2014).

El papel de las JAK y STAT no se limita a la inducción de proliferación, sino también median la expresión génica asociada con múltiples procesos de diferenciación celular. Por tanto, desde un punto de vista cuantitativo, una inhibición de la vía, incluso parcial, podría ser suficiente para bloquear su efecto transformador sobre células tumorales sin causar toxicidad en células sanas. Por otro lado, en términos cualitativos, hay datos de que existe suficiente redundancia funcional como para compensar, al menos en algunos casos, el efecto de la inhibición completa de una de estas moléculas.(O'Shea et al., 2015).

La activación de STAT3 también se asoció con una disminución de las tasas de supervivencia en CHC y otros tipos de cáncer. Estos hallazgos indican que STAT3 ha surgido como una diana terapéutica para el desarrollo de agentes anticancerígenos. (Park, et al., 2018)

2.3.1 Secuencia de activación de la vía JAK/STAT.

La interacción de las citocinas con sus receptores induce oligomerización de los receptores tipo Tirosin quinasa y aproxima a las JAK asociadas a ellos, que se fosforilan recíprocamente, aumentando así su actividad cinasa. A continuación, las JAK fosforilan residuos de tirosina en los dominios intracitoplásmicos de los receptores, creando puntos de anclaje para las STAT, que se unen específicamente a los receptores, y son igualmente fosforiladas por las JAK. Al ser fosforiladas las STAT

se activan y dimerizan para poder ser liberadas de los receptores y se translocan al núcleo, una vez en el núcleo, STAT se unen directamente, mediante unos dominios centrales, secuencias específicas de ADN denominadas GAS (secuencias activadas por gamma-interferón) e ISRE (elemento de respuesta estimulada por interferón), desde donde se activa la transcripción de los genes que han emitido estas secuencias en sus promotores.(Schneider, et al., 2014).

Esta vía cuenta con un sin número de genes blancos; dentro de los cuales se encuentra el factor de transcripción Fli-1 que se expresa en muchos tipos de células hematopoyéticas, y su expresión en células endoteliales también sugiere un papel en la angiogénesis.(Hodge, et al., 2002). La expresión aberrante de Fli-1 también subyace en una serie de leucemias inducidas por virus, incluida la eritroleucemia inducida por el virus Friend y otros tipos de cáncer. (Li,et al., 2014).

La activación y traslocación de las Stat, también resulta en la activación de los genes, que incluyen 3 familias de proteínas inhibitorias, los inhibidores de la proteína de las STAT activadas (PIAS), las fosfatasa que contienen dominios SH2 (SHP) y los supresores de la señalización de citoquinas (SOCS). (Calvisi et al., 2006).

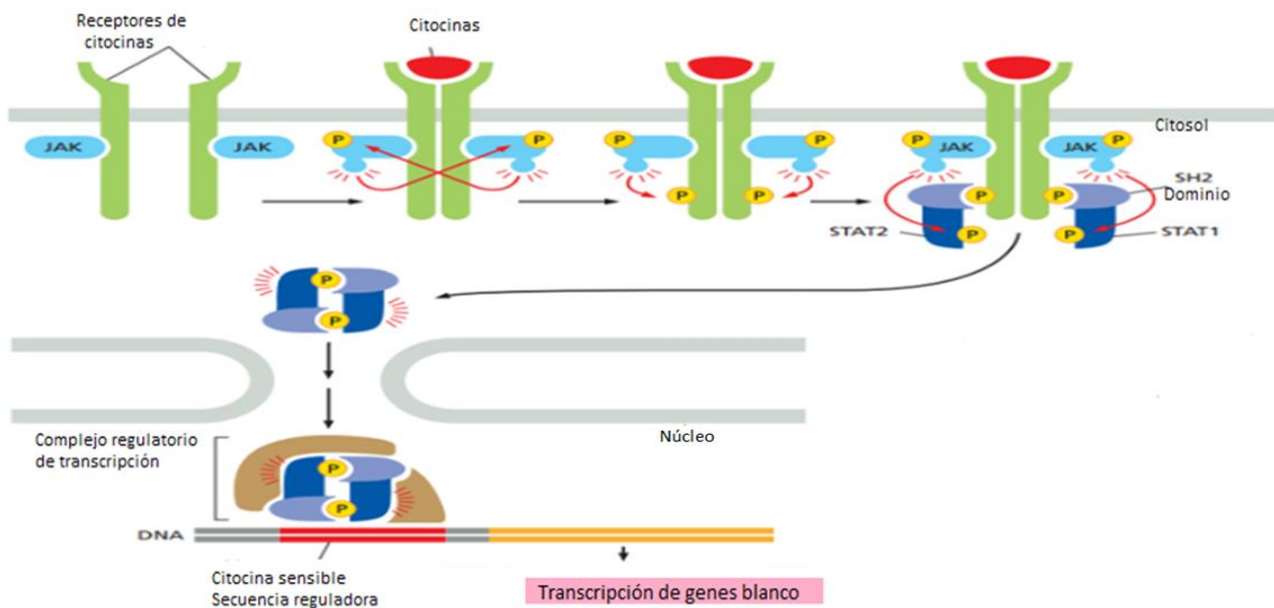


Figura 3. Secuencia de activación de la vía JAK/STAT. (O’Shea et al., 2015)

Uno de los rasgos más característicos de la vía JAK/STAT es su rapidez. La activación máxima de la expresión génica tras su estimulación, por ejemplo con interferón (IFN), se produce en tan sólo 15 a 30 minutos y es independiente de la síntesis de proteínas.(Mendiola & Cruz, 2005).

La enorme cantidad de información generada en los últimos años sobre la vía JAK/STAT ha evidenciado su importancia mediadora de la acción de muchas citocinas y factores de crecimiento sobre procesos celulares primordiales como proliferación, diferenciación y control de la supervivencia o muerte celular. La relevancia biológica de toda esta información ha convertido a la vía JAK/STAT en excelente diana de investigación terapéutica para la farmacología molecular.(Duarte & Frank, 2000).

El siguiente objetivo es traducir nuestro conocimiento progresivo de la patogenia molecular del cancer, en estrategias eficaces que nos permitan tratarlo con mayor especificidad y menor toxicidad. En este sentido, moléculas que como las STAT están en los puntos de convergencia de múltiples estímulos patogénicos, que resultan especialmente atractivas.(Darnell, et al., 2011).Dado que esta vía de señalización se ha encontrado activa en diferentes tipos de cáncer tanto hematológicos como sólidos, resulta importante su estudio.

2.4 Carcinoma Hepatocelular

El CHC es uno de los cánceres más comunes y agresivos en todo el mundo, además de ser la principal causa de muerte en pacientes con enfermedad hepática. Siendo este un claro ejemplo de cáncer relacionado con inflamación. (Capece et al., 2013)

El 85% se desarrolla en el contexto de la enfermedad hepática crónica y cirrosis de cualquier etiología, especialmente la asociada con infección por los virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC). Solamente un 15% se presenta en hígados no cirróticos.(Panqueva, 2015)

Los hepatocitos tienen una capacidad extraordinaria de dividirse, y permiten la regeneración en respuesta a agresiones agudas. En condiciones normales, el hígado adulto apenas prolifera. Sin embargo, en respuesta al daño provocado por la inflamación crónica/necrosis el compartimiento de reserva de células progenitoras se activa; en este proceso intervienen diferentes tipos celulares, y factores de crecimiento. Sin embargo, diversos factores etiológicos provocan continuos ciclos de daño y reparación de los hepatocitos, en los que la desregulación de vías de señalización miogénicas puede llevar a la selección de ciertos clones de células displásicas. Estos clones, organizados en nódulos displásicos y rodeados de un septo fibroso de tejido conectivo, tras ser expuestos a alteraciones

genómicas adicionales, adquieren un fenotipo maligno, que culminan en la enfermedad crónica del hígado y desarrollo de la carcinogénesis.(Tovar, et al., 2007)

Para que la regeneración se realice con éxito después de una disminución de la masa hepática, es esencial que se coordinen diversas vías de señalización celular. En contraste con la regeneración, el CHC se caracteriza por una respuesta anormal a las citoquinas y factores de crecimiento y esto ha llevado a un interés en determinar los cambios que ocurren en los mecanismos de transducción de señales de las células hepáticas transformadas para vías normalmente asociadas con el proceso de regeneración. (Moran, et al., 2008)

En los últimos años, se han identificado diferentes vías de señalización implicadas en la hepatocarcinogénesis. Entre ellas, las vías de Wnt, EGFR y PI3k/Akt/mTOR y JAK/STAT, que están constitutivamente alteradas y proporcionan la base molecular para el tratamiento de esta neoplasia. (Duarte & Frank, 2000).

2.4.1 Estadística del cáncer y CHC

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2012 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

1. Pulmonar (1,69 millones de defunciones)
2. Hepático (788 000 defunciones)
3. Colorrectal (774 000 defunciones)
4. Gástrico (754 000 defunciones)
5. Mamario (571 000 defunciones)

En 2015 se reportó que el CHC fue más frecuente en hombres ocupando el 5° lugar con 521,041 casos (11.2 %) y en mujeres ocupa el 9° lugar con 224,492 casos (6.3 %). En México ocupa el 6° lugar en mortalidad con 6,387 casos (7.7 %) y el 7° en incidencia con 6,387 casos (4.3 %) y sigue en aumento (GLOBOCAN, 2012). Sin embargo, las estadísticas más recientes posicionan al CHC en 7° lugar en incidencia, pero como el 4° lugar en mortalidad (GLOBOCAN, 2018).

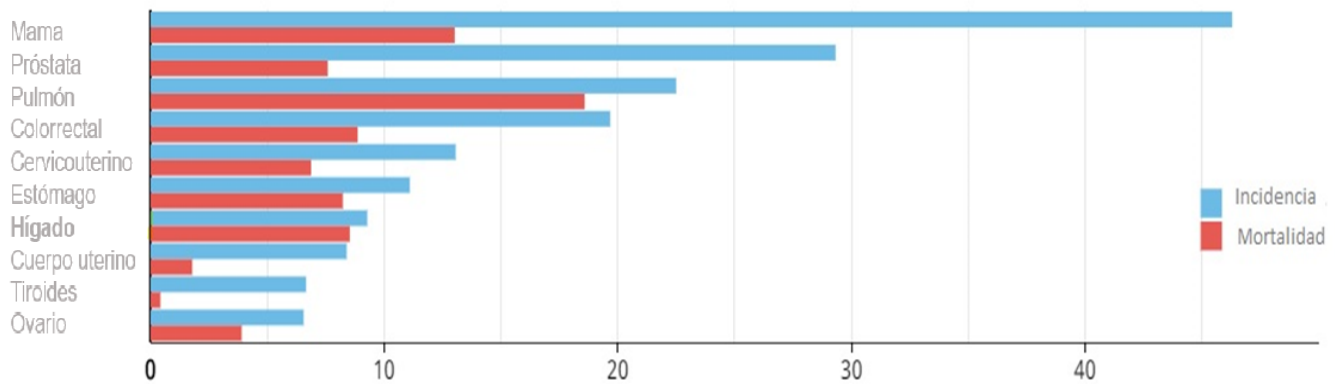


Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad en 2018, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades.

Fuente:2018

El CHC tiene una incidencia muy variable según la edad y zona geográfica: es más frecuente en población mayor de los 65 años. El 80% de todos los HCC ocurre en los países en vías de desarrollo, con una alta incidencia en Asia y en el África Subsahariana, donde puede llegar a 80/100 000 habitantes/año en mujeres y más de 110/100 000 habitantes/año en hombres; la mitad de las muertes ocurre en China. En áreas de baja incidencia, como son los países desarrollados, incluidos Estados Unidos, Europa, Australia y Nueva Zelandia, es de 6,8/100 000 en hombres y de 2,2/100 000 en mujeres.(Panqueva, 2015).

2.4.2 Factores de riesgo asociados al CHC

Estudios epidemiológicos han mostrado los siguientes factores de riesgo asociados al desarrollo de CHC;

- Cirrosis hepática; La cirrosis hepática constituye el principal factor de riesgo de CHC; del 60 al 90% de los pacientes con CHC presentan antecedente de cirrosis. Esta hepatopatía corresponde a un estado preneoplásico, independiente de su etiología. En la literatura se reporta que los pacientes con cirrosis tienen 1.93 veces más riesgo de desarrollar cáncer hepático, que los pacientes con hepatitis crónica en ausencia de cirrosis. El 20% de los pacientes cirróticos desarrollan cáncer hepático en los 5 años siguientes al diagnóstico.(Botero et al., 2007).
- Infecciones por los virus de hepatitis B y C; El 70-85% de todos los CHC están relacionados etiológicamente con la infección crónica por el VHB y VHC. (Solís, et al ., 2005).

- Exposición a la aflatoxina; esta toxina es producida por hongos del género *Aspergillus* que en zonas tropicales y húmedas contaminan los cereales y granos que se encuentran mal almacenados. Es uno de los carcinogénicos más potentes, la mutación específica en el gen p53 inducida por la aflatoxina consiste en un cambio de guanina (G) por tiamina (T) en la tercera base del codón 249 del gen. (Botero et al., 2007).
- Consumo de alcohol; El abuso del alcohol es una de las principales causas de cirrosis. La asociación de alcohol con la infección crónica por los virus de las hepatitis tiene un efecto sinérgico en el riesgo de CHC. (Dasarathy,2010).

En los últimos años se ha demostrado que la diabetes mellitus y otros factores asociados al síndrome metabólico, como la obesidad o la dislipidemia, se asocian a un incremento de muerte relacionada con CHC .(Forner et al., 2009)

2.4.3 Tratamiento de CHC

La elección de la terapia debe estar siempre basada en el estadiaje tumoral en el momento del diagnóstico y en el grado de deterioro de la función hepática.(Osset et al., 2010). A continuación, se enlistan las principales terapias de abordaje.

Resección quirúrgica; Es la primera opción en aquellos tumores únicos, que aparecen en hígados no cirróticos, en los que se pueden realizar resecciones amplias con un bajo riesgo de complicaciones. A pesar de una selección estricta de los candidatos y de los excelentes resultados obtenidos en términos de supervivencia, la tasa de recidiva de la enfermedad es muy alta y puede llegar al 70% a los 5 años. (Forner et al., 2009).

Trasplante hepático; El trasplante hepático es la única terapia curativa tanto del CHC como de la cirrosis hepática subyacente, evitando la aparición de nuevos nódulos de CHC. (Val Antoñana et al., 2010). La aplicabilidad del trasplante es limitada. El número de candidatos excede el número de órganos disponibles y, por lo tanto, hay un tiempo de espera entre la indicación y el trasplante. Durante este tiempo, la neoplasia puede progresar y llegar a contraindicar la intervención. Esta circunstancia puede alcanzar al 25% de los sujetos si la espera es de 12 meses y, la supervivencia de acuerdo con la intención del tratamiento se ve significativamente deteriorada.(Forner et al., 2009).

Ablación percutánea; La ablación percutánea es el tratamiento de elección de aquellos pacientes afectados de CHC en estadio inicial en los que la resección quirúrgica no es posible y el trasplante hepático está contraindicado por enfermedad asociada. Al mismo tiempo, es una opción terapéutica para intentar evitar la progresión tumoral durante el tiempo de espera de trasplante hepático. La ablación del tumor puede realizarse a través de la instilación de sustancias químicas, principalmente etanol y ácido acético, o mediante modificación de la temperatura intratumoral, como en el caso de la radiofrecuencia, crioablación, microondas o láser.(De et al., 2016).

Quimioembolización; Este tratamiento está basado en la vascularización predominantemente arterial del CHC. Consiste en la cateterización selectiva de la arteria hepática, y supra selectiva de arterias nutricias tumorales, y en la inyección de un agente quimioterápico juntamente con la oclusión del flujo arterial mediante una sustancia embolizante.(De et al., 2016).

Radiofrecuencia; La técnica consiste en la aplicación de una aguja-electrodo, habitualmente bajo control ecográfico, en el tejido tumoral conectada a un generador de radio frecuencia. La energía emitida intenta alcanzar su campo eléctrico (una almohadilla colocada en el muslo del paciente), se produce agitación iónica y la energía se convierte en calor. Cuando se alcanza una temperatura $> 50^{\circ}$ C se induce una necrosis coagulativa. (Antoñana et al., 2010).

Quimioterapia convencional; administrada por vía sistémica, a pesar de conseguir en ocasiones respuestas parciales, con reducción de la masa tumoral, no ha demostrado una mejoría de la supervivencia y está relacionada con una toxicidad significativa.(Panqueva, 2015). Tal es el caso de agentes alquilantes, como cisplatino y oxaliplatino, y antimetabolitos como 5-Fluorouracilo, que es un análogo del uracilo, todos estos interfieren con la síntesis del ADN. (Serrano, et ., 2010).

Quimioterapia dirigida; En la última década el esfuerzo por nuevos tratamientos ha rendido frutos y se cuenta en la actualidad con quimioterapia dirigida como es el caso de Sorafenib; es un inhibidor oral multikinasa que actúa bloqueando diferentes vías de señalización (Raf y Jak), aumentando la apoptosis, inhibiendo la proliferación celular y reduciendo la angiogénesis, aunque se desconoce el mecanismo preciso antitumoral. (Panqueva, 2015). Regorafenib; también es un inhibidor oral multikinasa, utilizado en pacientes que previamente han estado en tratamiento con Sorafenib y en los que este último ya no es eficaz, actúa bloqueando diferentes cinasas que intervienen en la angiogénesis tumoral, la oncogénesis, metástasis e inmunidad tumoral. (Armengol, et al., 2017).

Sin embargo, en la actualidad no existe un medicamento o tratamiento eficaz contra el CHC, por lo cual las tasas de incidencia y mortalidad son muy semejantes. Es por esto, que el comprender mejor cuales son las causas e identificar de mejor manera los factores involucrados en el desarrollo de la neoplasia, podrá ofrecer blancos terapéuticos, de esto deriva la importancia de la búsqueda, de nuevas moléculas, que resulten más eficaces y seguras para los pacientes, dentro de estas moléculas se encuentran los compuestos fenólicos, que resultan una atractiva alternativa, al ser moléculas que se encuentran en la dieta diaria.

2.5 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) constituyen uno de los grupos de metabolitos vegetales más grande y más ubicuo. Las frutas suelen ser más ricas en compuestos fenólicos que en las verduras, con un contenido fenólico total tan alto como 1 a 2 g / 100 g de peso fresco en ciertas frutas. Otras fuentes importantes son las bebidas como el vino tinto, el café, el té y los jugos de frutas. Estos compuestos fenólicos se forman para proteger la planta del estrés fotosintético, de las especies reactivas de oxígeno, las heridas y los herbívoros, ellos son los responsables del color y las características sensoriales de las plantas. Son conocidas sus actividades, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas.(Yang, et al .,2002).

Para comprender la estructura química de los compuestos fenólicos es importante comenzar con el fenol, que es la molécula básica. El fenol se compone de un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (OH). La presencia del anillo aromático, genera un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo hidroxilo, haciéndolo más ácido que un alcohol alifático. El anillo aromático juega un papel importante en las propiedades antioxidantes.(Peñarrieta, et al., 2014)

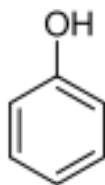


Figura 5. Estructura química del fenol (Tejeda et al.,2014)

Los CF pueden inhibir la carcinogénesis al afectar los eventos moleculares en las etapas de iniciación, promoción y progresión del cáncer. Así mismo en la modulación de los oncogenes, los genes supresores de tumores, el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y las vías de transducción de señales relacionadas a estas. (Yang et al., 2002).

2.5.1 Ácido Gálico

El AG, también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico, es un compuesto fenólico que se encuentra presente en diversas fuentes naturales como

- a) Plantas: *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Turnera difusa* (damiana)
- b) Frutas: uva, granada, nueces, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de manzana y mango
- c) Verduras: acelgas y espinacas
- d) Bebidas: café, vino tinto y té verde

Asimismo, se le atribuyen varios efectos biológicos, que van desde la actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibiótica, hasta la protección cardiovascular y anticancerígena. (Salas et al., 2013).

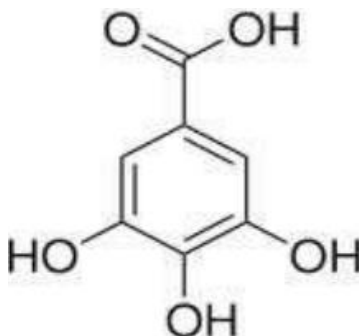


Figura 6. Estructura química del AG (Salas et al., 2013)

El AG tiene aplicaciones en diversas áreas, principalmente en la farmacéutica, ya que es un precursor en la manufactura de antibióticos de amplio espectro como trimetoprima. Además, en el área de alimentos, se ha utilizado como antioxidante de grasas y aceites, así como aditivo en algunas bebidas y alimentos, evitando la oxidación de los mismo. También, el AG es capaz de regular diversos procesos biológicos, como protección cardiovascular, evitando la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan colesterol en la sangre, previniendo así, enfermedades como aterosclerosis. El AG presenta actividad antibacterial, promoviendo la inhibición enzimática de algunos microorganismos, la interacción sobre las adhesinas (proteínas de la pared celular), y la capacidad que tienen de unirse a

polisacáridos, interviniendo así, en el desarrollo microbiano. Además, el AG también destaca por su actividad antioxidante y anticancerígena, debido a que es un compuesto donador de electrones, que neutraliza radicales libres, siendo estos los causantes de algunos padecimientos como envejecimiento, cardiopatías y en algunos casos cáncer.(Lu et al., 2010).

3.- ANTECEDENTES

3.1 Vía JAK/STAT en carcinoma hepatocelular

En contraste con las células normales, en las que la fosforilación de las STAT's ocurre de forma transitoria, se ha determinado que las STAT 1, 3 y 5 son fosforiladas de forma persistente en la mayoría de las neoplasias malignas (en particular, STAT3). La cual es requerida en muchos aspectos de la tumorigénesis, incluida la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, el aumento de la sensibilidad a los agentes citotóxicos, la angiogénesis, el reclutamiento de células inmunes y la metástasis. Los mecanismos por los cuales STAT3 es persistente o constitutivamente fosforilada en cánceres, incluye el aumento en la producción de citoquinas y receptores de citoquinas, que se produce de manera autocrina y paracrina (a partir del microentorno del tumor), una disminución en la expresión de las proteínas SOCS a través de metilación del promotor, y pérdida de tirosina fosfatasas.(Sansone & Bromberg, 2012).

Las funciones específicas que desempeña STAT3 en la inflamación , daño y regeneración hepática a través de su activación en células mieloides y en los hepatocitos son esenciales para prevenir la insuficiencia hepática al atenuar una fuerte respuesta inflamatoria innata.(Saxena et al., 2007)

En un estudio previo con 80 biopsias de CHC, categorizadas en malo y buen pronóstico, de acuerdo con la supervivencia del paciente, se demostró que la activación de las vías de Ras y JAK/STAT es un evento oncogénico dominante en el CHC. Los niveles más altos de efectores de JAK/STAT se observaron en CHC de mal pronóstico, lo que respalda un papel pronóstico importante para esta vía en CHC. Por lo cual la vía JAK/STAT puede constituir una parte importante de la firma molecular universal del CHC. (Calvisi et al., 2006).

De igual manera se ha mostrado que STAT3 activo, en colaboración con otros factores de transcripción, mejora la expresión de los factores nucleares, permitiendo que los hepatocitos en reposo respondan a otros factores de crecimiento y proliferen, culminando en una progresión de la enfermedad y favoreciendo la metástasis. (Moran et al., 2008).

Debido al mal pronóstico y alta recurrencia de CHC, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias quimiopreventivas o terapéuticas que se dirijan de manera selectiva a las moléculas clave expresadas de forma aberrante durante la hepatocarcinogénesis para mejorar la supervivencia del paciente. Los inhibidores de la señalización de JAK/STAT, como Stattic e Inhibitor Jak, (que inhiben la translocación nuclear de STAT3 y la fosforilación de Jak 1-2, respectivamente) inducen la detención del crecimiento, inhiben la angiogénesis y bloquean el reclutamiento de células inmunitarias al tumor, pero rara vez conducen a una abrogación completa o regresión de formación de tumores. (Moran et al., 2008)

Por todo lo anterior la búsqueda de compuestos capaces de inhibir esta vía de señalización, puede resultar en una orientación más efectiva, segura y proporcionar menor resistencia a la quimioterapia convencional.

3.2 Actividad anticancerígena de Ácido gálico

Uno de los enfoques en los estudios actuales de tratamiento del cáncer es la búsqueda de agentes quimiopreventivos, quimiosensibilizantes y quimioterapéuticos no tóxicos, que inhiban el inicio de la transformación maligna y/o den marcha atrás de esta. Dentro de los cuales se encuentran los compuestos fenólicos y es de resaltar al AG, como una de las moléculas con mayor interés de investigación debido a su especificidad por células cancerosas. (Salas et al., 2013)

En diferentes cultivos de células cancerosas, se ha observado que el AG activa la producción de especies reactivas de oxígeno, reduciendo la concentración del glutatión intracelular, causando estrés oxidativo. Dicho efecto produce un desequilibrio celular, dañando las macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos. Por tal motivo, podría utilizarse para reducir la viabilidad de células cancerosas, promoviendo procesos apoptóticos e induciendo citotoxicidad en diversos tipos de cáncer como gliomas, cáncer de próstata, testículos, pulmón, entre otros. (Salas et al., 2013)

A continuación, se presentan algunos estudios en líneas celulares cancerosas, en las que se ha visto un efecto anticancerígeno del AG.

Línea celular	Número de células	Concentraciones de AG probadas µg/mL	Efectos biológicos	Referencias
<u>U87</u> y <u>U251n</u> de gliomas humanos	1 x 10 ³	0, 20, 30 y 40	Reduce la viabilidad, proliferación, angiogénesis e invasión tumoral.	Cai y col., 2010.
<u>A549</u> de adenocarcinoma de pulmón humano	5 x 10 ⁵	0, 50, 100, 200 y 400	Induce apoptosis por aumento de ROS y favorece la activación de la caspasa-3.	Maurya y col., 2010.
<u>22Rv1</u> y <u>DU145</u> de carcinoma de próstata de ratón y células sanas de próstata de ratón <u>PWR-1E</u>	5 x 10 ³	0, 20, 40, 60, 80 y 100	Induce apoptosis, inhibe el crecimiento y proliferación de tumores, antiangiogénesis. Células sanas no hubo cambios significativos.	Kaur y col., 2010.
HeLa de cáncer de cérvix humano y HUVEC, endoteliales de cordón umbilical humano	2 x 10 ⁵	0, 10, 50 y 100	Inhibición de crecimiento, apoptosis y/o necrosis, aumento de producción de ROS y el agotamiento de GSH. No mostró cambios significativos en HUVEC	You y col., 2010.
B16F10 de melanoma murino	2 x 10 ⁵	20 - 100	Induce producción de radicales libres y apoptosis, reduce glutatión y ATP, inhibe adhesión de células tumorales.	Locatelli y col., 2009.

Figura 7. Líneas celulares cancerosas que presentaron cambios biológicos después del tratamiento con AG a diferentes concentraciones. (Salas et al., 2013)

En estudios recientes se demostró que el tratamiento de las células de glioblastoma (tumor que se desarrolla en cerebro y médula espinal) U87 y U251n con AG inhibió la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis, de igual manera disminuyó la invasión y redujo la angiogénesis. (Lu et al., 2010)

Por otro lado, en un estudio in vivo, con ratas macho de cepa albina Wistar, a los que se indujo CHC, por medio de dietilnitrosamina (DEN), uno de los carcinógenos ambientales más importantes, que se sabe que causa perturbaciones en las enzimas nucleares involucradas en la reparación / replicación del ADN y se usa normalmente como carcinógeno para inducir cáncer de hígado en modelos animales.

Se detectaron niveles elevados de las siguientes enzimas; fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, lactato deshidrogenasa, gamma-glutamilttransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina, alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, dichos incrementos son característicos del CHC, posterior al tratamiento con AG 10 mg/ kg de peso, durante 15 semanas, los niveles de estas enzimas disminuyeron drásticamente. Estos hallazgos sugieren que el AG es un potente agente anti proliferativo contra el CHC.(Jagan, et al., 2008)

En nuestro equipo de investigación, se realizó un estudio, en el cual se utilizaron líneas celulares cancerosas de origen hepático, mamario, prostático y cérvico uterino, mostrando que el AG, ácido tánico y etil galato, presentan actividad citotóxica de manera diferencial según el linaje tumoral. (Sánchez-Carranza et al., 2017). Siguiendo esta línea de investigación, se observó que, en células de CHC, el AG reprime la expresión del gen dnmt1 y Fli-, lo que sugiere que este efecto del AG es de hecho una modulación de la vía IL-6/JAK/STAT3/Fli-1. De manera interesante, este efecto no fue observado en células inmortalizadas hepáticas (IHH) sugiriendo de igual manera que la vía IL-6/JAK/STAT3/Fli-1 no está activa (Contreras Zambrano, 2017). Este resultado nos permite postular la necesidad de comprender la acción del AG en la represión de la vía JAK/STAT, en línea celular de cáncer hepático.

4.- JUSTIFICACIÓN

El CHC es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial, en la actualidad no hay una terapia eficaz y la supervivencia es no mayor a 5 años, esto se debe a que la mayoría de los pacientes son diagnosticados en una etapa muy avanzada de la enfermedad, debido a que el inicio de esta, casi siempre, es asintomática. Existe evidencia donde compuestos fenólicos como el AG inhibe el crecimiento e induce muerte celular en células de CHC, además se evidencio que el AG disminuye la expresión de la dnmt1 y Fli-1, genes blanco de la vía de señalización JAK/STAT. El oncogén fli-1, está implicado en la formación de nuevos vasos sanguíneos, invasión y metástasis, además de dnmt1 (DNA metiltransferasa 1) encargado de los procesos de regulación epigenética (estabilidad cromosómica y expresión genética) se encuentra sobreexpresada en CHC. Por lo tanto, estos genes podrían ser marcadores moleculares para pronosticar y/o tratar el CHC, pero es de suma importancia elucidar los mecanismos de represión en esta vía de señalización por la acción de compuestos fenólicos como el AG derivados de extractos de plantas.

5.- HIPÓTESIS

El ácido gálico reprime la vía JAK/STAT en células de Carcinoma Hepatocelular.

6.- OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto del ácido gálico en la represión de la vía JAK/STAT en células de Carcinoma Hepatocelular.

6.2 Objetivos específicos

1. Determinar las concentraciones inhibitorias 50 de; ácido gálico y los inhibidores de JAK y STAT, en células Hep3B.
2. Determinar la concentración inhibitoria 50 del ácido gálico en células IHH .
3. Determinar el efecto del AG en la regulación transcripcional de, dnmt1 y Fli-1 , como blancos de la vía JAK/STAT, en células Hep3B e IHH.
4. Analizar el efecto del AG en la expresión y translocación nuclear de STAT3, en células Hep3B e IHH.
5. Evaluar la acción del AG en la fosforilación y activación de la proteína JAK, en células Hep3B e IHH.

7.- MATERIALES Y METODOS

7.1 Líneas celulares y moléculas

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron las siguientes líneas celulares.

Línea celular	Características
Hep3B	Fuente: ATCC Catalogo: HB-8064 Lote:61778124 Organismo: Homo sapiens Tejido: Hígado Morfología: epitelial Característica: adherente Afección: carcinoma hepatocelular
IHH	Hepatocitos Inmortalizados Humanos Fuente: Donación del Instituto de medicina molecular de Ranguel, Universidad de Toulouse Francia a la Dra. Leticia González Maya. Origen: Generadas mediante transfección de un ADN plásmido que expresa la región genómica del genotipo del VHC (Basu et al, Hanoun et al.,2010) Morfología: epitelial Característica: adherente

Tabla 1. Características de líneas celulares Hep3B e IHH

Agentes, reactivos y anticuerpos

Stattic; Inhibidor STAT3. Cayman Chemical N° 14590

JAK Inhibitor I; Inhibidor JAK1,2. Cayman Chemical N° 15146

Acido gálico; Sigma-Adrich

7.2 Mantenimiento de células

Las líneas celulares IHH y Hep3B son cultivadas en Eagle's Minimun Essential Medium (EMEM), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), glutamina(2µM) y aminoácidos no esenciales, a 37 °C, en atmosfera de CO₂ al 5% y 90% humedad en incubadora NUAIRE.

7.3 Evaluación del efecto citotóxico y determinación de la CI₅₀

Las células Hep3B e IHH fueron sembradas en placa de 96 pozos a una densidad de 4 500 células por pozo y mantenidas en condiciones de cultivo durante 12 horas. Posteriormente las células se trataron con AG, Stattic y JAK Inhibitor I, durante 72 horas. Las concentraciones utilizadas fueron establecidas en función de la literatura publicada; AG (Sánchez Carranza et al. 2017). Stattic (Schust, et al.2006) Jak Inhibitor 1 (Hernández, et al. 2016) y se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Concentraciones para determinación de IC₅₀ en células Hep3B

Concentraciones (Hep3B)		
Ácido gálico	JAK Inhibitor I	Stattic
15 µM	0.1 µM	0.005 µM
30 µM	1 µM	0.05 µM
60 µM	10 µM	0.5 µM
90 µM	100 µM	5 µM
120 µM	500 µM	25 µM
150 µM		

Tabla 3. Concentraciones para determinación de IC₅₀ en células IHH

Concentraciones (IHH)
Ácido gálico
10 µM
50 µM
100 µM
150 µM
200 µM
250 µM
500 µM

Transcurrido el tiempo de incubación se reemplazó el medio de cultivo, por 100 µL de medio fresco, más 20 µL de CellTiter AQueous y se incubo por 2 horas a 37 C° protegido de la luz, posteriormente se midió

la absorbancia a 450 nm en lector de placa, en el cual, el valor de la absorbancia es proporcional a la viabilidad celular. Con los datos obtenidos de la absorbancia se calculó la CI_{50} por medio de regresión con ayuda del programa GraphPad Prism7.0.

7.4 RT- PCR: Análisis de la expresión de genes blancos (dnmt1 y Fli-1)

Las células Hep3B e IHH fueron sembradas en placa de 6 pozos a una densidad de 250 000 células por pozo y mantenidas en condiciones de cultivo durante 12 horas. Posteriormente las células se trataron con AG, Stattic y JAK Inhibitor I a las respectivas IC_{50} , e incubadas por 72 horas. La extracción de RNA se realizó con apoyo del *Kit*: EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit (BS136-K415ROJ. Bio Basic Canadá). El RNA total se cuantificó por NanoDrop (Invitrogen), para determinar la integridad y la pureza del RNA se analizó mediante un gel de agarosa al 0.8 %. Posteriormente, 50 ng de RNA de cada tratamiento fueron sometidos a reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, empleando Verso1-Step RT-PCR Hot-Star Kit (Thermo Scientific AB-1455/A).

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para evaluar el nivel de transcrito de dnmt1 y Fli-1 y GAPDH utilizado como control de concentración de RNA, así como el tamaño del fragmento.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento
dnmt 1 sentido	5'-GTG GGG GAC TGT GTC TCT GT-3'	204 pb
dnmt1 antisentido	5'-TGA AAG CTG CAT GTC CTC AC-3'	
Fli-1 sentido	5'-CGC CAC CCT CTA CAA CAC GGA A-3'	274 pb
Fli-1 antisentido	5'-CGG GCC CAG GAT CTG ATA CGG ACT T-3'	
GAPDH sentido	5'-CAA CGA CCA CTT TGT CAA GC-3'	115 pb
GAPDH antisentido	5'-GGT GGT CCA GGG GTC TTA CT-3'	

Las condiciones establecidas para la evaluación del nivel de expresión de los genes, se realizó de acuerdo con la tabla 5 y 6.

Tabla 5. Condiciones establecidas para evaluar nivel de expresión del gen de la dnmt1. GAPDH fue usado como control de carga.

Etapa	Temperatura	Duración
Obtención del cDNA	50 °C	30 min
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	52 °C dnmt1 / 55 °C GAPDH	35 segundos
Elongación	68 °C	45 segundos

Tabla 6. Condiciones establecidas para evaluar nivel de expresión del gen de Fli-1. GAPDH fue usado como control de carga.

Etapa	Temperatura	Duración
Obtención del cDNA	50 °C	30 min
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	63 °C Fli-1 / 55 °C GAPDH	35 segundos
Elongación	68 °C	45 segundos

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 %, 80 volts, 150 mA, durante 40 minutos y visualizados en el ChemiDoc XRS Imagen System (BioRad). Se realizó el análisis de la densitometría (*imageJTM*) y comparado con el control de carga GAPDH, por medio del programa GraphPad Prism7.0, a través de ANOVA múltiples comparaciones, con un intervalo de confianza de 95%.

7.5 Inmunofluorescencia: Análisis de la expresión y localización de STAT3

Las células Hep3B e IHH fueron sembradas en placa de 24 pozos a una densidad de 37 500 células por pozo y mantenidas en condiciones de cultivo durante 12 horas. Posteriormente las células se trataron con AG, Stattic y JAK Inhibitor I a las respectivas CI_{50} , e incubadas por 72 horas. Transcurrido este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fijaron con 400 μ L de paraformaldehido al 4% en PEM (PIPES 100 mM pH 6.9, EGTA 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM) por 15 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente incubar con 400 μ L paraformaldehido al 4 % en buffer $NaHCO_3$ por 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se realizaron 3 lavados con PBS 1X, para continuar con la permeabilización, adicionando 400 μ L de Tritón al 0.1 % por 10 minutos exactos a temperatura ambiente. Después se agregó el anticuerpo primario anti-Stat (Santa Cruz Biotechnology. INC, sc-8019) a una dilución de 1:250 en PBS 1X con 4% de SFB y se dejó incubar a 4 C° durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS 1X, se agregó el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo Alexa 488 (TermoFisher Scientific. A-21235) a la dilución de 1:500 en PBS 1X con 4% de SFB, se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó incubar durante 1.5 horas a 37 C°, transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se añadió 400 μ L Hoechst (TermoFisher Scientific. 33342) a una dilución de 1:2000 en PBS 1X y se dejó incubar durante 10 minutos a 37 C°. Posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS 1X y se montaron las sliders con 12 μ L de solución de montaje. Las muestras se protegieron de la luz. Las imágenes fueron tomadas por microscopio confocal. Se realizó densitometría a partir de las imágenes (*imageJTM*) y comparado con el control negativo (mascara binaria), en las células sin tratar, por medio del programa GraphPad Prism7.0, a través de ANOVA múltiples comparaciones, con un intervalo de confianza de 95%.

7.6 Western blot: Análisis de expresión de la proteína JAK fosforilada.

Las células Hep3B e IHH fueron sembradas en placa de 6 pozos a una densidad de 250 000 células por pozo y mantenidas en condiciones de cultivo durante 12 horas. Posteriormente las células se trataron con AG, Stattic y JAK Inhibitor I a las respectivas CI_{50} e incubadas por 72 horas. Transcurrido este tiempo, para la extracción de proteínas totales, se utilizó el buffer RIPA (Tris-HCl 50 Mm, NaCl 150 Mm, NP40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1 %) e inhibidores de proteasas (Kocktail, Sigma Aldrich. P8340) y fosfatasas (Sodium orthovanadate, Sigma Aldrich. S6508). Los extractos proteicos se cuantificaron con el Kit de cuantificación **BCATM** Protein Assay Kit (PIERCE), en base a una curva de concentraciones conocidas de BSA. Una vez realizada la cuantificación, se utilizaron 30 μ g de proteína

total, que fueron cargados en un gel de acrilamida al 8% y se separaron por electroforesis. Posteriormente las proteínas fueron electro transferidas durante 2.5 horas a 240 mA a una membrana de PVDF (Immobilon-P de Millipore) en un sistema semilíquido Owl. La membrana fue bloqueada con leche baja en grasa al 5 % en TBS-Tween 0.15 %, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después la membrana se incubo overnight a 4 C° en agitación con Phospho-Jak1 (Tyr1034/1035)/Jak2 (Tyr1007/1008) (E9Y7V) mouse (Cell Signaling Technology 66245) con una dilución 1:250 y GAPDH (Thermo Fisher-Scientific) dilución 1:1000 como control de carga. La membrana se lavó con TBS-Tween 0.15% 3 veces durante 5 minutos cada uno. Posteriormente se incubaron por 1.5 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado m-IgGk BP-HRP (Santa Cruz Biothecnology. sc-516102) a una dilución 1:1000, posteriormente se lavó 3 veces y se revelo con el sustrato quimiolumiscente supersignal west femto máximo sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific, cat. 34094). Las imágenes se adquirieron en equipo C-Digit. Se realizó densitometría a partir de las imágenes de electroforesis (imageJTM) y los resultados se normalizaron con respecto al control de carga GAPDH, por medio del programa GraphPad Prism7.0, a través de ANOVA múltiples comparaciones, con un intervalo de confianza de 95%.

8.- RESULTADOS

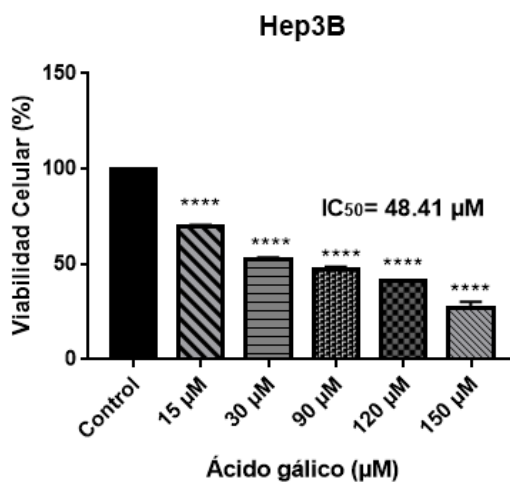
8.1 Efecto citotóxico de Ácido Gálico, Stattic e Inhibitor JAK I en células Hep3B

AG es un compuesto fenólico que ha mostrado efectos citotóxicos en un amplio número de líneas celulares cancerosas. (Verma et, al., 2013). Se determinaron los porcentajes de viabilidad celular en la línea celular Hep3B con los tratamientos a 72 horas. Se graficaron los porcentajes de viabilidad celular contra la concentración utilizada de los compuestos, para la determinación de CI_{50} con ayuda del programa GraphPad Prism 7.00. Como se observa en la tabla 7, la CI_{50} para AG fue de 48 μ M. Cabe destacar, que la viabilidad a distintas concentraciones (Figura 8), muestra que el AG disminuyó la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis.

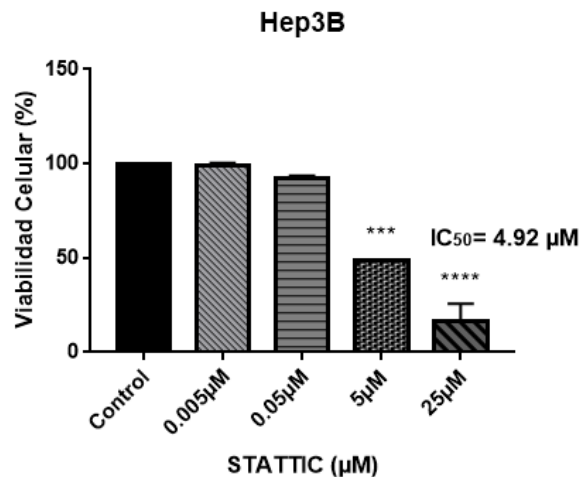
Tabla 7. Resultados obtenidos en la evaluación citotóxica de los compuestos, en células Hep3B.

Compuesto	CI_{50} (μ M)
Ácido Gálico	48.41 \pm 7.47
Stattic	4.92 \pm 0.46
Inhibitor JAK I	153.4 \pm 24.75

A)



B)



C)

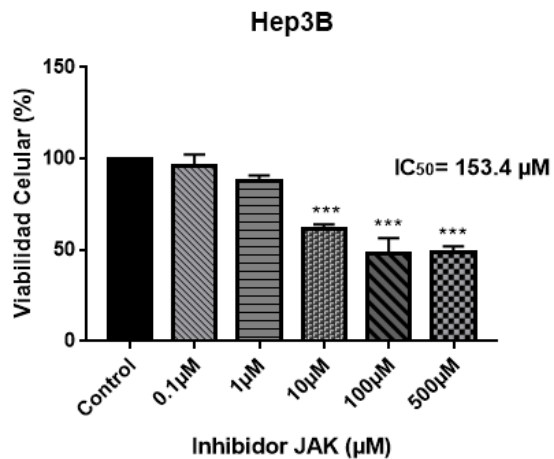


Figura 8. Porcentaje de viabilidad en células Hep3B, después de ser tratadas con AG e inhibidores
Tratamientos de 72 horas; A) AG B) Statin C) Inhibidor JAK I. Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95% en el que *** representa $p < 0.0005$ y **** representa $p < 0.00005$. La concentración de los compuestos se ensayó por triplicado.

8.2 Efecto citotóxico de Ácido Gálico, en células IHH

Para poder evaluar la selectividad de AG hacia líneas celulares cancerosas se evaluó la citotoxicidad de este en una línea celular no cancerosa. Para la determinación de la CI_{50} con ayuda del programa GraphPad Prism 7.0, se graficaron los porcentajes de viabilidad celular contra la concentración utilizada, los resultados se muestran en la tabla 8 y figura 9. Como se puede observar la CI_{50} obtenida para IHH (127.7 μM) es alrededor de **2.6** veces mayor a la de Hep3B (48.41 μM) lo cual resulta favorable desde una perspectiva de seguridad al paciente.

Tabla 8. Resultados obtenidos en la evaluación citotóxica de AG, en células IHH.

Compuesto	CI_{50} (μM)
Ácido Gálico	127.7 \pm 1.25

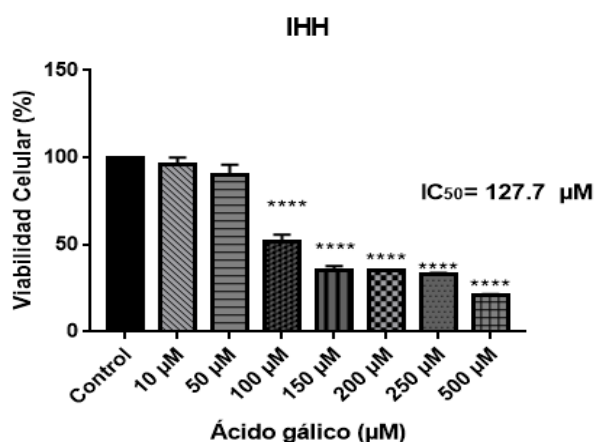


Figura 9. Porcentaje de viabilidad en células IHH, después de ser tratadas con AG.

El tratamiento se realizó por 72 horas, Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95% en el que **** representa $p < 0.00005$. La concentración de los compuestos se ensayó por triplicado.

8.3 Ácido gálico disminuye la expresión del gen dnmt1 en células Hep3B

Uno de los blancos transcripcionales de la vía JAK/STAT es dnmt1, para evaluar si AG influía en la expresión de este gen, se realizó RT-PCR, utilizando las CI_{50} obtenidas previamente y como se puede observar en la figura 10, la expresión del transcrito de la dnmt1 con el tratamiento de AG, se vio disminuida, dicha disminución fue estadísticamente significativa, de manera similar (pero en menor medida) a los controles positivos (Stattic e Inhibitor JAK I), respecto al control.

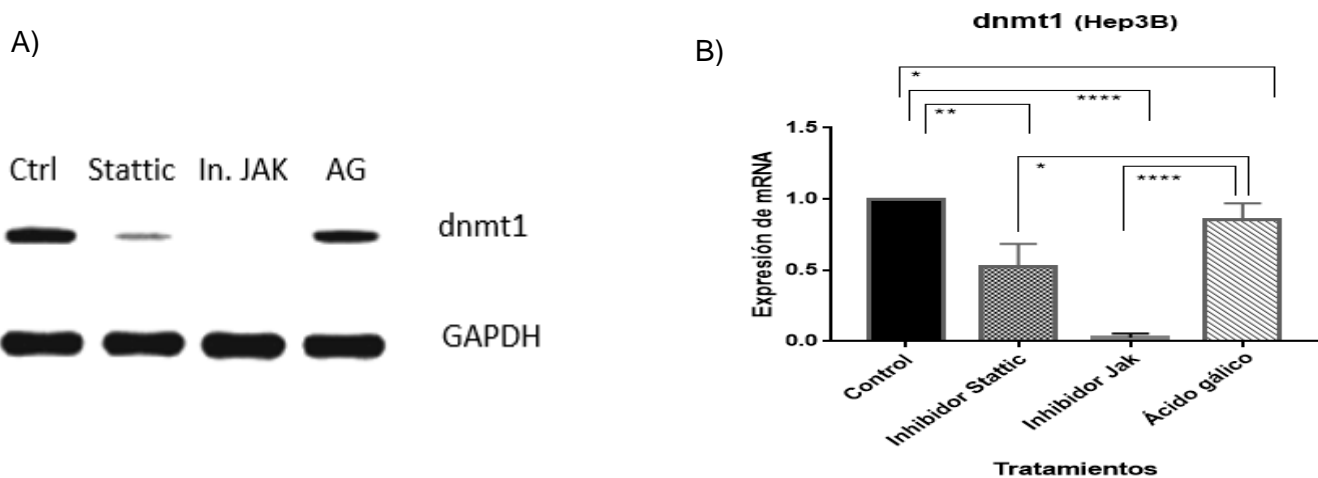


Figura 10. Análisis RT-PCR, para la expresión de dnmt1 en células Hep3B.

A) El control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibidor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M). B). GAPDH fue utilizado como control de carga. Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95% en el que * representa $p < 0.05$, ** representa $p < 0.005$ y **** representa $p < 0.00005$. El experimento se realizó por triplicado.

8.4 Ácido gálico disminuye la expresión del gen Fli-1 en células Hep3B

Otro blanco transcripcional de la vía JAK/STAT es Fli-1, el cual es considerado un oncogen ya que se encuentra sobre expresado en tumores solidos y hematológicos. Su expresión esta asociada a una menor supervivencia en pacientes con cáncer.(Youjun et, al., 2014). Nuestros resultados muestran (figura 11A) una disminución del transcrito de Fli-1 con el tratamiento de AG, que fue estadísticamente significativo, (figura 11B) esto mismo fue observado con ambos inhibidores (Stattic e Ihibitor Jak1) de la vía de señalización, respecto al control. De hecho el patrón de inhibición de la expresión fue muy similar al del gen dnmt1.

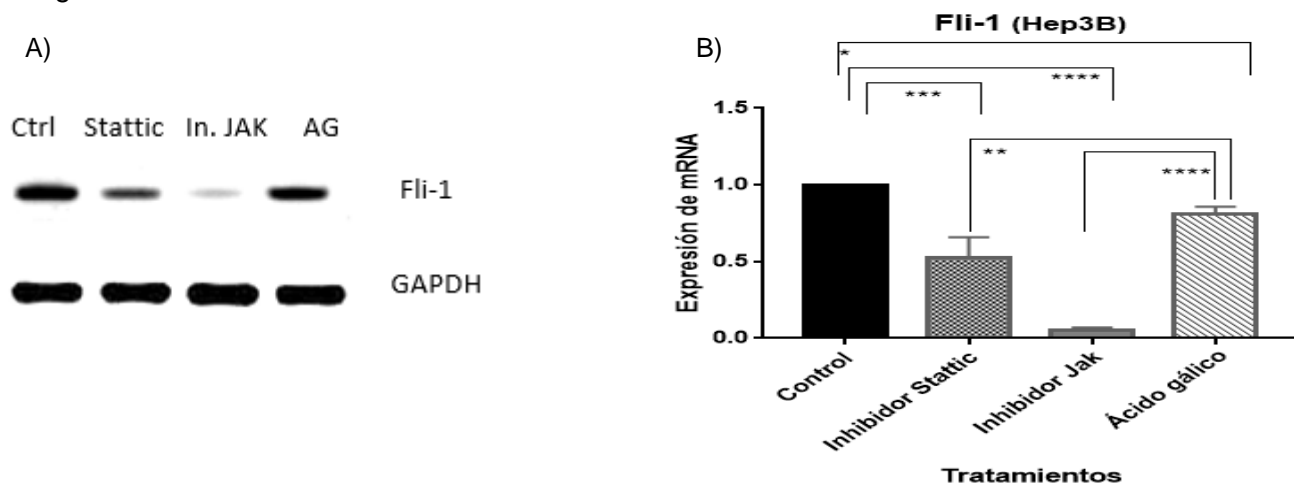


Figura 11. Análisis RT-PCR, para la expresión de Fli-1 en células Hep3B.

A) El control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibidor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M). B). GAPDH fue utilizado como control de carga. Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95% en el que * representa $p < 0.05$, ** representa $p < 0.005$, *** representa $p < 0.0005$ y **** representa $p < 0.00005$. El experimento se realizó por triplicado.

8.5 Ácido gálico no altera la expresión del gen dnmt1 en células IHH

Se utilizaron las CI_{50} obtenidas en células Hep3B, ya que el objetivo era observar que sucedía a esas condiciones en la línea celular no cancerosa IHH, para el caso de la expresión del transcrito de dnmt1 no se vio afectada significativamente con ninguno de los tratamientos respecto al control. (figura 12B) Lo cual sugiere que la vía JAK/STAT no podría estar activa en esta línea celular, no olvidando que existen otras vías de señalización que tienen a dnmt1 como blanco transcripcional. Por otro lado, es claro que los niveles de expresión del transcrito de la dnmt1 entre Hep3B e IHH son diferentes, siendo mayor en las células cancerosas Hep3B

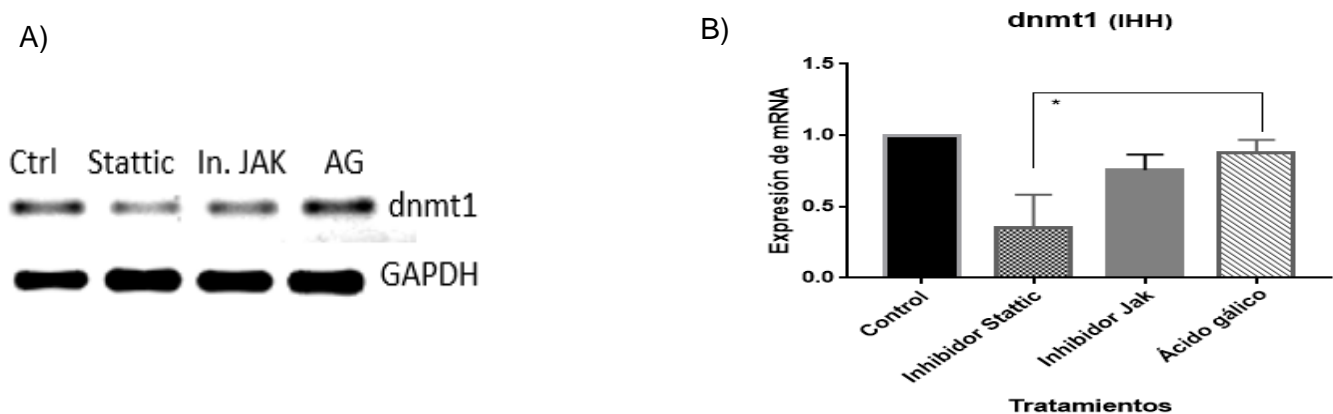


Figura 12. Análisis RT-PCR, para la expresión de dnmt1 en células IHH.

A) El control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibitor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M). GAPDH fue utilizado como control de carga. B) Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95%, en el que * representa $p < 0.05$. El experimento se realizó por triplicado.

8.6 Fli-1 no se encuentra expresado en células IHH

Interesantemente Fli-1 no se encontró expresado en la línea celular IHH (figura 13) lo que puede ser un indicativo de que la vía de señalización JAK/STAT solo se encuentra activa en la línea celular cancerosa y este gen podría ser un marcador molecular específico para CHC, sin embargo, se requieren de más estudios para aseverarlo.

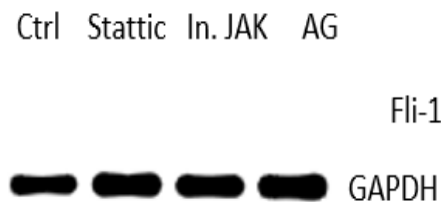


Figura 13. Análisis RT-PCR, para la expresión de Fli-1 en células IHH.

El control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibitor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M). GAPDH fue utilizado como control de carga. El experimento se realizó por triplicado.

8.7 Efecto de ácido gálico sobre la expresión y localización de STAT3 en células Hep3B

La expresión y localización de STAT3 fue observada por medio de inmunofluorescencia. En células sin tratamiento (control) se observa claramente los altos niveles de expresión de STAT3, relacionados a los altos niveles de fluorescencia emitidos (en color verde), así como su particular localización nuclear, (figura 14,1A) que cual indica su estado activo de la vía de señalización; ya que la translocación nuclear de STAT3 ocurre posterior a su fosforilación corriente debajo de la activación del receptor de citocinas y de las proteínas JAKs; el "Merge" muestra la combinación entre la fluorescencia azul (tinción nuclear con Hoechst) y la fluorescencia verde (figura 14, 1A). Por otro lado, las células tratadas con AG mostraron una clara disminución de la expresión de STAT3 con respecto al control (figura 14, 1D), así como un decremento considerable de su traslocación nuclear, lo cual es observado de manera clara en la fusión (Merge) con la tinción del núcleo con Hoechst, donde la fluorescencia azul sobresale y no se combina con la fluorescencia verde (figura 14, 1D). Los controles positivos (inhibidores de STAT3 y JAK1,2) tienen un efecto claro en la disminución y localización nuclear de STAT3 (figura 14, 1B y C). Dado que la translocación nuclear de STAT3 es indicativo de que en la vía de señalización JAK/STAT se encuentra activa, se puede deducir primeramente que esta vía se encuentra activa en las células Hep3B de CHC, y que el tratamiento con AG modula esta activación por medio de la inhibición de la expresión, así como de su activación y, por ende, la inhibición de la translocación nuclear.

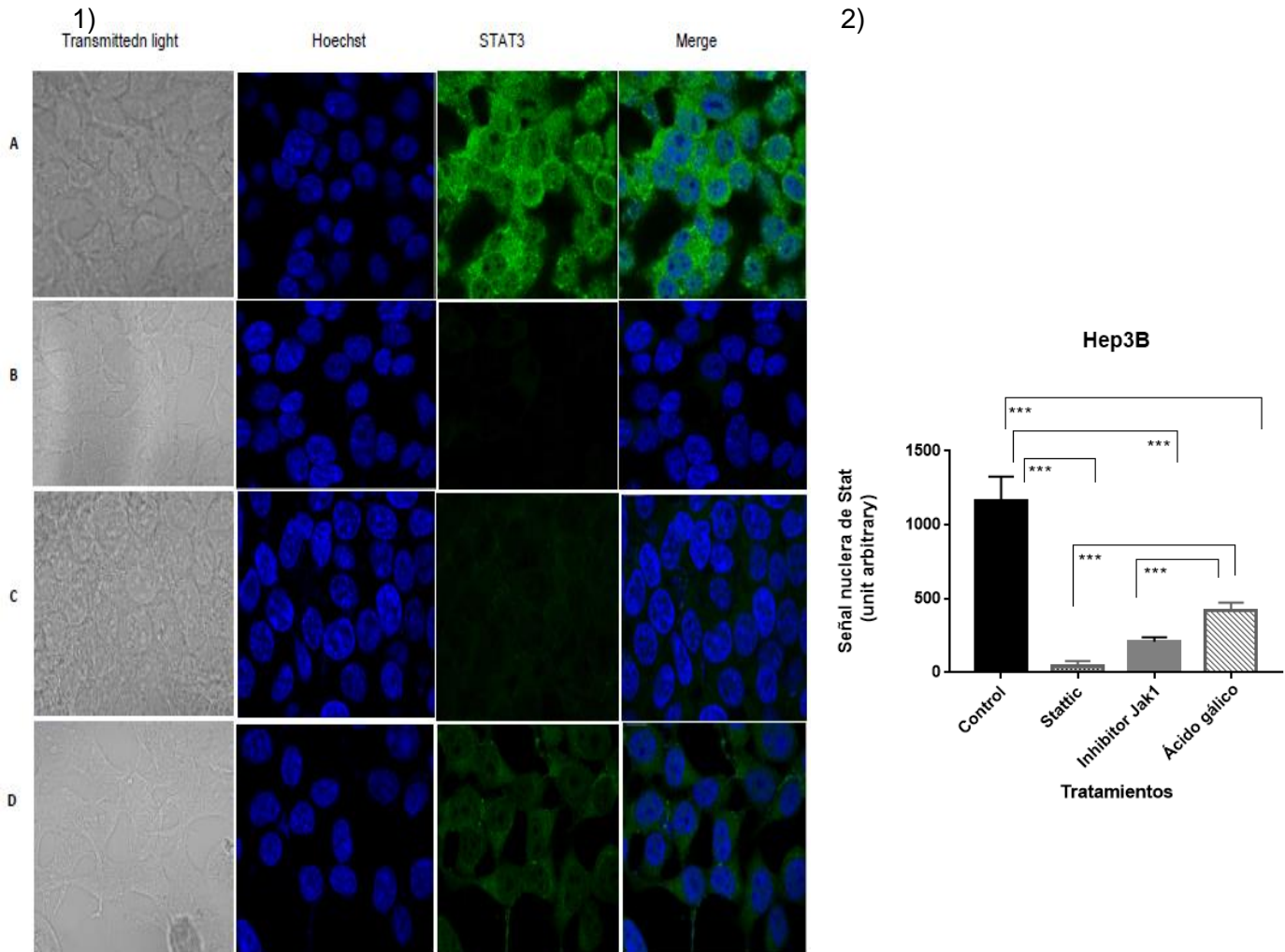


Figura 14. Análisis de efecto de AG en la activación y localización de STAT3 en células Hep3B.

1) Imágenes por microscopía confocal de inmunofluorescencia de células Hep3B; A) El control, son células sin tratamiento B) Stattic es inhibidor de STAT3 (5 μ M) C) Inhibitor JAK I (10 μ M) D) AG (49 μ M), tratamientos de 72 horas. Las células se fijaron, permeabilizaron, se tiñeron inmunológicamente con anticuerpo anti-Stat3 (columna3) de conejo, seguido por anticuerpo secundario anti- conejo acoplado a Alexa 488 y los núcleos se tiñeron con Hoechst (columna2), la cuarta columna muestra las imágenes fusionadas de la segunda y tercera columna. 2) La señal de translocación nuclear de STAT3 fue determinada por densitometría de aproximadamente 20 células de 9 campos ópticos adquiridos, la significancia estadística se determinó por ANOVA de una vía, múltiples comparaciones en GraphPad Prism7.00, con intervalo de confianza de 95% en el que * representa $p < 0.05$, ** representa $p < 0.005$ y *** representa $p < 0.0005$. El experimento se realizó por triplicado.

8.8 Efecto de ácido gálico sobre la expresión y localización de STAT3 en células IHH

Se observó una expresión de STAT3 en la línea celular IHH (figura 15,1), sin embargo, esta señal fue menor a la observada en células Hep3B e interesantemente no hubo variación de los tratamientos respecto al control,(figura15,2) lo cual es indicativo de que AG no modula la translocación nuclear de STAT3 en la línea IHH y que la vía no se encuentra activa en la misma magnitud que la línea celular cancerosa Hep3B.

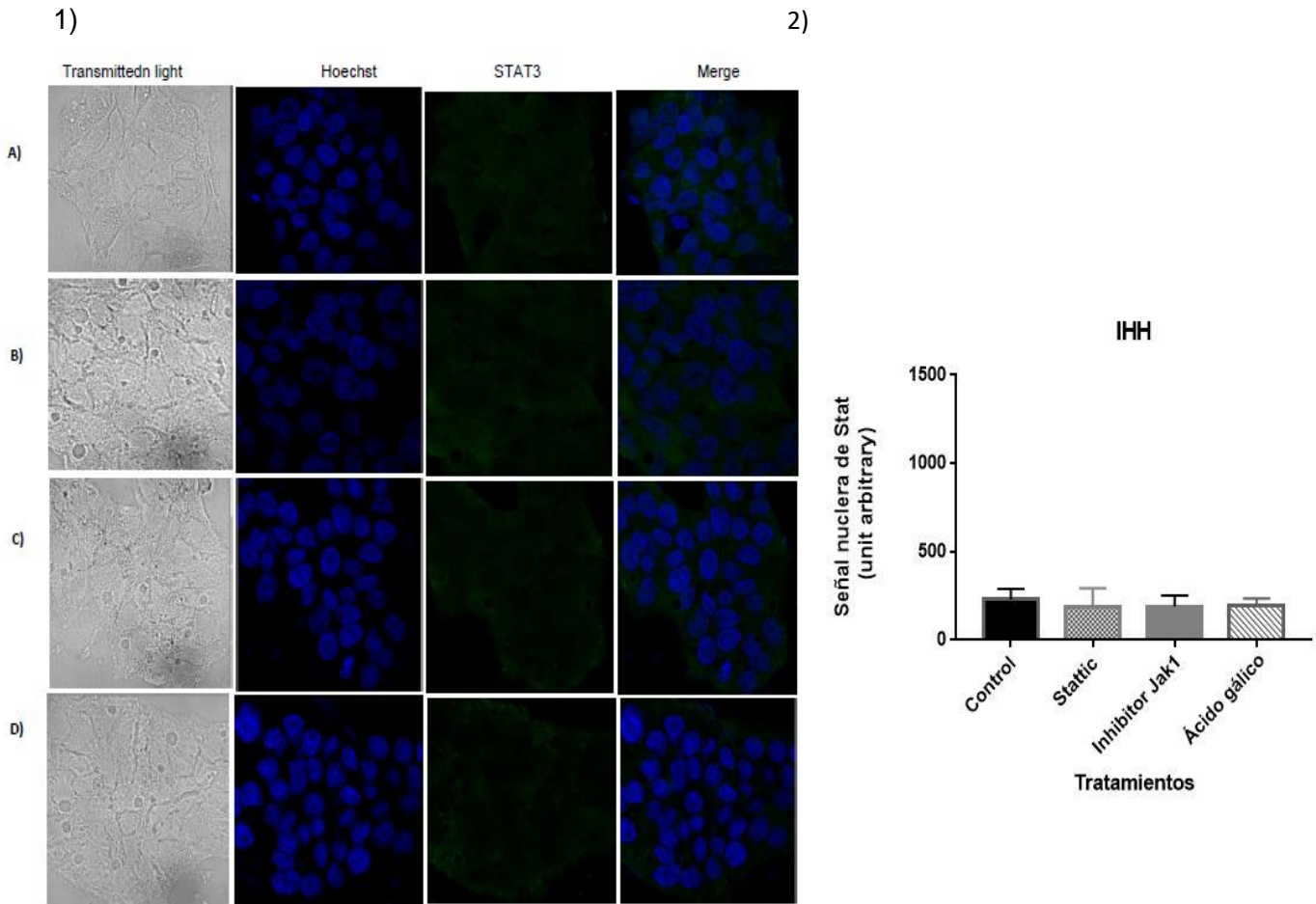


Figura 15. Análisis de efecto de AG en la activación y localización de STAT3 en células IHH.

1) Imágenes por microscopia confocal de inmunofluorescencia de células IHH; A) El control, son células sin tratamiento B) Stattic es inhibidor de STAT3 (5 μM) C) Inhibitor JAK I (10 μM) D) AG (49 μM), tratamientos de 72 horas. Las células se fijaron, permeabilizaron, se tiñeron inmunológicamente con anticuerpo anti-Stat3 (columna 3) de conejo, seguido por anticuerpo secundario anti- conejo acoplado a Alexa 488 y los núcleos se tiñeron con Hoechst (columna 2), la cuarta columna muestra las imágenes fusionadas de la segunda y tercera columna. 2) La señal de translocación nuclear de STAT3 fue determinada por densitometría de aproximadamente 20 células de 9 campos ópticos adquiridos, la significancia estadística se determino por ANOVA de una vía, multiples comparaciones en GraphPad Prism7.00, con intervalo de confianza de 95%. El experimento se realizó por triplicado.

8.9 Efecto de ácido gálico sobre la expresión de proteína Jak fosforilada en células Hep3B

Para determinar el efecto de AG sobre los niveles de p-Jak en células de CHC, se realizó un western blot a partir de extractos de proteínas totales de Hep3B, con tratamientos de 72 horas. Como se muestra en la figura 16 los niveles de p-Jak disminuyeron significativamente con el tratamiento de AG, respecto al control y como era de esperarse con el tratamiento del inhibidor de Jak. Por lo anterior nuestros resultados sugieren la activación de la vía JAK/STAT en esta línea celular y la modulación de AG sobre la misma a nivel de la fosforilación del receptor Jak.

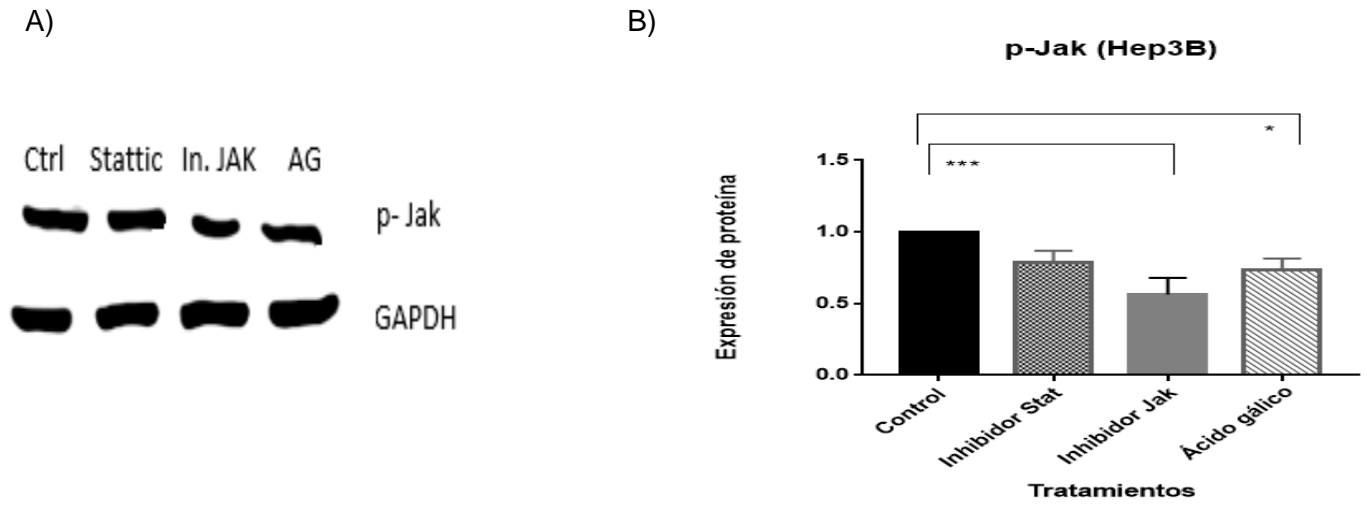


Figura 16. Análisis del efecto de AG en la activación de p-Jak en células Hep3B.

A) AG inhibe la activación de p-jak en células Hep3B; A) Se muestran las bandas, de izquierda a derecha; control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibitor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M), las células fueron tratadas por 72 horas. GAPDH fue utilizado como control de carga. Se obtuvieron extractos proteicos totales y p-Jak fue detectado mediante transferencia Western. B) Se muestra el análisis estadístico ANOVA, con intervalo de confianza de 95% en el que * representa $p < 0.05$ y *** representa $p < 0.0005$. El experimento se realizó por triplicado

8.10 Efecto de ácido gálico sobre la expresión de proteína Jak fosforilada en células IHH

No se observó la expresión de p-Jak en la línea celular no cancerosa, lo cual nos confirma la teoría de que la vía JAK/STAT no se encuentra activa en IHH, y sí en la línea de CHC.

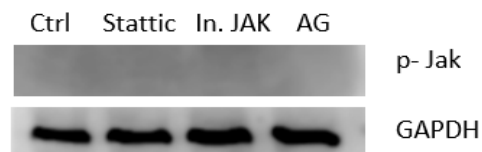


Figura 17. Análisis de efecto de AG en la activación de p-Jak en células IHH

No se encontró presente la activación de p-Jak en células IHH; Se muestran las bandas de izquierda a derecha; control, son células sin tratamiento, Stattic (5 μ M), Inhibitor JAK I (10 μ M) y AG (49 μ M), GAPDH fue utilizado como control de carga, las células fueron tratadas por 72 horas. Se obtuvieron extractos proteicos totales y p-jak fue detectado mediante transferencia Western.

9.- DISCUSIÓN

Desde la antigüedad, las plantas medicinales se han utilizado para prevenir y tratar varias enfermedades crónicas, incluidas el cáncer. Estudios previos muestran que una gran cantidad de compuestos fenólicos han sido identificados y purificados a partir de extractos de frutas y plantas, incluidas aquellas empleadas en la Medicina Tradicional. Los compuestos fenólicos son moléculas que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, y en años recientes, éstos han sido el foco de diversos estudios donde se ha mostrado que pueden inhibir la carcinogénesis al afectar los eventos moleculares en las etapas de inicio, promoción y progresión de la enfermedad; esto también puede estar relacionado con su papel en la resolución y modulación de eventos inflamatorios asociados al desarrollo del cáncer (Jang et al., 2002).

El AG también conocido como ácido 3, 4 ,5-trihidroxibenzoico, es un compuesto fenólico que de igual manera se encuentra presente en diversas fuentes naturales y se ha demostrado que posee un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células cancerosas, entre sus mecanismos de acción se encuentra; la modulación de genes que codifican proteínas para el ciclo celular, así como sus reguladores (Flores, 2018). Además, el AG activa las vías de señalización de la quinasa ATM para prevenir los procesos de carcinogénesis. (Chen et, al., 2007). Los datos disponibles hasta ahora, tanto de estudios in vivo como in vitro, indican que este fenol, podría ser un agente prometedor en el campo de la quimio prevención y tratamiento del cáncer. (Verma et al., 2013).

Los resultados obtenidos, indican que el AG induce un efecto citotóxico selectivo en las células Hep3B de CHC, encontrándose una CI_{50} de 49 μM , mientras que para la línea celular no cancerosa de IHH la CI_{50} fue de 127.7 μM , siendo 2.6 veces mayor que en Hep3B, lo que significaría un primer paso en aspectos de seguridad al paciente, esto resulta concordante con estudios previos. Tal es el caso del tratamiento de las células de glioma U87 y U251n con AG, donde este compuesto fenólico inhibió la viabilidad celular de una manera dependiente de la dosis obteniendo una CI_{50} de 46.4 μM , la cual es muy similar a la obtenida para Hep3B. Es relevante mencionar que los linajes celulares de glioma son en general muy resistentes a los tratamientos con antineoplásicos (Yong et al., 2010). En un estudio previo del grupo de investigación, de donde se aislaron estos compuestos fenólicos a partir del extractos agua:acetona:etanol de la planta *Caesalpinia coraria*, el AG mostró una inhibición de la viabilidad celular en varias líneas cancerosas, como PC3 (carcinoma de próstata) con una CI_{50} de 58.7 μM , CaSki (cancer cervicouterino) con una CI_{50} de 51.72 μM , HepG2 (carcinoma hepatocelular) con una CI_{50} de 16 μM (Sánchez et al., 2017).

Resultados preliminares del grupo de investigación (no publicados), mostraron que componentes del extracto de *Caesalpinia coraria* disminuyeron los niveles de la DNMT1, además del efecto observado por el AG en la disminución del transcrito de la *dnmt1* (Dorian,2017). Lo anterior promovió la hipótesis de que la acción del AG en la regulación de la expresión del gen *dnmt1*, podría ser modulando a través de la vía JAK/STAT que a su vez puede ser activada por la IL-6 e inducir la expresión de la *dnmt1* y Fli-1 (Farrar et, al.,2001).

Con dicha hipótesis en mente, se utilizaron dos inhibidores de la vía de señalización JAK/STAT, como controles positivos. Por un lado, se probó Stattic, que es un inhibidor de la activación y dimerización de STAT3, determinando su CI_{50} de 4.92 μ M. Lo cual empata con estudios previos, en donde Stattic inhibió selectivamente la activación, dimerización y la translocación nuclear de STAT3 y aumento la tasa apoptótica de las líneas celulares de cáncer de mama e hígado dependientes de STAT3, probando dosis de 5 a 20 μ M. (Schust.,et al, 2006).

De igual manera, se utilizó como control el inhibidor Jak 1, obteniendo una CI_{50} de 154.3 μ M; sin embargo, al ser esta una alta concentración, se encontró en la literatura que en diversos estudios se han utilizado concentraciones que van de 0.1 a 10 μ M, logrando la inhibición de la fosforilación de Jak, (Lee et, al., 2017), que resulta ser el objetivo de la utilización de este inhibidor, por lo cual, se decidió utilizar la concentración de 10 μ M, para los experimentos a 72 horas.

Posteriormente, se indago en la acción del AG sobre la expresión del transcrito de genes blancos de la vía JAK/STAT. En el cual se observó una disminución significativa del gen *dnmt1* en células Hep3B, respecto al control. Un efecto similar se obtuvo con el ácido ursólico (AU) que inhibió el crecimiento de células de CHC e indujo apoptosis de forma dependiente de la dosis y el tiempo, encontrando que AU promovió la fosforilación de la proteína quinasa alfa activada por AMP (AMPK α) y suprimió la expresión proteica de la DNMT1 de manera dependiente de la dosis en células HepG2. (Tang, et al., 2014). Por otro lado, se han encontrado algunos otros compuestos fenólicos, como epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), que inhibió la metilación del ADN mediada por DNMT1 de una manera dependiente de la concentración.(Lee et, al., 2005).

Otro blanco transcripcional de la vía JAK/STAT es Fli-1, en el cual se observó una disminución estadísticamente significativa con el tratamiento de AG respecto al control, esto resulta sumamente interesante ya que Fli-1 es considerado como un oncogén y se ha demostrado que aumenta la proliferación celular y tumorigénesis en muchos tipos de cáncer. (Hung-pie 2017). Nuestros resultados concuerdan con lo mostrado por Farrar y colaboradores, en el que mostraron que en células de leucemia

eritroblástica la sobreexpresión de Fli-1 en las células tratadas con IL-6, y de manera interesante esta expresión se vio reprimida, con un inhibido específicamente de JAK, lo que sugiere que la expresión de Fli-1 está regulada por la vía de señalización IL-6/JAK/STAT/Fli-1. (Farrar et al., 2002). Por otro lado, nuestros resultados mostraron que en la línea celular no cancerosa IHH, la expresión de dnmt1, no se vio afectada con los tratamientos. No obstante, esto no significa que la vía JAK/STAT se encuentre activa, ya que se ha demostrado que dnmt1 es blanco transcripcional de otras vías de señalización, por ejemplo, NF- κ B (Jung et al., 2017). En otro orden de los resultados, Fli-1 no se encontró en la línea IHH, lo cual resulta indicativo de que este último gen, podría ser un marcador molecular de cáncer, en este caso para CHC. Tal como ya se ha mencionado en estudios previos (Rumboldt et al., 2014). Sin embargo se requieren más experimentos en muestras de hepatocitos normales para poder aseverar esta propuesta.

Continuando con la búsqueda de acción del AG sobre la vía de señalización JAK/STAT, se analizó la activación y translocación nuclear de STAT3 en células Hep3B, logrando concluir que la vía de señalización JAK/STAT se encuentra activa, ya que en las células control, observo una gran expresión y translocación nuclear de STAT3, mientras que las células con el tratamiento de AG se observó una disminución estadísticamente significativa tanto de la expresión como de la translocación nuclear de STAT3, con lo que se reafirma la hipótesis de que AG modula la activación de esta vía de señalización. Esta idea se sustenta con el trabajo de Buyun y colaboradores, en el que observaron que la crocina, un importante carotenoide glicosilado derivado del azafrán, mostró la modulación de la vía de IL-6 / STAT3, por medio de la inhibición de la activación de STAT3 inducida por IL-6 en las células Hep3B y HepG2 de CHC, encontrando además que la crocina regula negativamente la expresión de proteínas antiapoptóticas expresadas por STAT3 (Bcl-2, survivina), proliferativas (ciclina D1), invasivas (CXCR4) y angiogénicas (VEGF). (Buyun & Byoungduc 2018). Por otro lado, en un estudio similar, se examinaron los efectos inhibitorios de ácido ursólico (AU), sobre la fosforilación de STAT3, junto con la viabilidad celular, la migración, la formación de colonias in vitro, así como el crecimiento tumoral in vivo en líneas celulares de cáncer de hígado humano, mostrando que AU inhibió la p-STAT3 inducida por la IL-6 en células de cáncer de hígado Hep3B, de igual manera la fosforilación constitutiva de STAT3 también fue inhibida por AU en otras líneas celulares de CHC, como HEPG2, 7721 y Huh7, en donde además, también se suprimió la viabilidad celular, la migración y la formación de colonias. (Tianshut et al., 2017). Nuestros resultados mostraron que existe una señal muy débil de la expresión y translocación nuclear de STAT3 en células IHH, y esta no se ve afectada por el tratamiento con AG, lo cual nos resulta indicativo de que la vía de señalización JAK/STAT está activa específicamente en la línea cancerosa de Hep3B, mas no así en la línea celular no cancerosa IHH.

Finalmente, se evaluó la expresión de la proteína Jak fosforilada (p-Jak), nuestros resultados indican que AG reprime la expresión de p-Jak en células Hep3B, de manera estadísticamente significativa. Dado que la expresión de p-Jak es indicativo de la activación de la vía JAK/STAT, este resultado reafirma el planteamiento de que AG es un inhibidor de la vía JAK/STAT. Un efecto similar se obtuvo con ácido ursólico (AU) en células de CHC, en el cual se inhibió la expresión tanto de p-Jak, como p-STAT3 de manera concentración dependiente. Dando como resultado la inhibición de la viabilidad celular y la migración *in vitro* y por otro lado redujo el crecimiento tumoral *in vivo*. (Tianshu, et al.,2017). O como sucedió en células de cancer de mama triple negativo, en donde por medio del tratamiento de Galotanino, que es un compuesto fenólico, que es de resaltar está formado por varias moléculas de AG, condujo a una inhibición total de p-Jak1 y p-STAT3, dependientes de la concentración y el tiempo. (Jeong et, al., 2011). De acuerdo con nuestros resultados en la línea celular no cancerosa IHH no se observó expresión de p-Jak, sugiriendo que la vía de señalización JAK/STAT no se encuentra activa.

Finalmente, este estudio contribuye a las bases de la acción de AG en células Hep3B, además AG resulta un compuesto fenólico importante derivado de su selectividad citotóxica en CHC con respecto a lo observado en IHH. A razón, de las altas tasas de mortalidad para el CHC y dado que no existen inhibidores de JAK/STAT aprobados para ser utilizados clínicamente para el tratamiento o prevención del cáncer de hígado, se incita a continuar con las investigaciones en nuevas moléculas que sean eficaces y seguras para la farmacoterapia de dicha patología.

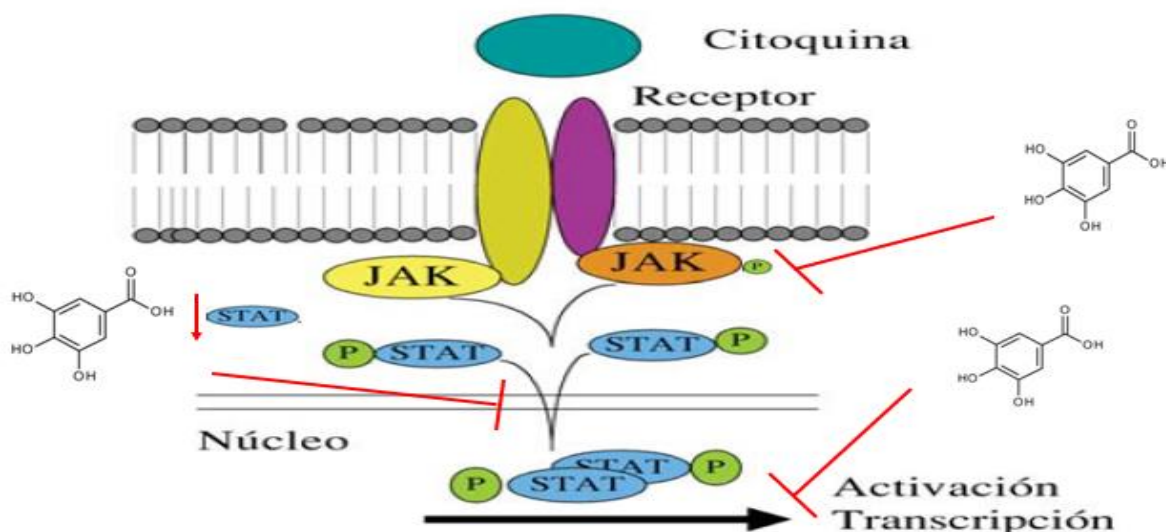


Figura 18. Modelo del mecanismo de acción de AG en células de CHC, Hep3B

AG en células de CHC a concentraciones por arriba de 48 μ M provoca una inhibición del 50% de la viabilidad celular. Por otro lado, AG disminuye la expresión proteica de p-Jak y por ende su activación, de igual manera reprime tanto la expresión como la translocación nuclear de STAT3 y por último ejerce una acción represora en la expresión de genes blancos de la vía, tal es el caso de dnmt1 y Fli-1.

10.-CONCLUSIONES

10.1 General

- ✓ El presente trabajo proporciona evidencia concluyente de que el AG reprimió la vía de señalización JAK/STAT en células Hep3B de CHC.

10.1 Específicas

- ✓ AG ejerce un efecto citotóxico de manera específica en células Hep3B de CHC, respecto a la línea celular NO cancerosa IHH.
- ✓ AG disminuye la expresión del transcrito de genes blancos de la vía JAK/STAT, tal es el caso de dnmt1 y Fli-1, en línea celular Hep3B.
- ✓ AG reprime de manera significativa la expresión y translocación nuclear de STAT3 en células Hep3B.
- ✓ AG disminuye la expresión de la proteína p-Jak en células Hep3B.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Alejandra Botero Toro Marcela Londoño Sanin, M.-C. N. (2007). Epidemiología y factores de riesgo de carcinoma hepatocelular. *Latreia* 20(1), 64–73.
- ✓ Armengol, C., Sarrias, M. R., & Sala, M. (2017). Carcinoma hepatocelular: presente y futuro. *Medicina Clínica*, 150(10), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.08.010>
- ✓ Barberis, I., Martini, M., Iavarone, F., & Orsi, A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 57(1), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- ✓ Zheng, B. Z, Liu, T. D, Chen, G., Zhang, J. X, Kang, X. (2018) The effect of curcumin on cell adhesion of human esophageal cancer cell. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2(22) 551-560
- ✓ Calvisi, D. F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E. A., Lee, J. S., ... Thorgeirsson, S. S. (2006). Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC. *Gastroenterology*, 130(4), 1117–1128. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.006>
- ✓ Capece, D., Fischietti, M., Verzella, D., Gaggiano, A., Ciccirelli, G., Tessitore, A., ... Alesse, E. (2013). The Inflammatory Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma: A Pivotal Role for Tumor-Associated Macrophages. *BioMed Research International*, 2013, 1–15.
- ✓ Cruz, I. S. (2003). Transducción De Señales Y Cáncer. Vertientes. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 6(1), 45–50.
- ✓ Hyo-Jeong Lee, Nam Jun Seo, Soo Jin Jeong, Yongjin Park, Deok Beom Jung, Wonil Koh, Hyo Jung Lee, Eun-Ok Lee, Kwang Seok Ahn, Kyoo Seok Ahn, Junxuan Lu and Sung Hoon Kim. Oral administration of penta-O-galloyl- β -d-glucose suppresses triple-negative breast cancer xenograft growth and metastasis in strong association with JAK1-STAT3 inhibition. *Carcinogenesis* 32 (6) 804-811.
- ✓ Tianshu Liu, Haiyan Ma, Wei Shi, Jialin Duan, Yina Wang, Cuntai Zhang, Chenglong Li, Jiayuh Lin, Sheng Li, Jiagao Lv And Li Lin. (2017) Inhibition of STAT3 signaling pathway by ursolic acid suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*. 2 (51) 555-562
- ✓ David R. Hodge, Dapei Li, Sheng Mei Qi, and William L. Farrar (2002). IL-6 induces expression of the Fli-1 proto-oncogene via STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (1) 287-291
- ✓ Darnell, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R., & Jr, J. E. D. (2011). Jak-STAT Pathways to IFNs Response and Other Transcriptional Activation in Extracellular Signaling Proteins. *Advancement Of Science*,

264(5164), 1415–1421.

- ✓ Xiaoli Xu, Junyu Shi, Hongyan Gao and Qin Li (2018). Zeylenone inhibits proliferation and promotes apoptosis in ovarian carcinoma cells via Janus kinase 2 / signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 8(44) 1451-1457.
- ✓ De, D., Sastre, J., Martí-bonmati, L., Llovet, J. M., Bilbao, J. I., Sangro, B., ... Bruix, J. (2016). Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular., 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.01.028>
- ✓ Douglas Hanahan* and Robert A. Weinberg. (2000). The Hallmarks of Cancer. *The Journal Cell*, 100(9), 57–70. <https://doi.org/10.1007/BF03091804>
- ✓ Duarte, R. F., & Frank, D. A. (2000). La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis , inmunomodulación y desarrollo. *Medicina Clínica*, 114(6), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(00\)71252-8](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(00)71252-8)
- ✓ Forner, A., Ayuso, C., Isabel Real, M., Sastre, J., Robles, R., Sangro, B., ... Bruix, J. (2009). Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Medicina Clinica*, 132(7), 272–287. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2008.11.024>. globocan. (2012). globocan.
- ✓ Hodge, D. R., Li, D., Farrar, W. L., & Qi, S. M. (2002). IL-6 induces expression of the Fli-1 proto-oncogene via STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(1), 287–291. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6652>
- ✓ Jagan, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Kamaraj, S., & Devaki, T. (2008). Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 319(1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9876-4>
- ✓ Li, Y., Luo, H., Liu, T., Zacksenhaus, E., & Ben-David, Y. (2014). The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease. *Oncogene*, 34(16), 2022–2031. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.162>
- ✓ Melissa N. Scheiber, Patricia M. Watson, Tihana Rumboldt, Connor Stanley, Robert C. Wilson, Victoria J. Findlay, Paul E. Anderson and Dennis K. Watson.(2014) FLI1 Expression is Correlated with Breast Cancer Cellular Growth, Migration, and Invasion and Altered Gene Expression. *Neoplasia*. 16 (10) 801-813.URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2014.08.007>.
- ✓ Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, Cai, Y, S. S. T. (2010). Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology*, 641(2–3), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.05.043>
- ✓ Luz M. Bustamante, S. J. M. O. D. C. (2011). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte

- del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(1), 17–25. <https://doi.org/10.3109/00365599109024527>
- ✓ Mendiola, A. V., & Cruz, I. S. (2005). Vía JAK-STAT: Una vision general. *Vertientes Revista Especializada En Cincias de La Salud*, 8, 14–25.
 - ✓ Moran, D. M., Mattocks, M. A., Cahill, P. A., Koniaris, L. G., & McKillop, I. H. (2008). Interleukin-6 Mediates G0/G1 Growth Arrest in Hepatocellular Carcinoma Through a STAT 3-Dependent Pathway. *Journal of Surgical Research*, 147(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.04.022>
 - ✓ O’Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. *Annual Review of Medicine*, 66(1), 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
 - ✓ Panqueva, R. del P. L. (2015). Hepatocarcinoma : papel de la biopsia hepática , estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia Digestiva, Coloproctología y Hepatología*, 1, 232–242.
 - ✓ Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Bolivian Journal of Chemistry* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>
 - ✓ Pérez-Cabeza de Vaca, R., Cárdenas-Cárdenas, E., Mondragón-Terán, P., Argentina, A., & Solís, E.-V. (2017). Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Rev Esp Méd Quir*, 22, 171–181. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2017/rmq174d.pdf>
 - ✓ Salas, M. G., Zugasti Cruz, A., Yesenia, S., Belmares, S., Urdiales, B. V., Herrera, R. R., ... Chávez, J. M. (2013). Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Acta Química Mexicana*, 5(9), 5–11. Retrieved from <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.9/2.-GoveaSalas.pdf>
 - ✓ Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., ... González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, 22(4), 14. <https://doi.org/10.3390/molecules22040666>
 - ✓ Sánchez, C. (2013). Conociendo Y Comprendiendo La Célula Cancerosa : Fisiopatología Knowing and Understanding the Cancer Cell: *Physiopathology of Cancer*. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
 - ✓ Sansone, P., & Bromberg, J. (2012). Targeting the interleukin-6/jak/stat pathway in human malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 30(9), 1005–1014.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.8907>

- ✓ Saxena, N. K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D., & Anania, F. A. (2007). Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, 67(6), 2497–2507. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3075>
- ✓ Schneider, W., Dittmann, M., & Rice, C. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(3), 513–545. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- ✓ Shrihari, T. G. (2017). Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancer medical science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.721>
- ✓ Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., ... Bishayee, A. (2014). Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1845(2), 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.005>
- ✓ Solís-Herruzo, J. A., & Solís-Muñoz, P. (2005). Virus de la hepatitis y carcinoma hepatoculilar. *Anales de Medicina Interna*, 22(4), 5–9. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005000400001
- ✓ Tovar, V., Villanueva, A., & Llovet, J. M. (2007). Biología celular y genética en el cáncer de hígado. *Gastroenterología y Hepatología*, 30(CI).
- ✓ Val Antoñana, A. del, Ortíz Polo, I., López Serrano, A., & Moreno-Osset, E. (2010). Tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Anales de Medicina Interna*, 19(10), 533–538. <https://doi.org/10.4321/s0212-71992002001000010>
- ✓ Wang, S. W., & Sun, Y. M. (2014). The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 44(4), 1032–1040. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2259>
- ✓ Yang, C. S., Maliakal, P., & Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42(1), 381–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.082101.154309>.
- ✓ Kim, Buyun, Park, Byoungduck (2018) Saffron carotenoids inhibit STAT3 activation and promote apoptotic progression in IL-6-stimulated liver cancer cells, *Oncology Reports*, 39(4), 1883-1891.
- ✓ Chang Liua,1, Gui-Nan Shena,1, Ying-Hua Luob,1, Xian-Ji Piaoc,1, Xue-Yuan Jianga, Ling-Qi Menga, Yue Wang, Yi Zhanga, Jia-Ru Wang, Hao Wang, Wan-Ting Xua, Jin-Qian Lia, Yang Liua, Yi-Qin Wua, Hu-Nan Suna, Ying-Hao Hana, Mei-Hua Jina, Yu-Dong Cuia, Nan-Zhu Fangd, (2018)Cheng-Hao Jina. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-

mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 96, 9-19.

- ✓ Ko, Jeong Hyeon Sethi, Gautam Um, Jae Young Shanmugam, Muthu K. Arfuso, Frank Kumar, Alan Prem Bishayee, Anupam, Ahn, Kwang Seok. (2017). The role of resveratrol in cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(12). 1-36.
- ✓ Sharad Vermaa, Amit Singhb, Abha Mishra. (2013) Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 35 (3). 473-485.
- ✓ Verena Leidgens, Judith Proske , Lisa Rauer, Sylvia Moeckel1, Kathrin Renner, Ulrich Bogdahn, Markus J. Riemenschneider, Martin Proeschold, Arabel Vollmann-Zwerenz, Peter Hau, Corinna Seliger (2016). Stat3 and metformin inhibit brain tumor initiating cells by reducing STAT3-phosphorylation. *Oncotarget*. 8(5), 8250-8263.
- ✓ Chang-hong Lia, Lin-lin Xub, Lei-lei Jiana, Ruo-han Yua, Jin-xia Zhaoa, Lin Suna, Guo-hong Duc, Xiang-yuan Liua, (2017) Stat3 inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing activation of STAT3 and NF- κ B pathways. *International Immunopharmacology*. 58 (2017). 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.021>.
- ✓ Hye-Sook Seo, Jin Mo Ku, Hee-Jae Lee, Jong-Kyu Woo, Chunhoo Cheon, Mia Kim, Bo-Hyoung Jang, Yong Cheol Shin and Seong-Gyu Ko. (2017) SH003 reverses drug resistance by blocking signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in breast cancer cells. *Bioscience Reports* 3, 1-13.
- ✓ Yinyi Yie, Shunyu Zhao, Qin Tang, Fang Zheng, Jingjing Wu , LiJuan Yang, ShiGuan Deng , Swei Sunny Hann. (2014) Ursolic acid inhibited growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells through AMPK α -mediated reduction of DNA methyltransferase 1. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 402 (5) 63-74
- ✓ Won Jun Lee, Joong-Youn Shim, and Bao Ting Zh (2005). Mechanisms for the Inhibition of DNA Methyltransferases by Tea Catechins and Bioflavonoids. *Molecular Pharmacology* 4(68) 1018-1030.
- ✓ Hung-Pei Tsai, Tai-Hsin Tsai, Ya-Ju Hsieh , Yi-Ting Chen , Chih-Ling Lee , Yi- Cheng Tsai, Ting-Chang She, Chih-Lung Lin, Chee-Yin Chai, Aij-Lie Kwan. (2017). Overexpression of Fli-1 in astrocytoma is associated with poor prognosis. *Oncotarget*. 8 (17) 29174-29186.

12.- ANEXOS

12.1 Preparación de reactivos y soluciones.

Preparación de medio de cultivo EMEM

Disolver 1 sobre de EMEM en 800 ml de agua tipo 1

Pesar y agregar a esta solución 2.2 g de NaHCO₃

Ajustar pH a 7.1- 7.3 con HCL 1 N

Aforar a 1 litro y filtrar con unidad de filtración y membrana de nitrocelulosa a 0.22 µm en campana de flujo laminar y almacenar en frascos estériles a 4°C.

PBS 1X

8.0 g de NaCl

0.2 g KCl

1.15 g de Na₂HPO₄

0.27 g de KH₂PO₄

Pesar cada uno de los compuestos y disolver en 300 ml de agua tipo 1, llevar a un volumen final de 1 litro, filtrar con membrana de nitrocelulosa 0.22 µm en campana de flujo laminar, se alemana a temperatura ambiente.

Tripsina al 0.25%

2.5 g de tripsina

8.0 g de NaCl

0.58 g de NaHCO₃

0.2 g de EDTA

1.0 g de dextrosa

Pesar cada uno de los compuestos y disolver en 800 ml de agua tipo 1 y llevar a un volumen final de 1 litro, filtrar con membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm en campana de flujo laminar y conservar en tubos de 15 ml estériles a -20 °C.

Preparación de RIPPA

NaCl 150 mM

Tris HCl 50 mM

SDS 0.1%

Deoxicolato de sodio 0.5%

NP40 0.3 ml

Aforar a 30 ml de agua tipo 1, mantener a 4 °C

Solución Acrilamida-Bis

Acrilamida 14.6 g

Bis-acrilamida 0.4 g

Agua desionizada 50 ml

Mantener a 4 °C, protegido de la luz.

SDS al 5 %

SDS 2.5 g

Agua desionizada 50 ml

almacenar a temperatura ambiente

Solución 1.5 M tris-HCl pH 8.8

Tris-base 18.5 g
Agua desionizada 100 ml
Ajustar a pH 8.8 con HCl almacenar a 4° C

Solución 0.5 M tris-HCl pH 6.8

Tris-base 6 g
Agua desionizadas 100 ml
Ajustar a pH 6.8 con HCl almacenar a 4° C

Persulfato de Amonio al 10%

Persulfato de amonio 1g
Agua tipo 1 10 ml
Mantener a 4 °C

TGS 1X

Tris-base 3.0 g
Glicina 14.4 g
SDS 1 g
Aforar a 1 litro de agua tipo 1 y ajustar a pH de 8.3, conservar a temperatura ambiente

TBS 10X

Tris-base 12.1 g
NaCl 87.6 g
Aforar a 1 litro de agua tipo 1 y ajustar a pH de 7.6, conservar a 4°C

TWIN 1X

Tris-base 3.0 g
Glicina 14.4 g
Metanol 200 ml
Aforar a 1 litro de agua tipo 1 y ajustar a pH de 8.3, conservar a temperatura ambiente



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: María José Rivero Cortés

Título de la tesis: "ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Verónica Rodríguez López
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Dra. Verónica Rodríguez L.
Firma del miembro del jurado

10/diciembre/2019
Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: _____ María José Rivero Cortés _____

Título de la tesis: "ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nyelli Sánchez Carranza
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

22/Nov/2019

Fecha



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: María José Rivero Cortés

Título de la tesis: "ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Erick Ayala Calvillo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Ayala Calvillo E
Firma del miembro del jurado

25/Nov/19
Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: _____ María José Rivero Cortés _____

Título de la tesis: "ANÁLISIS DE LA REPRESIÓN DE LA VÍA JAK/STAT POR LA ACCIÓN DEL ÁCIDO GÁLICO EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Tomás Villasena Toledo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

11/12/2019

Fecha