



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Facultad  
de Farmacia  
Conocimiento al servicio de la salud

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**“Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la  
insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la  
modulación del NF- $\kappa$ B en células HepG2 de carcinoma  
hepatocelular”**

**TESIS**

**Para obtener el título de:  
Maestro en Farmacia**

**Presenta:**

**L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes**

**Director de tesis: Dr. Germán Bernal Fernández**

**Codirectora de tesis: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**JUNIO 2023**

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el apoyo con la beca con número de apoyo: **792558**
- A **mi papá Andrés Sánchez**, por ser el primer amigo y maestro que tuve.
- A **mi mamá Marisol Fuentes**, por ser la mejor mami que pude haber deseado y por enseñarme a depositar mi fe en la virgen de Guadalupe quien es el refugio cuando no está cerca.
- Al **Dr. German Bernal** por la oportunidad de realizar la tesis de licenciatura, la confianza para continuar en posgrado y por convertirse en un mentor y amigo.
- A la **Dra. Jessy (Dra. Jessica Sánchez)**, por rescatarme cuando todo parecía estancado, por ser una inspiración para seguir trabajando en un tema que siempre busque, espero siempre responder a su confianza para seguir creciendo.
- A **Aylin Odalis** (*'N otra vida-EO*), la persona que siempre necesite, pero nunca busque, con quien tengo una conexión capaz de decir las mismas palabras que yo en el mismo momento, la persona que me llena de paz, que calma el dolor y que quiero tener por siempre para ser la futura madre de mis hijos, princesa te amo, como nunca y como a nadie.
- A **Sofi**, mi pequeña sobrina y quien me devolvió la felicidad y amabilidad que creía perdida, espero cuando tengas la edad adecuada estos libros te sirvan de inspiración a superarme y superarte siempre en todo.

- A mi hermano **André Sánchez** por estar desde niños y cuando lo necesite en el peor momento de mi vida.
  
- A los compañeros de laboratorio que aportaron en el fortalecimiento y metodología de este trabajo, especial mención al **L.F Azriel Rocha** que fue parte en el desarrollo de este proyecto, por los corajes y hacer ameno el trabajo diario.
  
- A mi familia, especialmente mis primos menores, espero sirva de inspiración a las siguientes generaciones para que continúen luchando por sus sueños.
  
- A los doctores sinodales participes en la revisión y posterior jurado para el presente proyecto de tesis, la **Dra. Leticia Gonzalez Maya**, el **Dr. Cairo David Toledano**, el **Dr. Julio Cesar Almanza**, el **Dr. Mauricio Castillo** (que también fue un ejemplo cuando inicie mi actividad en la investigación) y a la **Dra. Jessica Sánchez**, gracias a todos por sus comentarios que han enriquecido el presente trabajo de investigación.
  
- A todas las personas que me ayudaron para seguir luchando y no perder la batalla de la vida cuando me toco enfrentar lo peor muchas gracias, siempre.

# DEDICATORIA

*A mis padres, Andrés Sánchez López y Marisol Fuentes Flores, por el amor y la guía dada desde la infancia, por vencer las adversidades, por invertir en mí, por enseñarme a luchar siempre, por estar cuando los necesito. Estaré eternamente agradecido, llegar aquí es por y gracias a ustedes. Los quiero.*

*He sido un hombre afortunado, nada en la vida me ha sido fácil...*  
*Sigmund Freud*



<https://www.instagram.com/edvamp7/>

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABLAS .....	14
RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	16
1 INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 CÁNCER.....	17
1.1.1 TIPOS DE CÁNCER.....	18
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	19
1.1.2.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD MUNDIAL .....	19
1.1.2.2 INCIDENCIA Y MORTALIDAD EN MÉXICO .....	21
1.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	24
1.2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DEL CHC .....	24
1.2.1.1 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO .....	25
1.2.1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA.....	27
1.2.1.3 INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO.....	30
1.2.1.4 INFLAMACIÓN Y CHC.....	36
1.2.1.5 NF-KB Y CITOCINAS EN EL CHC. ....	37
1.2.2 TRATAMIENTOS .....	38
1.2.2.1 CIRUGÍA .....	39
1.2.2.2 TRASPLANTE HEPÁTICO .....	40
1.2.2.3 ABLACIÓN.....	40
1.2.2.4 QUIMIOEMBOLIZACIÓN. ....	41
1.2.2.5 RADIOEMBOLIZACIÓN. ....	41
1.2.2.6 QUIMIOTERAPIA.....	42
1.2.2.6.1 FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA. ....	42
1.2.2.6.2 FÁRMACOS DE SEGUNDA LÍNEA .....	43
1.2.2.7 PACLITAXEL .....	44
1.2.3 FACTORES QUE AFECTA EL TRATAMIENTO EN CHC .....	45
1.2.3.1 RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (MDR) .....	46

1.2.3.2	MECANISMOS DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS	47
1.2.3.2.1	GLICOPROTEÍNA P	48
2	ANTECEDENTES	52
3	JUSTIFICACIÓN	56
4	HIPÓTESIS	57
5	OBJETIVO GENERAL	57
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
6	METODOLOGÍA	58
6.1	CULTIVO CELULAR	58
6.2	INDUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE RESISTENCIA A INSULINA EN CELULAS HEPG2	58
6.3	INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS	59
6.4	INMUNOFLOURESCENCIA DE LA P-GP Y DE NF-KB	59
6.5	CUANTIFICACIÓN DE TNF-A EN CÉLULAS RAW 264.7	60
6.5.1	CULTIVO DE CÉLULAS RAW 264.7	60
6.5.2	ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS RAW 264.7 CON LPS	60
6.6	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS DE LAS CÉLULAS	61
6.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
7	RESULTADOS Y DISCUSION	62
7.1	VALIDACIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA EN CELULAS HEPG2/RI	62
7.2	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA P-GP EN CÉLULAS RI	64
7.3	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A PTX EN LAS CÉLULAS HEPG2/RI	67
7.4	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA SOBRE EL FENOTIPO DE RESISTENCIA EN CÉLULAS HEPG2/RI	69
7.5	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE NF-KB EN CÉLULAS HEPG2/RI	72

7.6	CUANTIFICACIÓN DE TNF-A.....	76
7.7	EFFECTO DE PIOGLITAZONA (INSULINOSENSIBILISANTE) EN COMBINACIÓN CON PTX .....	80
8	CONCLUSIONES .....	84
8.1	CONCLUSIONES PARTICULARES.....	84
9	PERSPECTIVAS.....	85
10	REFERENCIAS .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC1 o MRP	Proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácidos grasos libres
ATP	Trifosfato de adenosina
BCRP, ABCG2, MXR o ABCP	Proteína resistente al cáncer de mama
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus 2
DRI	Índice de resistencia al fármaco
ECV	Enfermedades cerebrovasculares
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ER	Retículo endoplásmico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FID	Federación internacional de diabetes
GLUT-4	Glucotransportadores 4
GST	Glutación- S transferasas
HbA1c	Hemoglobina glicada
HGNA	Hígado graso no alcohólico
IGFS	Factor de crecimiento similar a la insulina
IIAE	Inyección intratumoral de alcohol etílico
IKK $\alpha$	Proteínas I $\kappa$ $\alpha$
IKK $\beta$	Proteínas I $\kappa$ $\beta$
IL	Interleucinas

INF- $\gamma$	Interferón gamma
INSR	Receptores de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
ISBG	Inflamación metabólica
I $\kappa$ B	Proteína inhibidora del NF- $\kappa$ B
JNK1	c-Jun N-terminal quinasa I
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MDR	Resistencia a múltiples Fármacos
ME	Músculo esquelético
mTOR	Rapamicina en mamíferos
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NF-K $\beta$	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salino de fosfatos
pCr	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFR	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
P-gp, MDR1 o ABCB1	Glicoproteína P clásica
PI3K	Fosfoinositido-3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTX	Paclitaxel
RF	Radiofrecuencia
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RTK	Receptores tirosina cinasa
S6K1	S6 quinasa 1
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sistema inmunológico
SM	Síndrome metabólico
SOCS	Proteínas supresoras de señalización de citocinas
TA	Tejido adiposo
Th	Células T auxiliares
TK	Tirosina cinasa
TLR	Receptor tipo Toll
TMD	Dominio transmembrana largo
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-2/-3	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2/-3
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia mundial del cáncer y tipos más comunes (Globocan. 2020).....	20
Figura 2. Mortalidad mundial del cáncer y tipos más comunes (Globocan. 2020).....	20
Figura 3. Incidencia del cáncer en América Latina por países (Globocan. 2020).....	21
Figura 4: Mortalidad del cáncer en América Latina por países (Globocan. 2020).....	22
Figura 5: Incidencia del cáncer y tipos más comunes en México (Globocan. 2020).....	22
Figura 6: Mortalidad del cáncer y tipos más comunes en México (Globocan. 2020).....	23
Figura 7. Desarrollo del CHC (Alison, R., et al. 2011).....	25
Figura 8. Histología del hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con sus característicos de hepatocitos hinchados y dañados (Loomba, R., et al. 2021).....	26
Figura 9. Proceso de señalización de la insulina (Petersen, M., y Shulman, G. 2018).....	28
Figura 10 Mecanismo de alteración del IRS y la activación del NF-κB (Berbudi, A., et al. 2020). ....	35
Figura 11. Inflamación en CHC (Alison R., et al. 2011).....	38
Figura 12. Mecanismo de acción del PTX (Škubník, J., et al. 2021). ....	45
Figura 13. Célula resistente a la quimioterapia por sobreexpresión de glicoproteína-P (P-gp).....	50
Figura 14. Ensayo de captación de glucosa por citometría de flujo de la línea HepG2 y HepG2/RI.....	62
Figura 15. Análisis del contenido de lípidos intracelulares en células HepG2 y HepG2/RI. *p < 0.05.....	64
Figura 16. Expresión y localización de la P-gp en las líneas celulares HepG2, HepG2/RI y HepG2/PTX.....	66

Figura 17. Respuesta en la viabilidad celular de las células HepG2/RI al administrar metformina con PTX. ....	70
Figura 18. Respuesta en la viabilidad celular de las células HepG2/PTX al administrar metformina con PTX. ....	71
Figura 19. Expresión y localización del NF-kB en las líneas celulares HepG2 y HepG2/RI y HepG2/RI tratadas con metformina 2mM .....	73
Figura 20. Expresión y localización del NF-kB en las líneas celulares HepG2 y HepG2/RI tratadas con PTX. ....	76
Figura 21. Niveles de TNF- $\alpha$ células RAW 264.7. A) Control sin tratamiento, LPS 10 $\mu$ g/mL, PTX 10nM e Insulina 1 $\mu$ M; B) Control sin tratamiento, LPS 10 $\mu$ g/mL, LPS + PTX 10nM e LPS + Insulina 1 $\mu$ M. La prueba estadística realizada fue <i>t-student</i> * $p \leq 0.05$ , ** $p \leq 0.01$ , *** $p \leq 0.001$ . <i>ns</i> : no estadísticamente significativo. ....	77
Figura 22. Efecto sobre la viabilidad y morfología celular en la línea HepG2 control; insulina, PTX, pioglitazona, insulina + pioglitazona y PTX + pioglitazona. ....	82

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1. Concentración inhibitoria media [CI<sub>50</sub>] de las células..... 68**

## RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) ocupa el sexto lugar en incidencia y el tercero en mortalidad mundial, su desarrollo se relaciona con una inflamación crónica del hígado producto de diversos virus, toxinas, enfermedades autoinmunes y alteraciones metabólicas como el síndrome metabólico (SM) que entre sus componentes destacan la obesidad abdominal, la resistencia a la insulina (RI) y las consecuencias a nivel hepático como la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Tanto la RI como la EHNA se relacionan con la secreción alterada de lípidos y citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) 6 o 1 $\beta$  producto de la inflamación de bajo grado que se genera en tejido adiposo (TA) y que contribuyen en la fisiopatología del CHC. El tratamiento con antineoplásicos convencionales incluido el Paclitaxel (PTX) con frecuencia producen resultados insatisfactorios debido, principalmente, a la adquisición de resistencia a múltiples fármacos (multidrug resistance, MDR; por sus siglas en inglés), asociada por la regulación al alza de Glicoproteína-P (P-glycoprotein, P-gp; por sus siglas en inglés), que conduce a un aumento capacidad de las células cancerosas para expulsar a los fármacos antineoplásicos dependiente del ATP.

Estudios sugieren una posible relación de mediadores inflamatorios y la RI en el desarrollo de MDR, sin embargo, los mecanismos implicados y asociados aun no son claros, por lo que comprender la relación entre estos mecanismos, abriría nuevas puertas al desarrollo de terapias novedosas para el tratamiento del cáncer y mecanismos de reversión de la resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos.

Nuestros resultados corroboran la contribución de la RI en el fenotipo de MDR y la repercusión del tratamiento con PTX en células RI que potencializa la activación de NF- $\kappa$ B lo cual puede estar asociado con la quimioresistencia y la baja respuesta a los tratamientos antineoplásicos en pacientes con CHC y RI.

## **ABSTRACT**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the sixth in incidence and the third in mortality in the world, its development is related to a chronic inflammation of the liver product of various viruses, toxins, autoimmune diseases, and metabolic disorders such as metabolic syndrome that among its components include abdominal obesity, insulin resistance (IR) and consequences at the liver level such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Both IR and NASH are related to alterations in the secretion of lipids and cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 or IL-1 $\beta$ , a product of low-grade inflammation generated in adipose tissue,<sup>2</sup> contributing to the pathophysiology of the disease. HCC. Treatment with conventional antineoplastics including Paclitaxel (PTX) frequently produces unsatisfactory results mainly due to the acquisition of multidrug resistance (MDR), associated with the upregulation of P-glycoprotein (P-gp), leading to an increased ability of cancer cells to expel ATP-dependent antineoplastic drugs.

Studies suggest a possible relationship between inflammatory mediators and IR in the development of MDR, however the mechanisms involved and associated are not yet clear, so understanding the relationship between these mechanisms would open new doors to the development of novel therapies for the treatment of cancer. and resistance reversal mechanisms in chemotherapeutic treatments.

Our results corroborate the contribution of IR to the MDR phenotype and the impact of PTX treatment on IR cells that potentiates NF- $\kappa$ B activation, which may be associated with chemoresistance and low response to antineoplastic treatments in patients with HCC and IR.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 CÁNCER

De manera normal, las células del cuerpo crecen y se reproducen ordenadamente para generar nuevas y así mantenerlo funcional, sin embargo, en ocasiones este proceso se descontrola induciendo la división celular a pesar de que estas no son necesarias, lo cual aunado con la prevalencia de las células, inducen la presencia de una excesiva cantidad de células en el tejido involucrado que favorece la formación de una masa focalizada denominada tumor, la cual, dependiendo las características que posea puede ser de tipo benigno o maligno (INFOCANCER, 2022). La diferencia está en que los benignos no se consideran cancerosos dado que se pueden extraer, tienen alta probabilidad de no volver a aparecer, las células no se diseminan a otras partes del cuerpo y difícilmente pondrán en peligro la vida, en cambio, los tumores de tipo maligno se consideran cancerosos porque sus células son anormales, con una división descontrolada y sin orden, con capacidad de invadir y destruir tanto el tejido a su alrededor como otros tejidos u órganos distantes mediante la generación de la metástasis, un proceso en el cual se desprenden células de un tumor maligno y entran al torrente sanguíneo o al sistema linfático migrando e invadiendo para formar nuevos tumores (INFOCANCER, 2022; Sánchez C, 2013; CRI, 2021). Por lo tanto, podemos definir al cáncer como un desorden donde cualquier tipo de células del cuerpo crecen y se dividen anormalmente, formando agregados celulares que crecen dañando y alterando la fisiología del propio tejido, de otros cercanos y con capacidad de generar metástasis, proceso donde las células cancerosas pueden migrar e invadir tejidos lejanos (Sánchez C. 2013; CRI, 2021; INFOCANCER, 2021).

El proceso de desarrollo de un tumor se puede dividir en las etapas de: iniciación, promoción, conversión maligna, invasión y metástasis, eventualmente este proceso puede tener como culminación la muerte del paciente (Abbas, S., *et al.* 2019; Garima, G., *et al.* 2015; CRI, 2021).

Las posibles causas para la inducción o promoción en el desarrollo de cáncer son variadas, complejas y no se han comprendido totalmente, dentro de estas hay

cambios epigenéticos que pueden asociarse con las alteraciones genéticas para impulsar el desarrollo del cáncer (Stephen B., y Peter A. 2016), factores internos que incluyen hormonas, ciertas condiciones inmunitarias como las enfermedades autoinmunes y mutaciones hereditarias o aleatorias, también se involucran factores externos por algunas sustancias denominadas carcinógenos que dañan al ácido desoxirribonucleico (ADN) estos inducen la formación de radicales libres los cuales toman electrones de otras moléculas en el cuerpo o se unen a diversas moléculas como las proteínas o el ADN formando aductos que dañan las células y afectan su capacidad para funcionar normalmente, como ejemplos de estas sustancias se encuentran algunos microorganismos infecciosos, el tabaco, sustancias químicas como el arsénico y radiación incluyendo rayos gamma o ultravioleta; sumado a ello, algunos otros factores pueden inducir, iniciar o promover el desarrollo de cáncer son alteraciones de tipo metabólico, como la dieta, sedentarismo, obesidad y contaminantes ambientales (Garima, G., *et al.* 2015; Instituto de Investigación de Cáncer)..

Como previamente se mencionó, estas alteraciones pueden ocurrir en cualquier célula del organismo, por tanto, existen diversos tipos de cáncer dependiendo el tejido afectado, ejemplo de ellos se mencionan a continuación.

### **1.1.1 TIPOS DE CÁNCER**

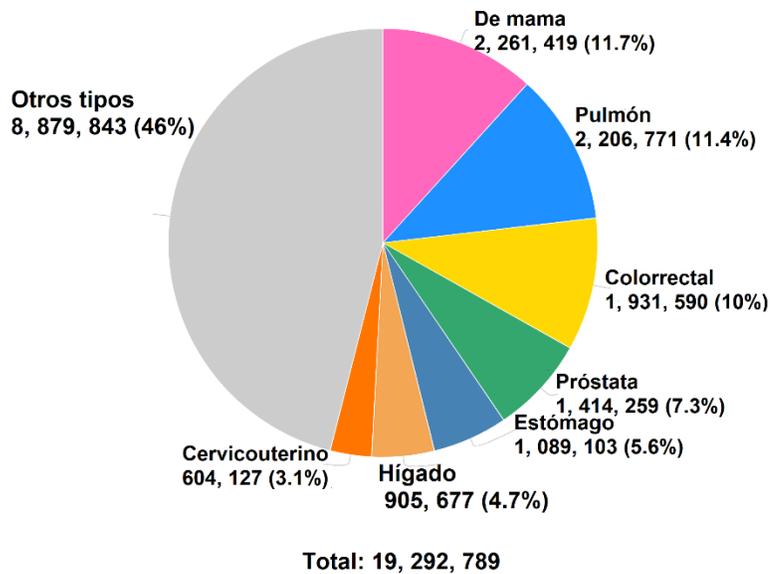
- Carcinoma: Es el tipo más común de cáncer, ocurre en las células epiteliales que recubren las partes internas y externas de diversos órganos del cuerpo.
- Sarcoma: Cánceres que se forman en el hueso (osteosarcomas) o tejidos blandos, como los músculos, la grasa, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y el tejido fibroso (tendones y ligamentos).
- Leucemias: en un tejido líquido por lo que no crean un tumor sólido.
- Linfomas: se desarrollan en los linfocitos (T o B) y pueden ser de Hodgkin o no Hodgkin.
- Mieloma múltiple: cáncer que se inicia en las células plasmáticas.

- Melanoma: en células precursoras de melanocitos productoras de melanina (pigmento que da color a la piel, ojos y cabello).
- Tumores de encéfalo y médula espinal que llevan el nombre de las células en que se forman y el sitio donde aparecen.
- Tumores de células germinativas: las cuales luego forman el esperma o los óvulos.
- Tumores neuroendocrinos: se desarrollan en células neuroendocrinas, que poseen rasgos de células nerviosas y de células productoras de hormonas.
- Tumores carcinoides: encontrados en la parte final del aparato digestivo, de crecimiento lento, pueden diseminarse al hígado o a otras partes del cuerpo, y secreten sustancias como la serotonina o las prostaglandinas, que causan un conjunto de afecciones llamadas síndrome carcinoide (NCI, 2021).

## **1.1.2 EPIDEMIOLOGIA**

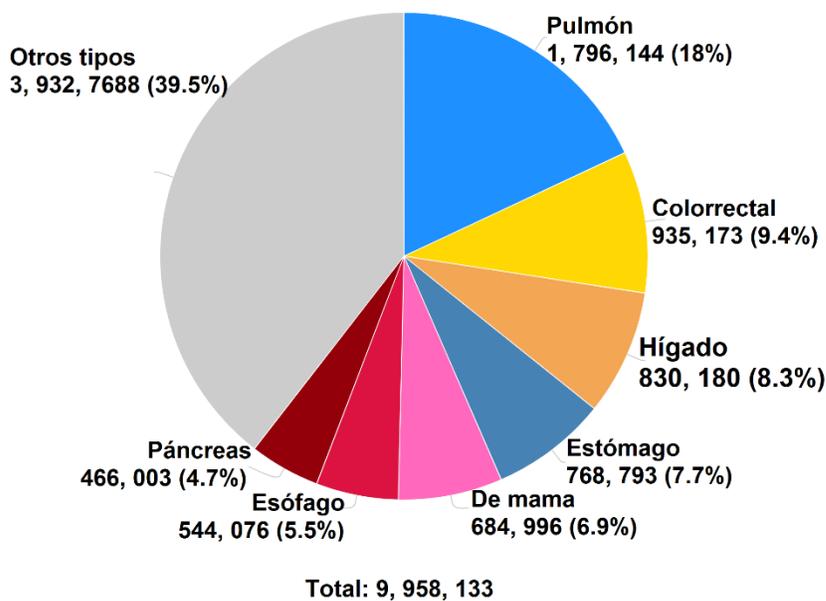
### **1.1.2.1 INCIDENCIA Y MORTALIDAD MUNDIAL**

El cáncer es una enfermedad que forma parte de las principales causas de muerte en todo el mundo con casi 10 millones de fallecimientos en 2020 (OMS 2022; Globocan. 2020). Datos del año 2020, dados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la base de datos en línea Globocan, la cual proporciona estadísticas mundiales del cáncer, la incidencia de esta enfermedad fue de 19, 292, 789, siendo los más comunes el de mama, pulmón, colorrectal, próstata, estomago, hígado y cervicouterino (Figura 1) (OMS 2022; Globocan. 2020).



**Figura 1. Incidencia mundial del cáncer y tipos más comunes (Globocan. 2020).**

En la figura 2 se observa la mortalidad mundial total y por tipo siendo el cáncer de pulmón el más mortal, seguido del colorrectal y el de hígado en tercer lugar (NCI, 2021; OMS, 2022).



**Figura 2. Mortalidad mundial del cáncer y tipos más comunes (Globocan. 2020).**

Con base en la información y figuras 1 y 2, podemos notar que el cáncer de hígado es el sexto en cuanto a incidencia, pero el tercero más mortal a nivel mundial es por ello la importancia de la búsqueda de estrategias que reduzcan la elevada mortalidad a través de la identificación de los factores que están incidiendo en el desarrollo de esta.

### 1.1.2.2 INCIDENCIA Y MORTALIDAD EN MÉXICO

En América Latina la incidencia en 2020 fue de 1,470,274, mientras que la mortalidad fue de 713,414 para todos los cánceres, en cuanto a la incidencia y mortalidad del cáncer hepático, estas fueron de 39,495 y 37,566 respectivamente, hablando específicamente de nuestro país, México se sitúa en el segundo lugar (solo detrás de Brasil), como se observa en la figura 3, en todos los tipos de cáncer tuvo una incidencia de 195,499, mientras que en la gráfica 4 se tiene que la mortalidad fue de 90,222 (Globocan, 2020).

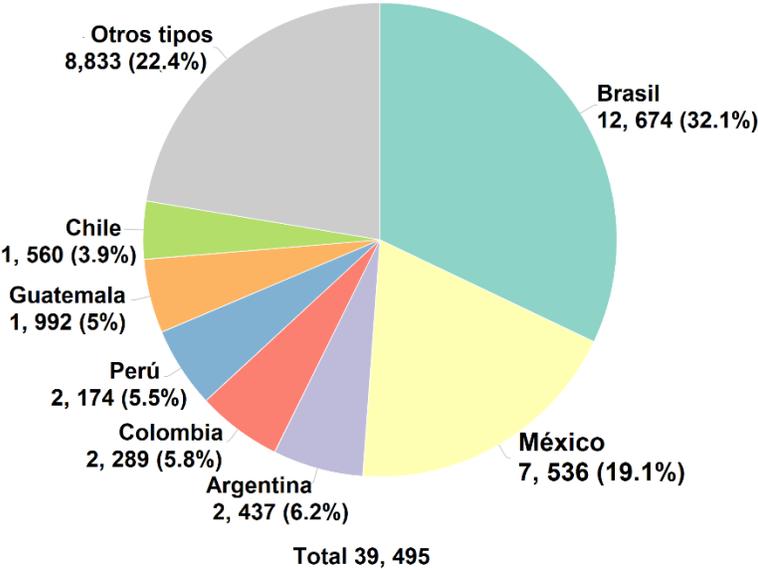
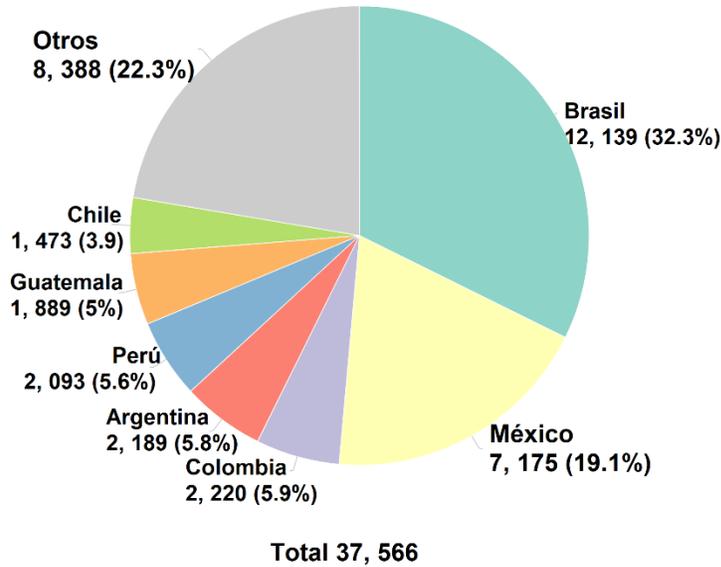
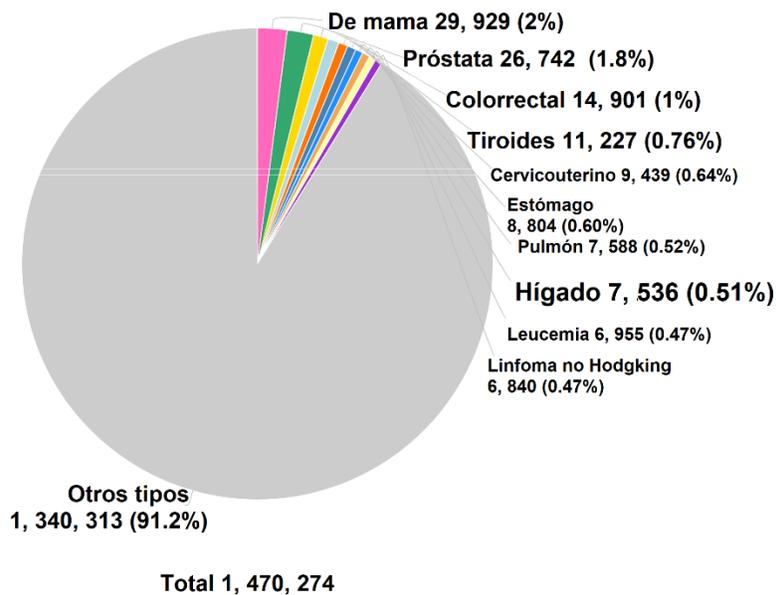


Figura 3. Incidencia del cáncer en América Latina por países (Globocan. 2020).

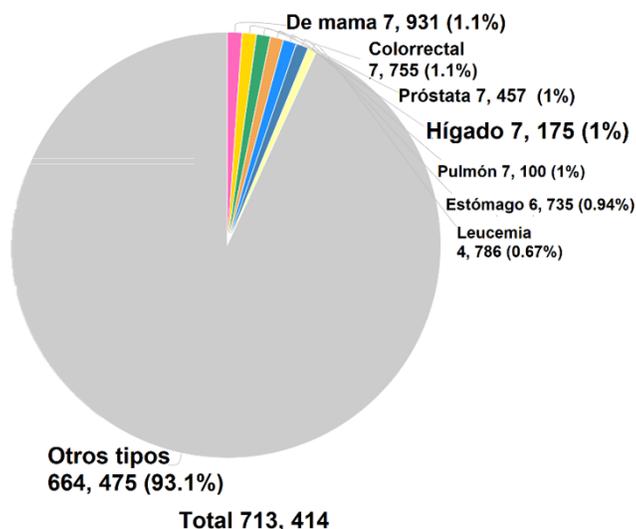


**Figura 4: Mortalidad del cáncer en América Latina por países (Globocan. 2020).**

En México, el cáncer hepático tuvo una incidencia de 7,536 (figura 5) situandolo en el octavo más frecuente y el cuarto más mortal con 7,175 casos como se observa en la figura 6 (Globocan. 2020).



**Figura 5: Incidencia del cáncer y tipos más comunes en México (Globocan. 2020).**



**Figura 6: Mortalidad del cáncer y tipos más comunes en México (Globocan. 2020).**

La incidencia y mortalidad del cáncer van en aumento debido a la prevalencia de los factores de riesgo asociados a su desarrollo como la predisposición genética, la radiación, el tabaquismo, algunas infecciones, consumo de alcohol, otros factores ambientales y cobrando mayor relevancia en los últimos años, el estilo de vida inadecuado como la dieta poco saludable y el sedentarismo que conducen al desarrollo de obesidad y sus posteriores estados de enfermedades crónico-metabólicas que incluyen síndrome metabólico (SM) y sus componentes como la RI, hipertensión arterial (HTA), dislipidemia, posteriormente la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), las enfermedades cerebrovasculares (ECV) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), entre otras (Stefan, N., *et al.* 2018; Loomba, R., *et al.* 2021; Avgerinos, K. *et al.* 2018).

Estos datos epidemiológicos colocan al cáncer en general (con un gasto promedio en el tratamiento anual superior a los dos millones 670 mil pesos durante 2019; Forbes, 2021) y específicamente, al cáncer de hígado como una carga importante de pacientes para el sector salud y como fuerte causa de defunción tanto a nivel mundial como en México. Por este motivo es importante continuar la búsqueda de agentes etiológicos, la fisiopatología, el progreso y desarrollo del cáncer para la

identificación de potenciales blancos terapéuticos o alternativas farmacológicas que ayuden a mejorar la salud del paciente.

## **1.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR**

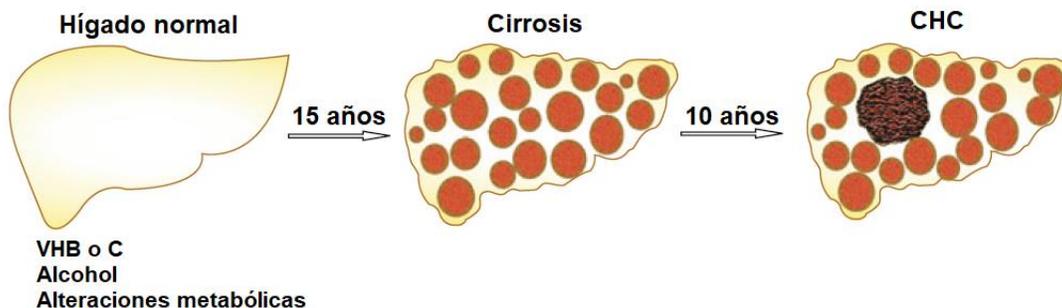
El carcinoma hepatocelular (CHC) es el principal tumor de hígado abarcando el 90% de los casos, el crecimiento y división anormal se forma en células epiteliales de este órgano, la mayoría de los pacientes lo desarrolla de forma secundaria a una enfermedad hepática crónica subyacente por lo que es una de las causas de muerte más común en los pacientes con su estadio previo la cirrosis hepática (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C, *et al.* 2017). Como se mencionó previamente, en los últimos años hay un incremento de la cantidad de casos de esta enfermedad, llegando a ser el sexto cáncer en incidencia y el tercero en mortalidad a nivel mundial y en México el octavo y cuarto respectivamente (Globocan. 2020), se considera a este cáncer como un grave problema de salud sobre todo en países occidentales, por lo que es importante la detección del CHC y del agente etiológico que lo causa en un estadio temprano para poder aplicar el adecuado tratamiento curativo (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C, *et al.* 2017), en alrededor del 90% de los casos de CHC se logra establecer una causa de la hepatopatía asociada a su desarrollo (Martínez J., *et al.* 2016).

### **1.2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS DEL CHC**

En la mayoría de los casos, los pacientes desarrollan CHC por una enfermedad hepática crónica subyacente, regularmente cirrosis con grados avanzados de fibrosis, siendo los principales factores etiológicos la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), consumo excesivo de alcohol, aflatoxinas, o cualquier otro inductor de cirrosis como hemocromatosis, déficit de alfa 1-antitripsina, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enfermedad de Wilson, y tomando una importante relevancia en años recientes se ha identificado un aumento de la incidencia del CHC en pacientes con un tipo de EHGNA como el hígado graso no alcohólico (HGNA) y

su subtipo más avanzado, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C, *et al.* 2017).

Como se muestra en la figura 7, todas las alteraciones previamente mencionadas conducen a una inflamación del hígado denominada hepatitis, posteriormente ocurre una alteración denominada cirrosis caracterizada por una fibrosis que cambia el tejido sano y funcional por cicatrices evitando este órgano lleve a cabo sus funciones normales, finalmente con los años de daño la cirrosis induce el desarrollo de CHC (Alison R., *et al.* 2011).



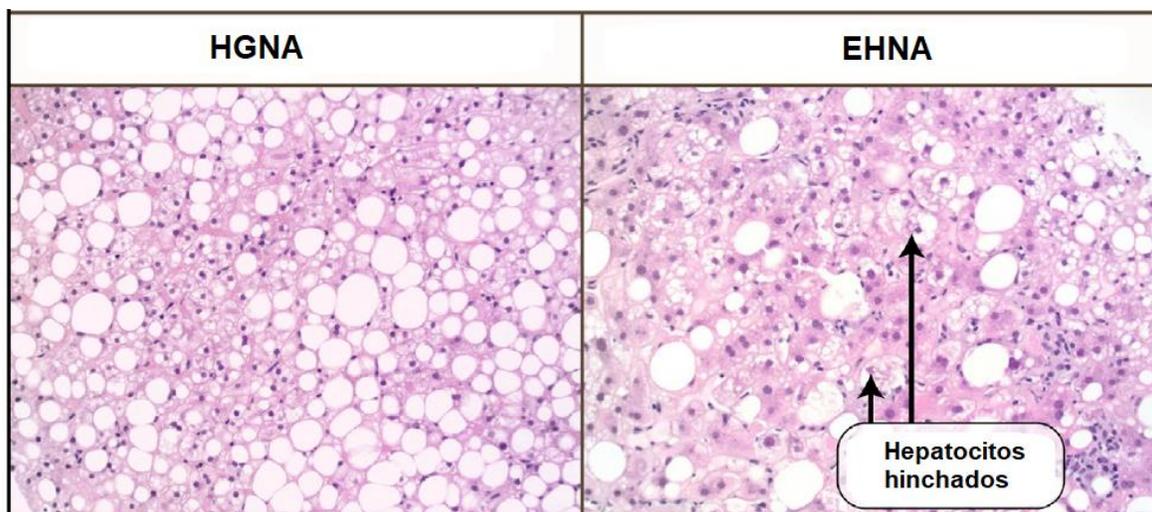
**Figura 7. Desarrollo del CHC (Alison, R., *et al.* 2011).**

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de CHC son el sexo masculino, la edad avanzada, el tabaquismo, las enfermedades virales, factores hereditarios, y en años recientes el incremento de alteraciones metabólicas como la obesidad, el SM, la esteatosis hepática y la DM2 (Dongiovanni, P., *et al.* 2014).

### **1.2.1.1 HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO**

La EHNA se puede clasificar histológicamente en esteatosis hepática o HGNA y EHNA, el primero se define como la presencia de por lo menos 5% de hepatocitos infiltrados con lípidos macro o microvesiculares, pero sin mostrar evidencia de una lesión tisular la cual se denomina hinchazón de hepatocitos (o hepatocitos en globo), en cambio, la EHNA se trata de la presencia de al menos un 5% hepatocitos infiltrados con esteatosis además de inflamación, lesión de los hepatocitos y su cambio a hepatocitos hinchados o en globo (figura 8) los cuales se hinchan varias

veces su tamaño normal y el cuerpo celular se aclara, puede o no presentar fibrosis ya que el daño que se está generando es progresivo y junto a factores genéticos, epigenéticos y ambientales promueven la progresión de fibrosis hasta causar cirrosis y posteriormente CHC (Stefan, N., *et al.* 2018; Loomba, R., *et al.* 2021), se da en personas que consumen poca o nula cantidad de alcohol y no presentan causas secundarias que pudieran ser causa de la EHGNA como enfermedad de Wilson, lipodistrofia congénita o adquirida, drogas como la amiodarona, esteroides, tamoxifeno, ácido valproico, etc (Loomba, R., *et al.* 2021).



**Figura 8. Histología del hígado graso no alcohólico (HGNA) y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con sus características de hepatocitos hinchados y dañados (Loomba, R., *et al.* 2021).**

Se estima que, a nivel mundial, la EHGNA es padecida por mil millones de personas (Loomba, R., *et al.* 2021) con aproximadamente el 25% de la población adulta afectada, mientras que la población infantil que la padece está entre el 3 y 10% en general y alrededor del 34% en los niños con obesidad (Stefan, N., *et al.* 2018).

Se considera a la EHGNA como la manifestación del daño hepático inducido por el SM, conformado por una serie de factores de riesgo de origen metabólico que incluye dislipidemias, obesidad abdominal, HTA y destacando la RI, estas alteraciones mayoritariamente son inducidas por un estilo de vida poco saludable

que incluye sedentarismo y una dieta de tipo hipercalórica con ingesta de alta energía lo que genera un desbalance energético reflejado en una mayor proporción de grasa tanto total como visceral, a la par se genera una disbiosis intestinal (que incrementa la liberación de moléculas asociadas a daño o a patógenos; DAMP y PAMP respectivamente), la RI incrementa la lipogénesis hepática de novo, y la distrofia que se está generando en TA favorece la liberación de ácidos grasos (AG), ceramidas y la alteración del patrón de expresión de citocinas y adipocinas; todo este desequilibrio induce acumulación de lípidos en el hígado, inflamación y fibrosis con lo que aumenta el deterioro hepático, a la par que se desarrolla obesidad, dislipidemia, HTA, DM2 y ECV, por lo que el aumento en la incidencia de estas alteraciones se acompaña del incremento de la EHGNA que a su vez se relaciona con posteriores enfermedades del hígado como fibrosis, cirrosis y CHC (Stefan, N., *et al.* 2018; Loomba, R., *et al.* 2021).

#### **1.2.1.2 RESISTENCIA A LA INSULINA**

La insulina es una hormona peptídica endocrina que se une a los receptores de insulina (INSR) que están unidos a la membrana plasmática de las células diana, con ello inician una respuesta metabólica en algunas células somáticas, pero, principalmente tiene función en la homeostasis de la glucosa con efectos sobre tejidos insulino dependientes que desempeñan distintas funciones en la homeostasis metabólica mediante vías de transducción de señales de específicas de cada tejido, sin embargo, todas coinciden en un punto, como se observa en la figura 9; el proceso inicia cuando la insulina se une con el INSR lo que induce la autofosforilación de este último y recluta diversos sustratos para continuar la señalización intracelular, una vía es la dada por moléculas de señalización mitogénica, las más importantes son GRB2 y SHC, la otra vía es la metabólica con las proteínas del sustrato del receptor de insulina (IRS) y la SH2B2/APS (Petersen, M., y Shulman, G. 2018; Pollak, F. 2016). En la figura 9 el color verde representa eventos de activación y el rojo indican eventos inhibitorios en el mecanismo de señalización intracelular de la insulina

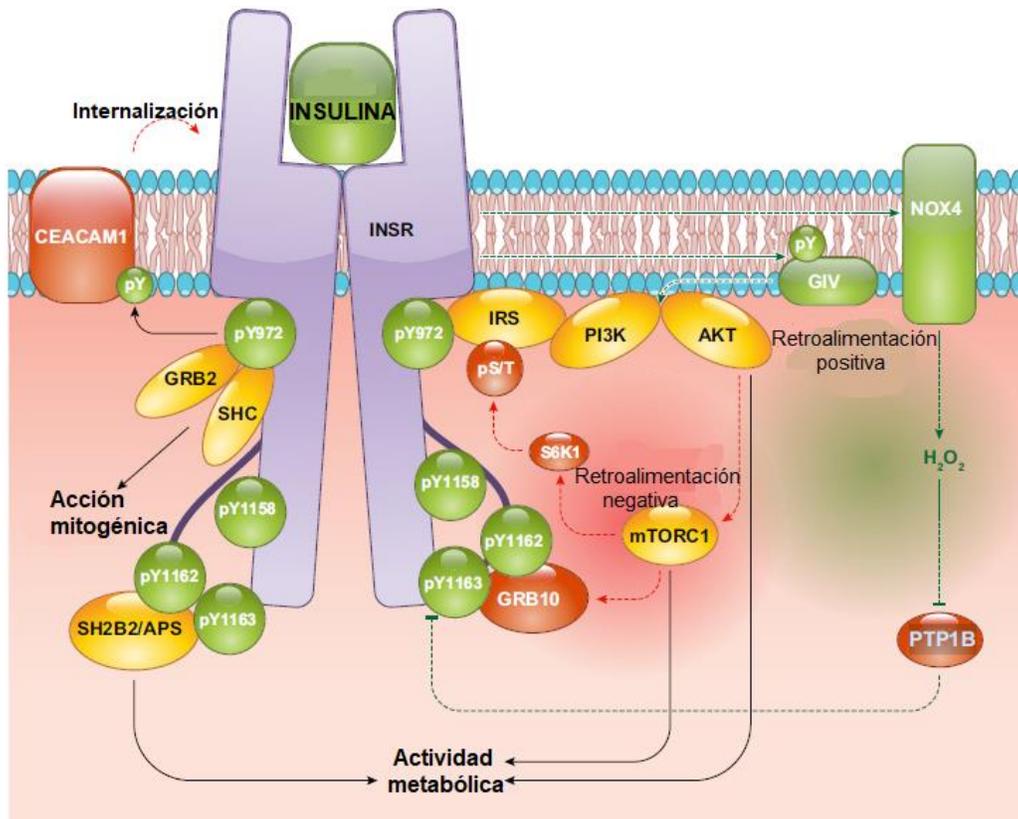


Figura 9. Proceso de señalización de la insulina (Petersen, M., y Shulman, G. 2018).

Posterior a la unión entre insulina y el INSR, continúa la vía de señalización intracelular cumpliendo una función dependiendo del tejido insulino dependiente en el cual se desarrolla el proceso, por ejemplo, en el músculo esquelético (ME), promueve la utilización y el almacenamiento de glucosa al aumentar el transporte de glucosa y la síntesis neta de glucógeno, en el hígado activa la síntesis de glucógeno, incrementa la expresión de genes lipogénicos y disminuye la expresión de genes gluconeogénicos, y los adipocitos del TA particularmente el blanco, suprime la lipólisis y aumenta el transporte de glucosa y la lipogénesis (Petersen, M., y Shulman, G. 2018).

En los mamíferos existen funciones especializadas para hormonas peptídicas que se relacionan con la insulina, uno de ellos es el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), tanto 1 como 2, mientras la insulina controla flujos metabólicos, los IGF 1 y 2 promueven el crecimiento y la diferenciación celular, el problema surge

por la falta de distinción entre estas funciones dada la alta homología entre los INSR y el IGF-1, ambos forman heterodímeros híbridos en muchos tipos de células, además de compartir muchos efectores intracelulares lo cual puede inducir la superposición de las funciones de señalización entre la insulina y el IGF-1, con ello se contribuye a la relación que existe entre la hiperinsulinemia y varios tipos de cáncer (Petersen, M., y Shulman, G. 2018).

La resistencia a la insulina se refiere a una condición en la que la capacidad de la insulina para actuar en las células se ve disminuida, lo que puede provocar alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. En respuesta a esta disfunción, el páncreas aumenta la producción de insulina para compensar su ineficacia, lo que da lugar a un estado conocido como "hiperinsulinismo", lo que implica consecuencias metabólicas y hormonales significativas que afectan la homeostasis del organismo (Pollak, F. 2016), este exceso de insulina puede unirse a los IGF con lo que se estimula las vías anabólicas de crecimiento y proliferación de células cancerosas (Petersen, M., y Shulman, G. 2018).

Las causas de la RI pueden ser fisiológicas como el embarazo, la pubertad, la edad, o de tipo patológica debido a alteraciones genéticas, ambientales, secundarias a fármacos o enfermedades, pero el proceso de RI más común está fuertemente relacionado con la obesidad abdominal donde los adipocitos viscerales sufren un proceso de hiperplasia e hipertrofia que inicia una respuesta del sistema inmunológico (SI) para mantener la homeostasis en la cual se liberan mediadores proinflamatorios que interfieren en la señalización normal de la insulina causando una alteración en la señal post-receptor comprometiendo la vía metabólica pero no la anabólica (o mitótica) que incluso puede exacerbarse a través de la activación de la MAPquinasa (MAPK; Pollak, F. 2016).

Por otra parte, el posible papel de la insulina para promover la carcinogénesis es mediante la estimulación de las células insulino dependientes a través del INSR o los IGFS y sus receptores (IGF-R), estas uniones inducen diversos mecanismos

promotores de tumores (implicados en la proliferación, antiapoptosis, la angiogénesis y la linfangiogénesis) en las células diana a partir de la unión a los receptores de membrana y la transducción intracelular posterior que puede seguir dos vías, la primera es la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)–AKT–objetivo de rapamicina en mamíferos (mTOR) que está implicada en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, su activación es común en tumores y tejidos normales de ratones obesos y/o diabéticos, mientras que los inhibidores de mTOR dificultan la progresión tumoral inducida por la obesidad en modelos de ratón; la otra implicada es la vía de la MAPK, involucrada en la proliferación, que incluye la activación de Ras–Raf–MEK (Abbas, S., *et al.* 2019).

La DM2 es el resultado de la RI, donde hay una ineficacia de esta hormona por llevar a cabo sus funciones normales (FID, 2021), se caracteriza por una combinación de RI y la incapacidad de las células  $\beta$  del páncreas por mantener una adecuada secreción de esta hormona con lo cual se genera una hiperglucemia, esta enfermedad es el resultado de una interacción entre factores genéticos que son requisito para el desarrollo y factores ambientales que son los determinantes e incluyen la obesidad, el sedentarismo, los malos hábitos alimenticios, etc, (Valdés, W., *et al.* 2019).

### **1.2.1.3 INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO**

El SI es una red sofisticada y compleja de órganos, tejidos, células y moléculas solubles que trabajan de manera coordinada para mantener la homeostasis del organismo mediante la detección de elementos extraños comúnmente llamados “antígenos” y que forman parte de un microorganismo o se encuentran presentes en células o moléculas alteradas o provenientes de otros individuos (Cedillo, L., *et al.* 2015). En condiciones normales, nuestro SI tiene un correcto funcionamiento donde los componentes del organismo son considerados y reconocidos como propios y por tanto no son atacados, por lo cual, el principio básico del funcionamiento de este sistema es distinguir entre lo propio y lo extraño, y atacar a este último con el fin de eliminarlo antes de causar daños en el organismo (Lomonte

B. 2018). Sin embargo, pese a que el SI debe trabajar con la exactitud de la maquinaria de un reloj no está exento de fallar y propiciar un ataque a las células o tejidos del propio organismo, lo cual da lugar a diferentes desórdenes como autoinmunidades, cáncer, respuestas exacerbadas y patológicas contra sustancias externas inocuas (alergias) o fallar y ser ineficaz de responder a las agresiones (Cedillo, L., *et al.* 2015).

La inflamación sistémica de bajo grado (ISBG), también llamada inflamación metabólica o metainflamación (debido a su estrecha relación con el desarrollo de enfermedades y disfunciones cardiometabólicas), se caracteriza por un aumento en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el interferón gamma (INF- $\gamma$ ), las interleucinas (IL) 1 $\beta$ , 6 y 17 y de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (pCr), también por un incremento de la infiltración de células inmunológicas como macrófagos y linfocitos T en TA, pero, a diferencia de un proceso inflamatorio clásico, el rasgo distintivo de la ISBG es que no induce lesión, alteraciones estructurales o pérdida de las funciones primarias del tejido inmunológicamente infiltrado (León, J., *et al.* 2015).

El mecanismo de relación entre la metainflamación, RI y el daño posterior es dado por la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias que están involucradas en la patogénesis de enfermedades metabólicas, este aumento de citocinas se produce primariamente en TA (citocinas y adipocinas) y posteriormente en tejidos insulino dependientes como el hepático (hepatocinas), pero es el TA la fuente principal de citocinas y células proinflamatorias y donde se inicia la metainflamación (León, J., *et al.* 2015; Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019).

Este mecanismo inflamatorio metabólico inicia con la sobreacumulación de energía en TA, donde los adipocitos buscan compensar el almacenamiento con un proceso de hiperplasia e hipertrofia dejando adipocitos en la lejanía a vasos sanguíneos por lo que sufren hipoxia y posterior muerte celular, con ello se inicia una repuesta del

Si para mantener la homeostasis (Pollak, F. 2016; González N., *et al.* 2016), en esta ISBG, los macrófagos residentes en TA desempeñan un papel importante en la producción de citocinas proinflamatorias, estas células se pueden clasificar en distintos subtipos, el M0 o sin clasificación y los que se diferencian según el microambiente local, el fenotipo "activado clásicamente" o M1 que secreta citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ; y el fenotipo "activado alternativamente" o M2 que produce citocinas antiinflamatorias como la IL-10, además de los macrófagos, otro tipo de células participe en la producción de citocinas pro o antiinflamatorias es un subconjunto de células T, llamadas células T auxiliares (Th) CD4 positivas, que a su vez se diferencian en células Th1 las cuales promueven un perfil de citocinas proinflamatorias, y las células Th2 que generan una respuesta de tipo antiinflamatoria (Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019). En condiciones normales existe un equilibrio entre la cantidad de células y expresión de moléculas pro y antiinflamatorias, pero en la obesidad se modifica el equilibrio de subconjuntos de macrófagos y células CD4+ predominantemente hacia un fenotipo proinflamatorio, iniciando este desbalance con una infiltración de macrófagos M1 y células Th1 en el TA visceral y posteriormente promoviendo la RI en tejidos insulino-dependientes (León, J., *et al.* 2015; Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019).

Otra parte importante en la fisiopatología del SM y la DM2 es el aumento de la RI en el tejido hepático y muscular por los ácidos grasos libres (AGL) que salen de los adipocitos necróticos, estos AGL estimulan la activación del sistema inmunológico innato para liberar citocinas proinflamatorias que a su vez favorecen el aumento de AGL y mejoran la actividad de la lipasa sensible a hormonas en el TA, lo que se convierte en un constante ciclo repetitivo (León, J., *et al.* 2015; Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019).

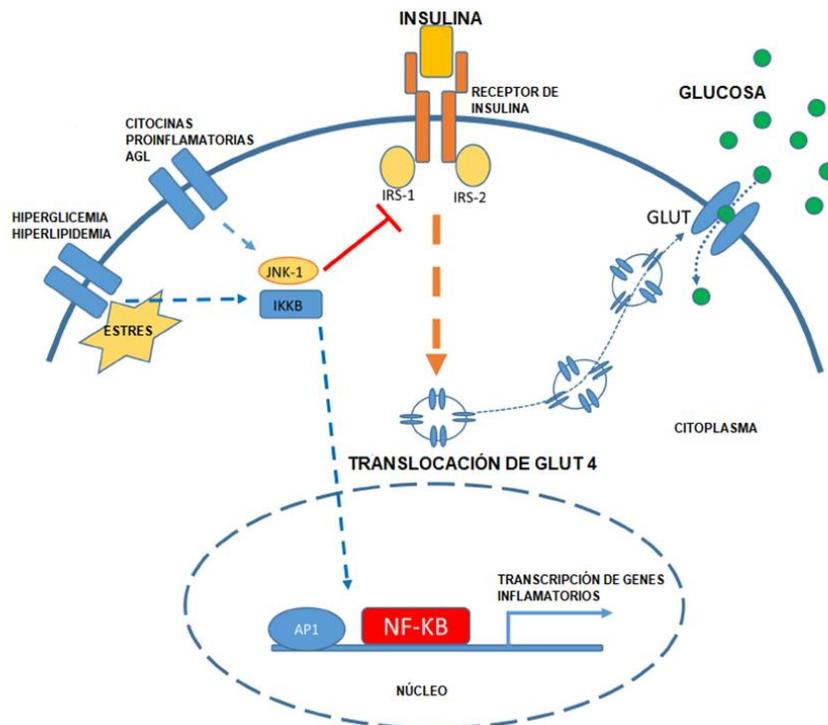
Las citocinas proinflamatorias activan factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y c-Jun en el TA e hígado, lo cual también inactiva INSR promoviendo la RI, también las citocinas, particularmente TNF- $\alpha$  e IL-6 inducen la

fosforilación de serina en el IRS evitando la fosforilación de tirosina y por tanto evitando la activación de la vía de señalización intracelular para lograr la traslocación de los glucotransportadores 4 (GLUT-4), otras formas de contribuir al desarrollo de RI por parte de las citocinas es su papel en la regulación positiva de la expresión de las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS) que se pueden unir al IRS para mediar su degradación, otro mecanismo de estas moléculas proinflamatorias en la fisiopatología de la DM2 es dado por inducir el fallo de las células  $\beta$  pancreáticas mediante una variedad de mecanismos, por ejemplo, el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  interrumpen la regulación del calcio de las células  $\beta$  y con ello en la liberación de insulina, el TNF- $\alpha$  también aumenta la expresión del polipéptido amiloide de los islotes en las células  $\beta$  lo que conduce a una muerte acelerada de estas y el mismo polipéptido incrementa en las células  $\beta$  la producción de la IL-1 $\beta$  que funciona como un regulador maestro de la inflamación de los islotes pancreáticos durante la DM2 y a su vez induce la apoptosis de las células  $\beta$  (León, J., *et al.* 2015; Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019).

Otro mecanismo relacionado con la metainflamación y la RI es dada por “hipótesis del intestino permeable”, esta surge porque el TA visceral es considerado una barrera entre el intestino y el hígado, por lo que podrían antígenos microbióticos cruzar desde el intestino, con un aumento de la absorción de lipopolisacáridos (LPS) desencadenando un incremento de la inflamación en TA e hígado lo que podría conducir a RI por activación del receptor tipo Toll (TLR) 4 y el factor nuclear  $\kappa$ B NF- $\kappa$ B (Reinehr, T., y Ludwig, C. 2018; Reinehr, T. 2019).

El NF- $\kappa$ B, pertenece a una familia de factores de transcripción que activan diversos genes involucrados en el control de la respuesta inflamatoria y en la regulación del crecimiento celular, se localiza en el citoplasma de la mayoría de las células, pero en tejidos insulino dependientes como el hígado, las citocinas proinflamatorias, moléculas lipídicas como los AGL, el diacilglicerol, la ceramida, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la hipoxia activan las proteínas I $\kappa$  $\beta$  $\alpha$  y  $\beta$  (IKK $\alpha$  o  $\beta$ ) cuya función es fosforilar las proteínas inhibitoras del NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), lo cual degrada

al inhibidor activando al NF- $\kappa$ B que se internaliza en el núcleo para llevar a cabo la activación de la expresión génica, un proceso similar ocurre con la activación de las c-Jun N-terminal quinasa 1 (JNK1) que pertenece a una familia encargada de la regulación de muchas actividades biológicas mediante la expresión génica, incluyendo actividad de respuestas inflamatorias, morfogénesis, cambios del citoesqueleto, proliferación celular, diferenciación, supervivencia y muerte celular, la activación de ambos factores de transcripción induce la inhibición del IRS-1 y dado que en condiciones fisiológicas normales, la insulina se une a su receptor y se fosforila la tirosina en IRS-1 y -2 favoreciendo la expresión de los GLUT-4 para internalizar la glucosa, pero, con la inhibición inducida por las moléculas previamente mencionadas existe un cambio en la fosforilación de tirosina por serina en los sustratos del IRS y se inhibe la vía de señalización normal de la insulina, al mismo tiempo que los dos factores de transcripción se translocan al núcleo e inducen la activación de varios genes relacionados con la respuesta inflamatoria exacerbando el estado de inflamación crónica, RI y posteriormente la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas (Petersen, M., y Shulman, G. 2018; Pollak, F. 2016; Berbudi, A., *et al.* 2020; Pierre, P., *et al.* 2015). Esta relación entre RI y moléculas asociadas a daño metabólico se puede observar en la figura 11.



**Figura 10 Mecanismo de alteración del IRS y la activación del NF- $\kappa$ B (Berbudi, A., et al. 2020).**

Como se mencionó previamente, en la etiología del CHC el principal factor de riesgo para su desarrollo es la hepatitis crónica mayormente relacionada con enfermedad viral, sin embargo, existen alteraciones y enfermedades que influyen como cofactores o desencadenantes propios del CHC, entre estas se encuentra el consumo excesivo de alcohol y tomando una importante relevancia en el contexto del daño hepático crónico, en los últimos años se ha incrementado la participación del HGNA como desencadenante cada vez más reconocido de CHC incluso en hígados no cirróticos, cobrando cada vez más importancia por su relación con las alteraciones metabólicas como la obesidad, la RI y la DM2 (Dongiovanni, P., et al. 2014). El depósito de grasa en el hígado se relaciona con RI, inflamación y posteriormente con un estado de fibrogénesis denominada EHNA que puede progresar a una grave fibrosis lo que conduciría al desarrollo de CHC incluso antes de la aparición de la cirrosis, por lo que dada la mayor incidencia del HGNA y sus alteraciones previas, se prevé aumento de casos de CHC en el futuro, lo que podría reducir el beneficio de las actuales y nuevas terapias anticancerígenas (Alison R., et al. 2011; Dongiovanni, P., et al. 2014).

La manifestación a nivel hepático del SM es la EHNA, una alteración metabólica caracterizada por esteatosis hepática macrovesicular en personas que no consumen de forma significativa alcohol, medicamentos hepatotóxicos u algún otro agente causante de esteatosis secundaria y evoluciona por las fases de esteatosis simple, esteatohepatitis, cirrosis y finalmente CHC, dado que puede asociarse con un hígado no cirrótico generalmente se diagnostica cuando el tumor alcanza un tamaño que desencadena síntomas o de forma accidental por resultados anormales de laboratorio (Martínez G, et al. 2020). El HGNA es el trastorno hepático más común en los países industrializados siendo los principales factores de riesgo los componentes del SM y la DM2, la prevalencia en la población general está entre el 20 y 30%, se presenta en todas las edades, incluyendo niños, pero la mayoría de

los pacientes son diagnosticados con HGNA alrededor de los 40 o 50 años (Hernández, I., y Luján, M. 2021).

Esta EHNA sería clave para entender porque la obesidad incrementa el riesgo de muerte por CHC, la relación de esta mortalidad se da por el aumento de los lípidos intracelulares que genera una gran demanda metabólica en el retículo endoplásmico (ER) lo cual conduce a su disfunción favoreciendo la producción excesiva de ROS y generando estrés oxidativo y que a su vez activa vías inflamatorias como la del NF- $\kappa$ B (Alison R., *et al.* 2011). En la actualidad, un estimado de entre el 15 y 20% del total de todos los CHC se da en hígado no cirrótico lo cual refleja el aumento de la incidencia en este tipo de pacientes, con una media de edad generalmente menor comparada con los pacientes cirróticos (Martínez G, *et al.* 2020).

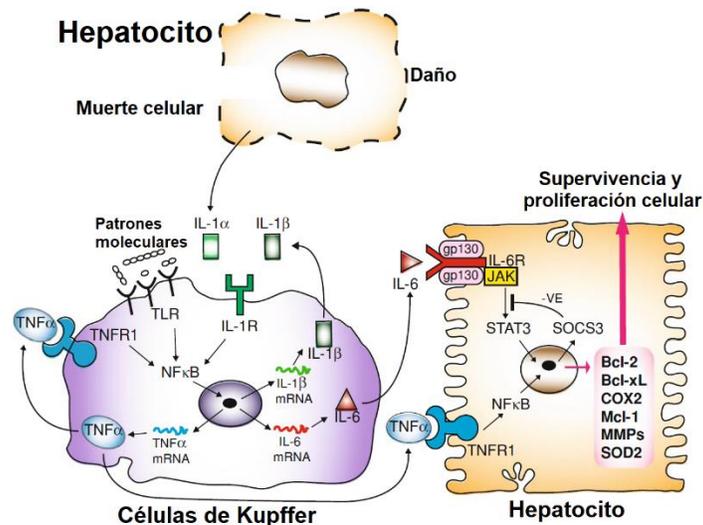
#### **1.2.1.4 INFLAMACIÓN Y CHC**

Cuando surge un tumor, las células del SI son las principales responsables de la inmunovigilancia tumoral y de eliminar las clonas tumorales, principalmente los macrófagos y los mastocitos infiltran el tumor e inducen un estado de inflamación crónica donde producen factores que promueve el crecimiento tumoral en todas sus etapas, por ejemplo, esta inflamación promueve el inicio del tumor al favorecer nuevas mutaciones mediante la generación de un estrés genotóxico, de igual forma tiene un importante papel en la promoción tumoral dado que induce la proliferación tumoral y su papel en la progresión tumoral se debe a que influye en el proceso de angiogénesis, en el cual se incrementa la producción de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor, con lo cual también incrementa la extravasación celular y por tanto la invasión tisular a otras partes del cuerpo favoreciendo el desarrollo de la metástasis (Sánchez C. 2013). El proceso carcinogénico que se está desarrollando es favorecido por la expresión de quimiocinas y citocinas que son producidas por el infiltrado de células del SI y que fomentan tanto la supervivencia como la proliferación celular (Alison R., *et al.* 2011).

### **1.2.1.5 NF- $\kappa$ B Y CITOCINAS EN EL CHC.**

Los agentes etiológicos del CHC tienen oncoproteínas transformadoras que influyen en la inducción del cáncer, pero también las bacterias, los virus y los AGL por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), más en específico, la familia de los TLR puede activar diversas células del SI, especialmente a los macrófagos residentes del hígado denominados células de Kupffer (Alison R., *et al.* 2011). Estos macrófagos se localizan dentro de la luz de los sinusoides hepáticos adheridos a las células endoteliales que componen las paredes de los vasos sanguíneos, juegan un importante papel en la defensa del huésped, porque, además de ser las primeras células inmunológicas en el hígado que entran en contacto con las bacterias intestinales y endotoxinas o desechos microbianos provenientes del tracto gastrointestinal través de la vena porta, también participan en la eliminación de diversos compuestos como partículas pequeñas, complejos proteicos, lípidos y células apoptóticas de la circulación y el hígado, por lo tanto, diversas enfermedades hepáticas que a su vez se relaciona con el CHC como la hepatitis viral, hepatopatía alcohólica, colestasis intrahepática, rechazo del trasplante hepático, EHNA y fibrosis hepática pueden estar relacionadas también con modificaciones o alteraciones de las funciones de las células de Kupffer (Nguyen, A., y Horuzsko, A. 2015).

Las diversas citocina que se están generando en el tejido hepático por la muerte de hepatocitos en el CHC o que pueden llegar de la circulación provenientes del TA se unen a sus receptores en las células de Kupffer, con este enlace de citocinas-receptor se inicia una señalización interna que finaliza con la producción de más quimiocinas y citocinas como la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , que como se observa en la figura 11, activan al NF- $\kappa$ B y lo translocan al núcleo donde, además de amplificar la respuesta inflamatoria también estimula la supervivencia y proliferación de células hepáticas normales y malignas (Alison R., *et al.* 2011).



**Figura 11. Inflamación en CHC (Alison R., et al. 2011).**

Una de las vías de señalización activadas por los TLR a través de la molécula adaptadora llamada gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) o por las citocinas como el TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , es la vía del NF- $\kappa$ B que podría explicar el vínculo entre la inflamación y el cáncer, siendo un factor importante para determinar la capacidad de las células normales, preneoplásicas y malignas de evitar la apoptosis (Alison R., et al. 2011).

A pesar de la evidencia que está surgiendo en la etiología y fisiopatología del CHC, el tratamiento va enfocado en los estadios previos a las alteraciones metabólicas previas, por lo que el tratamiento para el CHC ya establecido depende del estadio y avance en que sea detectado (Martínez J., et al. 2016; Armengol C, et al. 2017).

### 1.2.2 TRATAMIENTOS

Una vez diagnosticado el CHC por la presencia de nódulos y daño en el hígado de las personas con una patología hepática previa como la cirrosis o enfermedad viral (Boal, P., y Pereira, E. 2015), es importante clasificar al paciente de acuerdo con las características del tumor y los aspectos clínicos, lo cual ayudará a seleccionar el tratamiento más apropiado; identificar tumores hepáticos menores de 2cm ayuda a recibir un tratamiento precoz lo que otorga un mejor panorama de control, contrario

al dado por el diagnóstico tardío o la detección de tumores de mayor tamaño (>2cm) que presentan con más frecuencia invasión microvascular y células malignas peritumorales (satelitosis), lo cual se asocia a un peor pronóstico y peores resultados en el tratamiento (Martínez J., *et al.* 2016). Es importante tener en cuenta algunos aspectos para elegir el tratamiento adecuado en el momento oportuno, como la migración de tratamiento, es decir, aplicar el tratamiento de manera secuencial en el caso de no poder aplicarse el correspondiente, buscar el efecto beneficioso en la supervivencia, aspectos paliativos y evaluar las comorbilidades en el momento de elegir el tratamiento (Armengol C, *et al.* 2017).

Las opciones terapéuticas posibles dependen del estadio y fase tumoral e incluyen las siguientes:

#### **1.2.2.1 CIRUGÍA**

De las opciones terapéuticas disponibles para el CHC, la cirugía (resección o el trasplante de hígado) es el tratamiento principal (Martínez J., *et al.* 2016), la resección (extirpación) quirúrgica se indica en pacientes con tumores sin límite de tamaño, pero con atención en la posibilidad de invasión vascular y formación de nódulos adicionales a mayor tamaño tumoral, este tratamiento es mejor cuando no hay cirrosis dado que la posibilidad de llevarlo a cabo en este tipo de pacientes solo es de entre 5 y 10%, con una supervivencia de 5 años (Armengol C, *et al.* 2017), porque el riesgo de recidiva tumoral tras la resección es del 70% en ese periodo, esta puede ser debida a una recurrencia consecuencia de la micrometástasis (Martínez J., *et al.* 2016) o diseminación tumoral con características tumorales como la invasión vascular microscópica, formación de nódulos adicionales o tumores mal diferenciados (Armengol C., *et al.* 2017), por otro lado, si aparece antes de los 2 años se considera una recidiva y si aparece después se considera un «*tumor de novo*» (Martínez J., *et al.* 2016), con un 60-70% y 30-40 respectivamente dependiendo de la enfermedad hepática subyacente) (Armengol C., *et al.* 2017).

Para evitar la recidiva no se dispone de ningún tratamiento por lo que la estrategia es incluir en lista de trasplante a aquellos pacientes que en la posible extracción quirúrgica tenga factores de mal pronóstico (Armengol C., *et al.* 2017).

### **1.2.2.2 TRASPLANTE HEPÁTICO**

Es el mejor tratamiento para pacientes con múltiples tumores pequeños (<3 nódulos,  $\leq 3$  cm) o un tumor único menor o igual a 5 cm, en pacientes no resecables o complicaciones de hipertensión portal (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C., *et al.* 2017), sin importar el grado de disfunción hepática, sin afectación vascular ni extensión extrahepática, con lo cual la supervivencia a los 5 años es del 70% (Armengol C., *et al.* 2017). La mayor limitación de este proceso es la falta de órganos lo que incrementa la probabilidad de progresión tumoral y posible exclusión posterior de la lista de espera por el inferior número de donantes respecto a los candidatos, por lo cual es crucial en el proceso de selección la correcta aplicación de criterios tanto de priorización como de exclusión, así como la aplicación de un tratamiento coadyuvante durante la espera (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C., *et al.* 2017).

### **1.2.2.3 ABLACIÓN**

Este procedimiento es el tratamiento para pacientes en estadios precoces que no son candidatos al proceso quirúrgico la resección ni el trasplante (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C., *et al.* 2017), con tumores menores a 2cm (la eficacia disminuye a medida que aumenta el tamaño; Armengol C., *et al.* 2017). Los dos procedimientos de ablación más empleados son la termoablación por radiofrecuencia (RF) y la inyección intratumoral de alcohol etílico (IIAE), evidencia dada por ensayos clínicos aleatorizados y metaanálisis arrojan mayor beneficio de la RF comparado a la IIAE (excepto en tumores <2 cm donde ambas técnicas son igual de efectivas) para controlar la enfermedad y aumentar la supervivencia (Martínez J., *et al.* 2016; Armengol C., *et al.* 2017). Sin embargo, no son únicos, existen otras técnicas que aún no se puede generalizar su uso debido a que presentan un mayor coste y complejidad técnica (Reig, M., *et al.* 2021), han sido menos desarrolladas y sus estudios son aún escasos, como es la ablación con microondas, que surge como

procedimiento competidor de la RF por mostrar buena capacidad de necrosis inclusive en tumores de mayor tamaño de acuerdo con lo reportado por diversos estudios, los otros métodos ablativos incluyen laserterapia, crioterapia, electroporación, ultrasonido focalizado de alta intensidad o terapia de fármacos activados por luz que se encuentran en estudio, pero no han arrojado resultados satisfactorios (Martínez J., *et al.* 2016; Reig, M., *et al.* 2021; Armengol C., *et al.* 2017).

#### **1.2.2.4 QUIMIOEMBOLIZACIÓN.**

Se trata de un tratamiento paliativo donde se realiza la cateterización selectiva de la arteria que nutre el tumor a través de la arteria hepática, se administra por inyección un agente quimioterápico que produce citotoxicidad y sustancias embolizantes que inducen isquemia tumoral, con esta combinación se retrasa de forma significativa la progresión tumoral y la invasión macrovascular (Martínez J., *et al.* 2016).

#### **1.2.2.5 RADIOEMBOLIZACIÓN.**

En este tratamiento se da la administración de sustancias radioactivas como el itrio 90, dentro de la arteria hepática, ya que debido a la hipervascularización arterial del tumor y el tamaño de las partículas de itrio 90, la infusión de estas propicia que se depositen a nivel tumoral con lo cual emiten radiación de alta energía y de baja penetrancia que destruye las células tumorales (Martínez J., *et al.* 2016).

Para etapas más avanzadas de CHC se emplean medicamentos oncológicos tratando de detener tanto el crecimiento como el avance tumoral, dada la variedad de agentes etiológicos y múltiples mutaciones sin una patognomónica específica es imposible inhibir el proceso tumoral del CHC mediante un tratamiento dirigido a una única diana terapéutica e incluso no existía tratamiento farmacológico específico para estos pacientes hasta el año 2007 con la aparición del Sorafenib que mejoró la supervivencia de este grupo de pacientes (Martínez J., *et al.* 2016).

### 1.2.2.6 QUIMIOTERAPIA

El agente estándar de tratamiento de primera línea para el CHC avanzado es el Sorafenib<sup>16</sup>, además de este fármaco, en los últimos años se han evaluado diversos agentes dirigidos a mecanismos moleculares específicos del CHC, la mayoría de estos agentes son antiangiogénicos, inhibidores del ciclo celular o de los receptores tirosina-cinasa, a su vez clasificados como tratamientos de primera línea que incluyen Sunitinib, Erlotinib, Linifanib Lenvatinib y la combinación de Atezolizumab con Bevacizumab, por otro lado se tiene el grupo de segunda línea que incluye Brivanib, Everolimus, Ramucirumab, Regorafenib, Cabozantinib (Reig, M., *et al.* 2021; Armengol C, *et al.* 2017).

#### 1.2.2.6.1 FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA.

**Sorafenib** es un inhibidor multikinasa de la cinasa Raf, la cual está involucrada en la proliferación de células cancerosas, y también del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2/-3 (VEGFR-2/-3) y del receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) - $\beta$ , que se sabe que están involucrados en la neovascularización peritumoral (Masafumi M., *et al.*, 2018). Forma parte de la familia de inhibidores de tirosina quinasa (Reig, M., *et al.* 2021), inhibe múltiples vías de señalización y RTK, como la cinasa de raf, VEGF-R2, VEGF-R3 y PDGFR- $\beta$  con lo cual se conduce a la inhibición de la angiogénesis, invasión y metástasis (Katzung, B., y Trevor, A. 2019), además de incrementar la apoptosis, retrasar la proliferación celular y reducir la angiogénesis, tiene un buen perfil de seguridad, con efectos adversos bien tolerados y manejables, siendo los frecuentes de tipo dermatológicos, además de astenia, diarrea e HTA (Armengol C, *et al.* 2017).

**Sunitinib** Inhibe múltiples RTK, incluidos VEGFR1, VEGF-R2, VEGF-R3, PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$  con lo que se inhiben la angiogénesis, invasión y metástasis (Katzung, B., y Trevor, A. 2019).

**Erlotinib** Inhibe la tirosina cinasa de EGFR que conduce a la inhibición de la señalización de EGFR (Katzung, B., y Trevor, A. 2019).

**Lenvatinib** Forma parte de la familia de inhibidores de los receptores tirosina cinasa (RTK) que inhibe selectivamente la actividad cinasa de los receptores del

factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) VEGFR1 (FLT1), VEGFR2 (KDR) y VEGFR3 (FLT4), además de otros RTK relacionados con las vías oncogénicas y proangiogénicas como los receptores del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) FGFR1, 2, 3 y 4, y el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) PDGFR alfa, KIT y RET., cada uno de ellos se dirige a dianas diferentes y presentan un perfil de seguridad propio (Reig, M., *et al.* 2021).

**Atezolizumab** es un inhibidor del ligando de muerte programada 1 (PD-L1) lo que evita que se transmita una señal supresora a los linfocitos T y por tanto se reduzca la proliferación y disminuya la respuesta inmunitaria (Reig, M., *et al.* 2021; Núñez, M., *et al.* 2022).

**Bevacizumab** se trata de un anticuerpo monoclonal contra VEGF (Reig, M., *et al.* 2021).

#### 1.2.2.6.2 FÁRMACOS DE SEGUNDA LÍNEA

**Brivanib:** Es un inhibidor dual selectivo del VEGF y de los receptores del FGF que están implicados en la tumorigénesis y la angiogénesis del CHC (Llovet, J., *et al.* 2013).

**Everolimus** Este se une a la proteína 12 que se une a FK506, una inmunofilina circulante, formando un complejo activo que bloquea el objetivo molecular de la mTOR, componente clave de una compleja vía de señalización intracelular implicada en procesos celulares como la proliferación, el crecimiento, la angiogénesis y el metabolismo (Katzung, B., y Trevor, A. 2019).

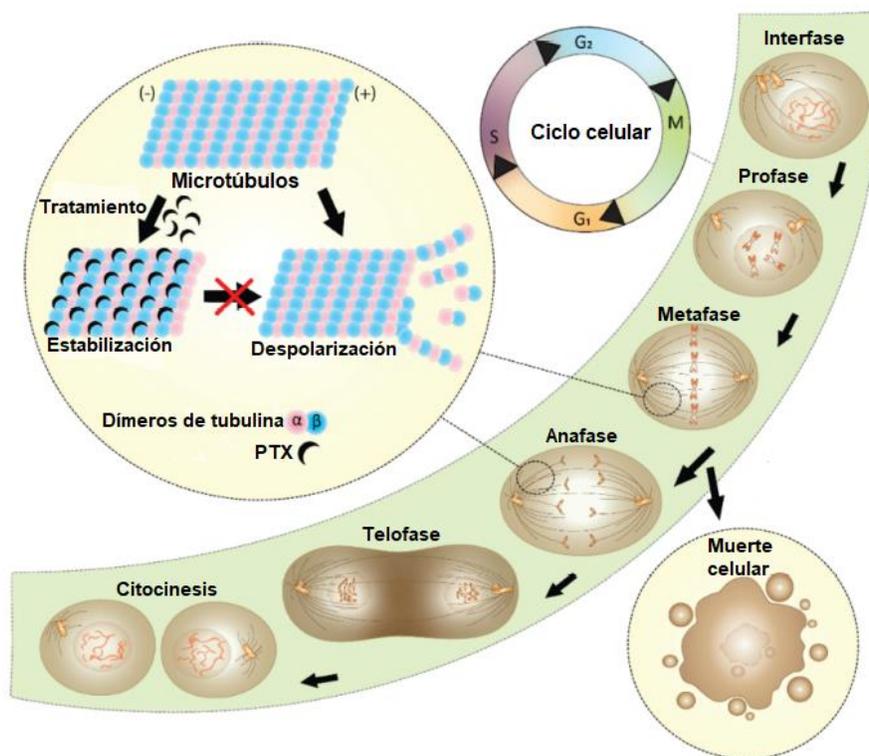
**Ramucirumab:** Anticuerpo monoclonal, se une específicamente y con alta afinidad al dominio extracelular de VEGFR-2, evitando la unión de VEGF a su receptor (Reig, M., *et al.* 2021).

**Regorafenib:** Es un inhibidor oral multikinasa que actúa bloqueando diferentes cinasas, entre ellas la tirosina cinasa (TK) de molécula pequeña, que son participes de la angiogénesis, la oncogénesis y el microambiente tumoral, tampoco se conoce el mecanismo antitumoral preciso (Reig, M., *et al.* 2021; Armengol C, *et al.* 2017; Katzung, B., y Trevor, A. 2019).

**Cabozantinib:** Inhibidor tirosina quinasa que actúa sobre múltiples receptores como VEGF 1, 2 y 3, MET y AXL, entre otros (Reig, M., *et al.* 2021).

#### **1.2.2.7 PACLITAXEL**

El paclitaxel (PTX) es un éster alcaloide derivado del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) y el tejo europeo (*Taxus baccata*) (Katzung, B., y Trevor, A. 2019). El PTX es la quimioterapia sistémica o combinada para múltiples tipos de cáncer, incluido el CHC, su efecto antitumoral eficaz es mediado por una variedad de mecanismos ya que induce directamente daño en el ADN y apoptosis, lo que lleva a la muerte celular (Liu., *et al.* 2020), funciona en la fase M del ciclo celular y su mecanismo es sobre el huso mitótico a través de una unión de alta afinidad a los microtúbulos lo que mejora la polimerización de tubulina promoviendo el ensamblaje de microtúbulos inhibiendo la mitosis y por tanto la división celular (Katzung, B., y Trevor, A. 2019). En la figura 12 se muestra el esquema del mecanismo de acción del PTX, se observa que, en las células en proceso mitótico, el PTX evita la unión de los microtúbulos a los cinetocoros, al encontrarse estos últimos libres provocan un paro mitótico que la conduce su muerte por una catástrofe mitótica (Škubník, J., *et al.* 2021).



**Figura 12. Mecanismo de acción del PTX (Škubník, J., et al. 2021).**

En resumen, el enfoque de la quimioterapia para el CHC incluye fármacos dirigidos a mecanismos moleculares específicos, como los antiangiogénicos, los inhibidores del ciclo celular o de los receptores TK, a su vez, se clasifican en tratamientos de primera y de segunda línea dependiendo el progreso de la enfermedad y la tolerancia a los otros fármacos por la generación de una ineficacia de respuesta que se debe, entre otros, al desarrollo de un mecanismo de resistencia farmacológico que es importante evitar para que la farmacoterapia sea efectiva (Armengol C, et al. 2017).

### 1.2.3 FACTORES QUE AFECTA EL TRATAMIENTO EN CHC

Además del daño en el hígado por el propio CHC y los estadios previos de la enfermedad, parte de la ineficacia de los fármacos se debe a al desarrollo de resistencia a la acción farmacológica de estos, lo cual es necesario evitar o reducir

mediante el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas o fármacos adyuvantes para que la terapia sea más efectiva (Reig, M., *et al.* 2021).

### **1.2.3.1 RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS (MDR)**

Al hecho de que la mayoría de los pacientes tienen cirrosis y el propio CHC puede afectar el metabolismo de los fármacos lo que aumenta el grado de toxicidad, se considera al CHC como uno de los tumores más quimiorresistentes (Martínez J., *et al.* 2016) lo que genera una falta de respuesta al tratamiento y la recidiva de tumores que inicialmente eran sensibles a la farmacoterapia, por ello, la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas a la quimiorresistencia en las células tumorales ha favorecido la investigación de los mecanismos que la provocan y de potenciales sustancias que sean capaces de inhibirla.

La definición de quimioresistencia está principalmente asociada con la resistencia que pueden generar organismos patógenos a compuestos químicos, particularmente fármacos que a ciertas dosis son letales para su especie, por lo que tienen mayor probabilidad de sobrevivir, reproducirse y heredar la resistencia a su descendencia con un progresivo incremento hacia la adaptación incluso total a elevadas dosis del compuesto tóxico (Astudillo, H., *et al.* 2010).

En el caso de los pacientes con tumores, ellos pueden inicialmente responder al tratamiento con quimioterapéuticos convencionales, pero con elevada frecuencia se producen resultados insatisfactorios que generan una recaída en su evolución producto de una mala respuesta al tratamiento farmacológico debido principalmente a la adquisición de una resistencia a múltiples fármacos (MDR: multidrug resistance por sus siglas en inglés) por parte de las células tumorales (Astudillo, H., *et al.* 2010; Liu, X., *et al.* 2016). La MDR es un fenómeno de ineficacia de la quimioterapia que se produce cuando los tumores desarrollan resistencia cruzada a diversos fármacos sin relación estructural ni mecánica, y suele ser porque las células tumorales poseen una serie de mecanismos celulares que las protegen contra los efectos citotóxicos

de estos fármacos (A Ho, E., y Piquette, M. 2006), esto lo convierte en una limitación importante de la eficacia de la quimioterapia (Abbas, S., *et al.* 2019).

La elevada tasa de mortalidad en el CHC que se comporta como una relación cercana al 1:1 en comparación con la incidencia, se debe al diagnóstico tardío, la falta de un tratamiento adecuado y a la generación de mecanismos de protección hacia los agentes farmacológicos por parte de las células, esto último es el motivo por el que muchos pacientes en etapa avanzada que responden inicialmente, desarrollan una mala respuesta a la quimioterapia, con mayor probabilidad de tener recurrencia y disminuyendo la tasa de supervivencia (Liu, L., *et al.* 2008; Wisnu, Y., y Aryandono, T. 2019). Se ha reportado la posible existencia de una asociación entre el desarrollo de MDR y una alterada expresión de diversos genes implicados en las vías de transporte celular, metabolismo, mitogénesis y supervivencia, por lo cual existen diversos mecanismos de resistencia en las células cancerígenas (Ho, E., y Piquette, M. 2006; Abbas, S., *et al.* 2019).

### **1.2.3.2 MECANISMOS DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS**

En la MDR se desarrolla una resistencia cruzada ante fármacos antineoplásicos diferentes en estructura y función, dentro de los mecanismos más comunes que pueden suscitarse de forma independiente o combinada para generar la MDR en el cáncer se encuentran los cambios en la expresión de los objetivos terapéuticos como la dihidrofolato reductasa, la timidilato sintasa y las topoisomerasas I y II, cambios en el nivel y actividad de algunas enzimas metabólicas como la glutatión-S transferasas (GST) y superóxido dismutasas, incremento de la tolerancia celular al daño y reparación inducida por fármacos mediante alteraciones en genes o proteínas como la p53 y la Bcl-2 involucradas en la apoptosis, pero, en el presente trabajo nos centraremos en uno de los mecanismos principales y más estudiados en la MDR que es la sobreexpresión de las bombas de glicoproteínas transmembrana pertenecientes a la superfamilia ABC o de cassettes de unión a trifosfato de adenosina (ATP), en los cuales el ATP se hidroliza para transportar los fármacos a través de un poro transmembrana (Ho, E., y Piquette, M. 2006; Abbas, S., *et al.* 2019). En los humanos los transportadores ABC se expresan en diversas

células y tejidos, principalmente órganos secretores y de absorción como barrera placentaria, tejido sanguíneo, el hígado, los riñones, el intestino y la barrera hematoencefálica, poseen importantes funciones fisiológicas, farmacológicas y toxicológicas siendo la más importante la función protectora contra compuestos endógenos y exógenos (Abbas, S., *et al.* 2019).

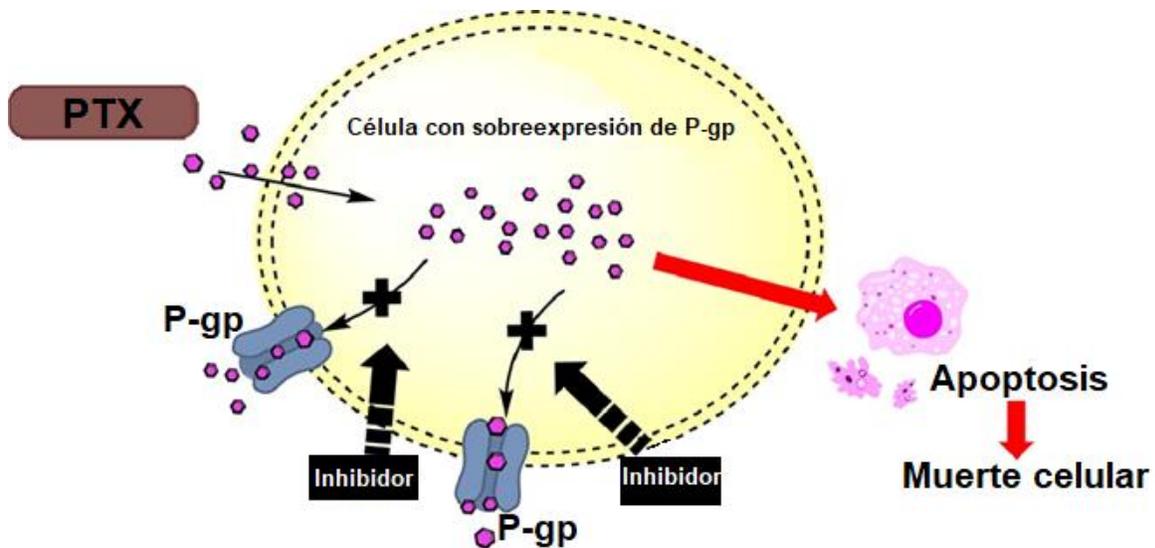
Los transportadores ABC se dividen en subgrupos, por ejemplo, la proteína resistente al cáncer de mama (BCRP, ABCG2, MXR o ABCP), las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (ABCC1, o MRP) y la glicoproteína P clásica (P-gp, MDR1 o ABCB1), la inducción de la MDR en las células cancerosas se da por la sobreexpresión de estos transportadores, particularmente, la regulación a la alza de la P-gp favorece una mayor capacidad de bombear los antineoplásicos al espacio extracelular con lo que se evita la acumulación intracelular reduciendo las concentraciones intracelulares terapéuticas (Liu, X., *et al.* 2016; Ho, E., y Piquette, M. 2006; Abbas, S., *et al.* 2019).

#### **1.2.3.2.1 GLICOPROTEÍNA P**

La P-gp también conocida como miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP (ABCB1) y proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1; Li, X., *et al.* 2018) es una proteína ubicada en la membrana extracelular con peso de 170 kDa (Astudillo, H., *et al.* 2010; Ho, E., y Piquette, M. 2006; Chang, Y., *et al.* 2018; Zhang W., y Ling V. 2000), fue aislada e identificada por primera vez en 1976 en células de ovario de hámster chino resistentes a los medicamentos (Abbas, S., *et al.* 2019; Fernández, C., *et al.* 2004). En condiciones fisiológicas, esta proteína se encuentra presente en diversos tejidos y órganos como los riñones, hígado, intestinos (yeyuno, íleon y colon), cerebro, túbulos renales, corteza suprarrenal, conductos biliares y testículos, sin embargo, se expresan niveles bajos en la mayoría de los tejidos humanos, destacando su presencia en células de la médula ósea positivas para CD34 y en linfocitos normales (Astudillo, H., *et al.* 2010; Ho, E., y Piquette, M. 2006; Chang, Y., *et al.* 2018; Zhang W., y Ling V. 2000; G. del Mora, R., *et al.* 1998), dado que posee gran similitud proteínas transportadoras

bacterianas como la hemolisina B, el sistema malk de *E. coli* y sistema hisP del *Staphilococcus typhimurium* se sugirió poseía un mecanismo de acción como transportador de membrana (Astudillo, H., *et al.* 2010), por lo que tiene una función protectora del organismo al actuar como una bomba de salida desde el citoplasma celular al espacio extracelular ante una amplia especificidad a diversas sustancias, principalmente xenobióticos compuestos orgánicos anfipáticos, metabolitos de tipo catiónicos, hidrófobas, metabolitos tóxicos, toxinas, nutrientes, iones, péptidos, hormonas esteroides y bloqueadores de los canales de calcio y quimioterapéuticos, no iónicos voluminosos, como antraciclinas y alcaloides de la vinca, sustancias lipofílicas y taxanos (Ho, E., y Piquette, M. 2006; Abbas, S., *et al.* 2019; G. del Mora, R., *et al.* 1998; Fernandez, C., *et al.* 2004; Li, X., *et al.* 2018), cuando se sobreexpresa, el nivel de la P-gp se relaciona con el origen y gravedad de la MDR responsable de respuestas deficientes a la quimioterapia y la progresión del cáncer (Zhang W., y Ling V. 2000; Mirzaei, S., *et al.* 2022; Fernandez, C., *et al.* 2004).

La P-gp es una glicoproteína con función de bomba de flujo dependiente de ATP (Zhang W., y Ling V. 2000), consta de 1280 aminoácidos formada por dos mitades pseudosimétricas cada una con un dominio transmembrana largo (TMD) y un dominio de unión a nucleótidos (NBD) intracelular, cada mitad presenta una parte N-terminal hidrofílica (residuos 1–637) y una parte C terminal hidrofóbica (residuos 638–1280), cada cadena cuenta con seis regiones transmembrana que le da una estructura característica de un poro de membrana, en la parte intracelular hay una región hidrofílica a la que se liga una molécula de ATP y favorece su hidrolización, lo que le confiere un mecanismo de acción dependiente de la energía dado que la activación de la proteína se da tras el enlace del fármaco con el sitio de unión en la parte NBD intracelular, lo que produce alteraciones conformacionales para ser liberado en el otro lado de la proteína (espacio extracelular) como se observa en la figura 13 (Astudillo, H., *et al.* 2010; Ho, E., y Piquette, M. 2006; Chang, Y., *et al.* 2018; G. del Mora, R., *et al.* 1998; Mirzaei, S., *et al.* 2022).



**Figura 13. Célula resistente a la quimioterapia por sobreexpresión de glicoproteína-P (P-gp)**

Se han descrito dos tipos diferentes de P-gp en humanos codificadas por una pequeña familia de genes llamada familia MDR y específicamente por los genes MDR 1 y 2, la clase 1 es la más numerosa que confiere un fenotipo MDR por su sobreexpresión y relación con el transporte de fármacos en células tumorales (G. del Mora, R., *et al.* 1998; Fernandez, C., *et al.* 2004). La expresión de esta proteína en tejidos normales y líneas celulares MDR puede estar regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Li, X., *et al.* 2018) por el ADN, ARNm y proteína en diferentes niveles, sin embargo, la expresión y función de P-gp se ha observado en células que no tienen un aumento aparente de ARNm o amplificación génica (Zhang, W., y Ling, V. 2000), tanto la expresión de ARNm como la expresión y función de la P-gp están influenciadas por compuestos endógenos y xenobióticos (Fernández, C., *et al.* 2004).

Los factores de transcripción, es decir, proteínas que inician el proceso de transcripción relacionadas con la inducción de P-gp son p53, YB-1 y NF-κB, su papel regulador directo de P-gp se da al unirse a las regiones promotoras del gen MDR1, mientras que las vías de señalización que se asocian con la inducción de P-gp son la PI3K/AKT, proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y señalización de

Wnt/ $\beta$ -catenina (Li, X., *et al.* 2018), después de la transcripción génica la P-gp se modifica por fosforilación y glicosilación (G. del Mora, R., *et al.* 1998).

La fosforilación ocurre en los residuos de serina y treonina por la proteína quinasa C (PKC)  $\alpha$ , sustancias activadoras de PKC, como el diacilglicerol y sus análogos, aumentan la expresión del ARNm del gen MDR1 y reducen la acumulación intracelular de antineoplásicos adriamicina, vinblastina y daunomicina lo que genera líneas celulares MDR, sin embargo, pese a que la fosforilación de P-gp por PKC puede ser necesaria para que funcione, también se ha observado que el estado de fosforilación de P-gp es independiente de su capacidad de transporte, por lo que la PKC a través de la activación de ras, puede desempeñar un papel en la inducción del fenotipo MDR en células que están bajo presión de xenobióticos (G. del Mora, R., *et al.* 1998).

## 2 ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos han sugerido una estrecha correlación entre la RI con cáncer, incluido el de hígado (Donadon V., *et al.* 2009; Wang, Y. G., *et al.* 2014; De Fronzo R., y Ferrannini E. 1991) al ser la RI una condición patológica en la que la función de la insulina está alterada en los tejidos diana periféricos, tiene un papel importante en la fisiopatología de enfermedades metabólicas que incluyen obesidad, HTA, diabetes, dislipidemia, ECV y EHGNA (Farrell G. 2014; Tsugane, S., y Inoue M. 2010).

Las personas con RI tienen una mayor probabilidad de desarrollar HGNA y posteriormente cirrosis hepática que a su vez aumenta el riesgo de cáncer de hígado (Kim JH *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2012; Schlesinger S, *et al.* 2013), por otra parte, reportes indican que la RI ha demostrado ser un factor de riesgo independiente que afecta a la supervivencia y recaída posquirúrgica de pacientes con cáncer (Feng Y., *et al.* 2011).

Los tratamientos con quimioterapéuticos convencionales produce con frecuencia resultados insatisfactorios debido principalmente a la adquisición de una MDR por parte de las células tumorales, sin embargo, los mecanismos exactos de esta resistencia a los antineoplásicos por parte de las células tumorales que pudiesen ser inducidos por la RI aún no se conocen bien.

Se ha sugerido que la MDR es causada por la regulación al alza de la P-gp, lo que conduce a una mayor capacidad de las células cancerosas para bombear quimioterapéuticos del espacio intracelular al exterior de la célula, evitando así la acumulación intracelular de fármacos. Y como anteriormente se mencionó la regulación positiva de las proteínas antiapoptóticas y la vía apoptótica anormal, también están involucrados en la MDR (Huesker M, *et al.* 2002).

Estudios recientes han demostrado que diferentes condiciones pueden modular la expresión y la actividad de los transportadores MDR. Por ejemplo, la inflamación ocurre a través de un complejo proceso citológico y una serie reacciones químicas, en la mayoría de los microambientes tumorales puede jugar un papel crítico en el desarrollo del cáncer y es capaz de alterar la expresión y función de los transportadores MDR, las citocinas y las prostaglandinas son potentes mediadores

inflamatorios que pueden modular la expresión de MDR a niveles transcripcionales y postranscripcionales en la mayoría de los cánceres y contribuir potencialmente a equilibrar la biodisponibilidad de los agentes quimioterapéuticos, por ello es común que parte de las quimioterapias combinadas útiles en una variedad de protocolos de tratamiento del cáncer incluyan glucocorticoides y los AINES, además de las actividades antiinflamatorias de estos agentes, ejercen efectos moduladores sobre la resistencia a fármacos mediada por MDR a través de mecanismos específicos donde varios factores, incluidos los tipos de células y proteínas MDR, la farmacocinética y la farmacogenética, influyen principalmente en los mecanismos reguladores de la terapia antineoplásica (Mirzaei *et al.*, 2019). En un estudio Liu X., *et al.*, observaron que la RI contribuye a una posible generación de MDR en células HepG2 por medio de la activación de la vía de señalización PERK y la regulación positiva de Bcl-2 y P-gp, ellos encontraron inflamación en el retículo endoplásmico de la línea HepG2/RI y al ser tratadas con un agente citotóxico como el cisplatino mostraron niveles significativamente elevados de proteína 78 regulada por glucosa (GRP78), proteína fosforilada (p-PERK), expresión elevada de la P-gp y la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo cual sugiere que la sobreexpresión de la proteína chaperona GRP78 del RE induce fosforilación de la quinasa PERK que activa la vía de transducción de señales de estrés del RE y generando sobreexpresión de Bcl-2 y P-gp (Liu, X., *et al.* 2016). En otro estudio, Ho, E., y Piquette, M., realizaron una revisión indicando una posible regulación de la MDR por citocinas proinflamatorias, en ella se hace mención de una sobreexpresión de la P-gp en procesos con inflamación crónica, declarando un efecto opuesto al observado en inflamación aguda donde hay una desregulación de la expresión de esta proteína, por lo que se sugiere emplear una terapia alternativa para el cáncer enfocada en aumentar la concentración de los fármacos quimioterapéuticos en su sitio objetivo mediante la modulación de los transportadores inductores de MDR, prestando atención a las posibles terapias dirigidas a modular la expresión de citocinas (Ho, E., y Piquette, M. 2006). A su vez, en Abbas, S., *et al.*, realizaron una revisión describiendo las interacciones que pueden existir entre la vía inflamatoria y la regulación de la MDR del cáncer, lo que encontraron fue que diversos estudios realizados sobre citocinas

proinflamatorias han mostrado que la expresión del gen MDR1, fue suprimida por la administración de IL-6 en hepatocitos primarios de rata y ratones *in vivo*, esto sugiere que la expresión de la P-gp muestra una disminución de mediada por inflamación, también señalan el posible papel del TNF- $\alpha$  en la disminución de la expresión de P-gp hepática de ratones inducida por endotoxinas, por otra parte, encontraron que la actividad de P-gp y la transcripción génica se redujeron en células de CHC humano tratadas con IL-1 $\beta$  o IL-6 (Abbas, S., *et al.* 2019).

Liu, L., *et al.*, reportaron que la terapia con insulina restaura la función deteriorada y la expresión de la P-gp en la barrera hematoencefálica de diabetes experimental, ellos concluyen que el nivel apropiado de insulina podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la función normal de la barrera hematoencefálica a través de la regulación de la función y expresión de P-gp en ratas diabéticas y normales (Liu, L., *et al.* 2008), por otra parte, Fernández, C., *et al.*, reportaron una probable influencia de las citocinas proinflamatorias en la expresión y funcionalidad de la P-gp, en esta revisión se reporta que numerosos estudios han demostrado una posible modulación de la expresión y funcionalidad de diversas proteínas, entre ellas a la P-gp (Fernández, C., *et al.* 2004), así mismo, en el 2018 se reportó que en células de mamíferos, la vía de señalización de JNK-AKT-NF- $\kappa$ B puede controlar la expresión de la P-gp para atenuar la citotoxicidad del deoxinivalenol en ellas, Li, X., *et al.*, sugieren que p53, YB-1, NF- $\kappa$ B (entre otras vías) están involucradas en la regulación directa de P-gp al unirse a las regiones promotoras del gen MDR1 codificante de esta glicoproteína (Li, X., *et al.* 2018), por último, Liu, R., *et al.*, en una revisión proponen un vínculo clave que modula la MDR en las células cancerosas a través de la activación aberrante de la vía PI3K/AKT que tiene un sinergismo con NF- $\kappa$ B, mTOR y por tanto, un papel en la inhibición de apoptosis, aumento del crecimiento celular y metabolismo celular, a través de la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis, transportadores ABC, síntesis de glucógeno y regulación de la glicolisis (Liu, R., *et al.*, 2020).

Es precisamente por estas controversias reportadas, donde hay represión o sobreexpresión de la P-gp y otros mecanismos MDR que es necesario aumentar la

investigación de la posible relación entre la RI, la modulación del NF- $\kappa$ B y la MDR para comprender la regulación fisiológica de la P-gp y otros transportadores involucrados en la MDR por parte de la RI, lo que será clínicamente útil para ayudar a mejorar la eficacia del tratamiento y por tanto, la disminución de la tasa de mortalidad por cáncer.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

El CHC es el sexto tipo de cáncer en incidencia y el tercero en mortalidad a nivel mundial. Dentro de los factores etiológicos se encuentran el HGNA y moléculas proinflamatorias que modulan la actividad del NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción relacionado con la defensa, supervivencia y proliferación celular.

La elevada mortalidad del CHC se debe al diagnóstico tardío, tratamientos inadecuados y la generación de resistencia a la terapia farmacológica como el PTX, por diversos mecanismos de defensa como la sobreexpresión de la P-gp que incrementa la capacidad de las células cancerosas para expulsar a los fármacos antineoplásicos al exterior de las células.

A su vez, estudios experimentales involucran que vías de señalización asociadas a la RI pueden estar implicadas en la modulación del NF- $\kappa$ B, que, en su papel de factor de transcripción, se activa al translocarse al núcleo con lo que genera la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la defensa, el crecimiento y la supervivencia de la célula, entre ellas la P-gp que tiene un importante papel en la generación de quimioresistencia al tratamiento del cáncer.

Además, se ha sugerido que la mala evolución de los pacientes con CHC se asocia con alteraciones metabólicas como la RI y procesos inflamatorios en el hígado, sin embargo, los mecanismos exactos se desconocen.

Por lo que identificar la posible relación de la RI en la modulación del NF- $\kappa$ B y la posterior inducción de expresión de la P-gp que favorece el desarrollo de la MDR, se convierte en un interesante motivo de estudio para la búsqueda de blancos terapéuticos que puedan ser considerados como adyuvantes o alternativos para el tratamiento farmacológico del CHC y con ello reducir el problema de resistencia a la farmacoterapia y por tanto obtener mejores resultados que impacten en la salud del paciente.

## **4 HIPÓTESIS**

La inducción de resistencia a la insulina contribuye al desarrollo del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos asociado a la activación del NF- $\kappa$ B en células HepG2 de carcinoma hepatocelular.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

- Analizar el impacto de la inducción de resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF- $\kappa$ B en células HepG2 de carcinoma hepatocelular.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar la inducción de la resistencia a insulina en la línea celular HepG2/RI
- Analizar la expresión y localización de P-gp asociada al fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células HepG2/RI por inmunofluorescencia
- Investigar el efecto de la reversión de la resistencia a insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células HepG2/RI
- Analizar la expresión y localización de NF- $\kappa$ B en células HepG2/RI por inmunofluorescencia
- Investigar el efecto de la estimulación con insulina y PTX en la producción y liberación de TNF- $\alpha$  en células RAW 264.7, mediante la cuantificación de la citocina por la técnica de Elisa.
- Evaluar el efecto modulador de pioglitazona (fármaco insulinosensibilizante) en la proliferación de células HepG2 estimuladas con insulina y tratadas con PTX.

## **6 METODOLOGÍA**

### **6.1 CULTIVO CELULAR**

Las células HepG2 fueron cultivadas en placa de 96 pozos, con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Gibco™ (DMEM, Thermo Fisher Scientific) suplementado al 10% suero fetal bovino (SFB, Biowest) y antibiótico-antimicótico 100X Gibco™ (Thermo Fisher Scientific) para células HepG2/PTX. Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo, atmósfera de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al 5% a 37°C de temperatura.

### **6.2 INDUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE RESISTENCIA A INSULINA EN CELULAS HEPG2**

Se generó una línea celular derivada de células HepG2 denominada HepG2 resistente a la insulina (HepG2/RI) de acuerdo con el protocolo previamente establecido y validado por Rocha Garduño *et al.*, 2022.

La RI se indujo por exposición de las células HepG2 parentales en medio DMEM sin suplementar a una concentración de insulina de  $1 \times 10^{-6}$  mol/L (previamente determinada por Rocha Garduño *et al.*, 2022) durante 24 h, a 37 °C, en un ambiente humidificado con CO<sub>2</sub> al 5%, como previamente fue reportado Liu *et al.*, 2015. Las células control no fueron expuestas a la insulina. Posteriormente, las células se estabilizaron por 24 h en el medio correspondiente suplementado con SFB al 10%, hasta la realización del experimento.

Para validar la correcta inducción de la RI en las células HepG2/RI, se analizó la capacidad de captación de glucosa. Para ello, las células HepG2/RI fueron sembradas en placas de 96 pozos, donde se determinó la capacidad de captación de glucosa utilizando el kit Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit (Cayman Chemical, Item No. 600470) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la determinación del contenido de lípidos intracelulares se llevó a cabo por medio de la tinción de rojo oleoso con base a lo descrito previamente por Liu, et al., en 2011, donde, posterior al tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por 30 min, entonces las células se tiñeron con rojo oleoso (3 mg/mL) por 30 min, a temperatura ambiente, a continuación, se eliminó el exceso de colorante lavando con agua destilada. Para analizar de forma cuantitativa los lípidos celulares, se agregó isopropanol y se recuperó el sobrenadante teñido, al cual se le midió la absorbancia por espectrofotometría a 510 nm. El contenido de lípidos de las células HepG2/RI, se muestra como el cambio promedio respecto a las células control HepG2.

### **6.3 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS.**

Las células HepG2 control se mantuvieron sin ser expuestas a PTX, a su vez, se generó una línea celular derivada que se denominó HepG2 MRD(HepG2/PTX), esta MDR fue inducida por exposición de la línea parental a diversas concentraciones ascendentes de PTX. La inducción de MDR se realizó una vez obtenida la confluencia celular deseada para la línea HepG2/PTX a la cual se le retiró el medio, se hicieron lavados con PBS. Posteriormente se añadió el medio sin suplementar y las células se expusieron a la concentración de PTX determinada durante 24 o 72h, a 37°C, en CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez pasado el tiempo, las células HepG2/PTX se estabilizaron en el medio correspondiente suplementado con SFB y antibiótico hasta realizar los siguientes experimentos.

### **6.4 INMUNOFLUORESCENCIA DE LA P-GP Y DE NF-κB**

Debido a la fuerte relación como indicador y su papel en el desarrollo de la MDR se determinará la expresión de la P-gp en las células HepG2, HepG2/RI y HepG2/PTX, para este procedimiento fueron sembradas  $2 \times 10^4$  células de cada grupo en placas de cultivo de 24 pozos que contenían cubreobjetos redondos de vidrio, se mantuvieron por 24h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células se fijaron con PFA al 4% en buffer de Britton-Robinson (PEM), 15 minutos después se añadió PFA

con bicarbonato de sodio (PFA/NAHCO<sub>3</sub>) y se incubaron a temperatura ambiente por 45 minutos, en seguida, las placas fueron enjuagadas con PBS y tratadas con Triton X-100 al 0.1% (Sigma Aldrich), después, las células se incubaron con los anticuerpos primarios de ratón anti-P-gp (1:100, sc-55510 Santa Cruz Biotechnology) o anti-NF-κB p65 (1:500, Cell signaling), durante la noche a 4°C, posteriormente se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón (Alexa 647 1:500, A-21235, Molecular Probes; o anti-rabbit según sea el caso) y se incubaron una hora a 37°C, finalmente las células se tiñeron con Sytox Green (1:5000, S7020, Molecular Probes) durante 10 minutos, se montaron y tomaron imágenes mediante microscopia confocal. Los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente

## **6.5 CUANTIFICACIÓN DE TNF-α EN CÉLULAS RAW 264.7**

### **6.5.1 CULTIVO DE CÉLULAS RAW 264.7**

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC®) se cultivó en medio completo (medio DMEM suplementado con 5% de SFB) y bajo condiciones estándar de cultivo en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **6.5.2 ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS RAW 264.7 CON LPS**

Se sembraron células RAW 264.7 (2×10<sup>4</sup> células/pocillo) y se incubaron en placas de 96 pocillos en 200µL de medio completo durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de eso, se agregaron 10 µg/mL de LPS a todos los pocillos excepto a los controles y se mantuvieron en incubación por 2h. Posteriormente se realizaron los siguientes tratamientos: a) PTX; b) Insulina y c) Metformina a concentraciones no citotóxicas o vehículo (DMSO, 0.5% v/v) o indometacina (84 µM) y se incubaron durante 2h. Luego, se agregó PBS en los pocillos correspondientes a la condición basal. Finalmente, se recogieron sobrenadantes libres de células y se utilizó una parte del volumen para la cuantificación de TNF-α.

La medición cuantitativa de la producción murina de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes (medio de cultivo) se realizó utilizando el kit ELISA MAX™ DELUXE SET MOUSE TNF- $\alpha$ , de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

## **6.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS DE LAS CÉLULAS**

Dado que el PTX es uno de los fármacos utilizados en el tratamiento del CHC y que también se relaciona con la generación de la MDR, se determinó la  $CI_{50}$  de este fármaco para identificar si las células HepG2/RI han desarrollado MDR y se compararon con las células HepG2 y HepG2/PTX

El índice de resistencia al fármaco (DRI; por sus siglas en inglés) de las células se determinó mediante la razón: ( $CI_{50}$  de PTX en la línea HepG2/PTX) / ( $CI_{50}$  de PTX en células HepG2) o ( $CI_{50}$  de PTX de la línea HepG2/RI) / ( $CI_{50}$  de PTX en células HepG2).

Para obtener el cálculo de la  $CI_{50}$ , fueron sembradas 4000 células por pozo en una placa de cultivo celular de 96 pozos a las cuales se les aplicó un tratamiento de PTX con concentraciones de entre 5nM y 300nM durante 48h, pasado este tiempo se determinó el número de células viables con el kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante a una absorbancia a 450nm usando un lector ELISA automático (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

Los experimentos se realizaron por triplicado de forma independiente. Los datos se analizaron en el programa estadístico Prisma 5.0 (Graphpad Software Inc.) y la  $CI_{50}$  se determinó mediante análisis de regresión lineal.

## **6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis entre grupos se realizó la prueba t-student entre los grupos de interés \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  estadísticamente significativa.

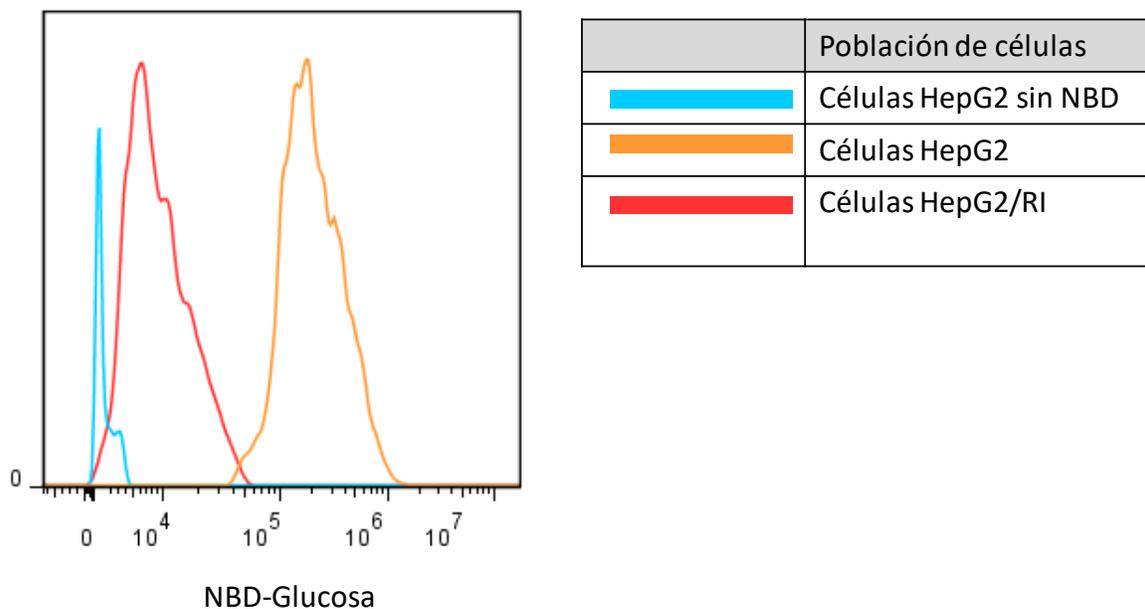
## 7 RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 VALIDACIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA EN CELULAS HEPG2/RI

Las células HepG2/RI que fueron RI previamente fueron inducidas y generadas por Rocha Garduño *et al.*, 2022 como se describe en materiales y métodos.

Para verificar la inducción de RI, se empleó un análogo fluorescente de la glucosa (NBD-glucosa) el cual fue internalizado por las células y cuantificado a través de un citómetro de flujo, los resultados se pueden observar en la figura 15 de la línea HepG2.

En la figura 14, la línea color azul muestra el resultado obtenido al analizar la captación de glucosa de las células HepG2 sin el análogo fluorescente por lo que su pico máximo se localiza a la izquierda, cercano a 0, al agregar el análogo NBD-glucosa a esta línea parental, la respuesta generada es una mayor captación de glucosa reflejada en un desplazamiento a la derecha (línea naranja), finalmente, la línea roja es el resultado de la captación dada en las células RI muestran una señal a la izquierda de la captación de la línea parental indicando su baja capacidad de internalizar la glucosa.



**Figura 14. Ensayo de captación de glucosa por citometría de flujo de la línea HepG2 y HepG2/RI.**

Una vez tratadas las células con insulina, se confirmó que existía un estadio de resistencia a la acción de esta con la cuantificación del NBD-Glucosa que es un análogo marcado con fluorescencia empleado para evaluar la absorción de glucosa por células o tejidos vivos (Cayman. 2015), la línea HepG2/RI en color rojo muestra una menor fluorescencia en comparación a la línea control (color naranja), esta diferencia confirma la inducción de una resistencia a la acción de insulina al impedir la correcta internalización de la glucosa por una posible alteración en el receptor o la vía de señalización de la insulina. Estos resultados corroboran que las células HepG2/RI son RI.

Investigaciones previas como la realizada por Levy, J., y Belsky, M. 1990, mencionan que la línea celular HepG2 es uno de los modelos celulares establecidos para estudiar la fisiología de la RI.

Además, es conocido que el incremento en la producción de lípidos intracelulares es una de las características principales de RI hepática, por lo que para validar mejor el estadio de RI inducido en las células HepG2, analizamos el contenido de lípidos intracelulares presentes en las células, como se puede observar en la figura 15 la cantidad de lípidos intracelulares incremento de forma significativa después del tratamiento con  $10^{-6}$  mol/L de insulina por 24 horas.

## Contenido de lípidos intracelulares

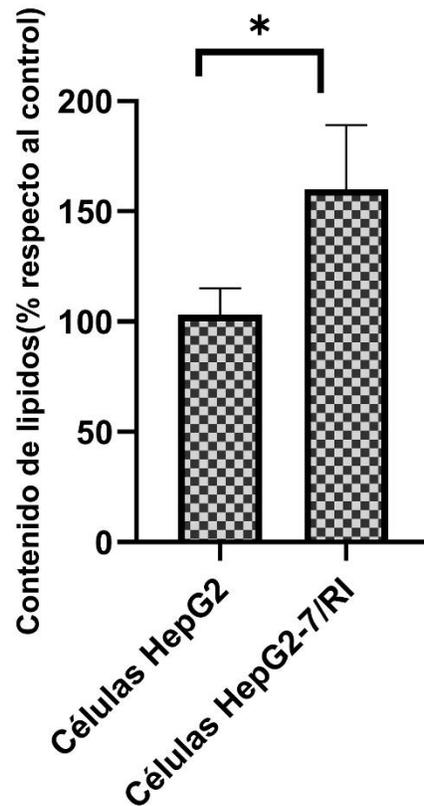


Figura 15. Análisis del contenido de lípidos intracelulares en células HepG2 y HepG2/RI. \* $p < 0.05$

## 7.2 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA P-GP EN CÉLULAS RI

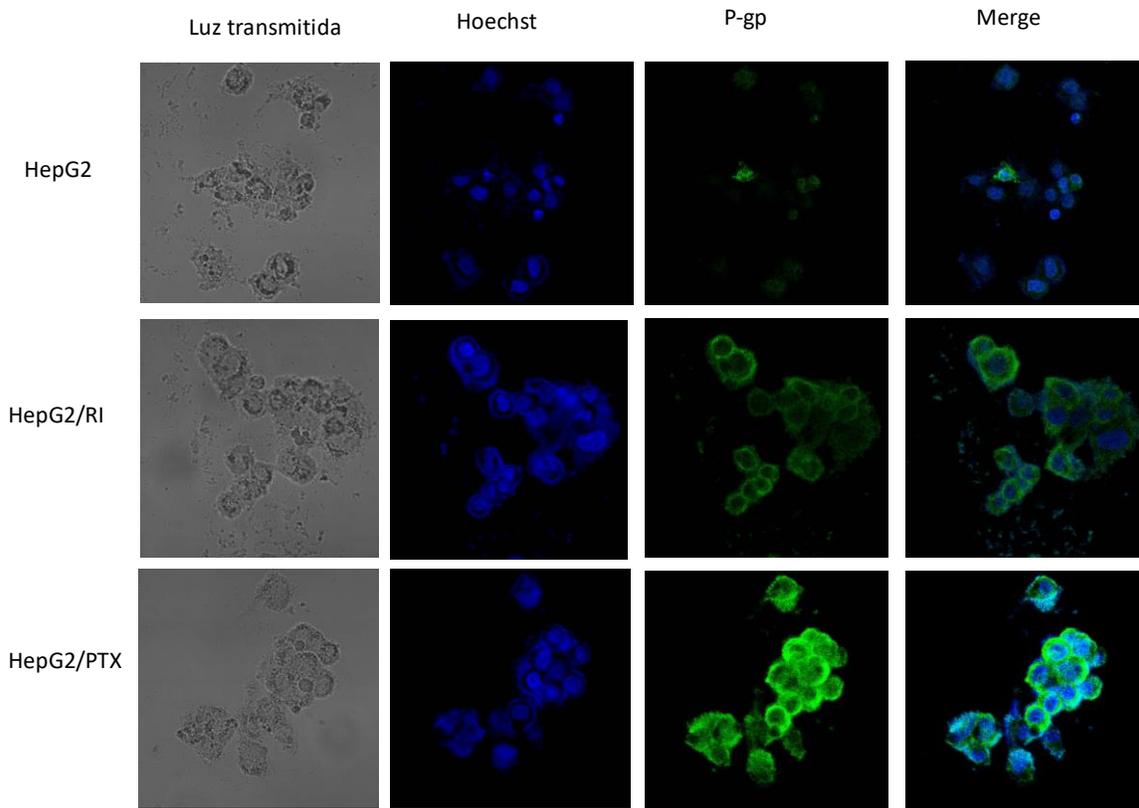
En cáncer de hígado la RI se ha relacionado con un mayor riesgo del desarrollo, progresión de la enfermedad y una mayor tasa de recurrencia después del tratamiento (Feng, Y., *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que la RI puede afectar la vía de señalización celular que regula la apoptosis (muerte celular programada), lo que podría disminuir la sensibilidad de las células cancerosas a la quimioterapia y aumentar la probabilidad de generar una MDR (Yang, L., *et al.* 2018).

La relación entre la RI y la deficiente respuesta a la farmacoterapia por el desarrollo de la MDR no está completamente comprendida, sin embargo, algunos estudios sugieren que la RI puede estar participando en el desarrollo de MDR a los agentes antineoplásicos utilizados en la quimioterapia de ciertos tipos de cáncer (Li W *et al.*, 2019).

Uno de los mecanismos involucrados en la generación de la MDR responsable de respuestas deficientes a la quimioterapia de fármacos antineoplásicos como el PTX y la progresión del cáncer, es la sobreexpresión de la P-gp (Mirzaei, S., *et al.* 2022; Fernández, C., *et al.* 2004), por lo que es común que la gravedad de la MDR se relacione con el nivel de la P-gp expresado (Zhang W., y Ling V. 2000). Por ello, el presente trabajo se enfocó en la búsqueda de la posible relación que existe entre la activación aberrante de las vías de señalización intracelular asociadas con la RI, vías inflamatorias y la sobreexpresión de la P-gp involucrada en el mecanismo de la MDR. Por lo que fue de nuestro interés analizar la expresión y localización de P-gp en las células HepG2/RI en comparación con las células HepG2 y también en comparación con un control positivo de células MDR, la línea HepG2/PTX.

Los resultados del análisis de la expresión y localización de la P-gp se muestran en la figura 16, en las filas de esta figura se tienen las líneas celulares evaluadas (HepG2, HepG2/RI y HepG2/PTX; en orden descendente), en la columna 1 (de izquierda a derecha) se observa un ejemplo de cumulo celular, en la columna 2 el cumulo celular teñido con colorante Hoechst que es un fluorocromo con capacidad permeable a la membrana plasmática por lo que ingresa en todas las células, donde distingue el núcleo al teñir el ADN con una especificidad por los pares de bases A-T (G. del Mora, R., *et al.* 1998), en la columna tres la fluorescencia emitida por la presencia de la P-gp y en la cuarta columna se muestra la combinación del resultado de la tinción de núcleos con Hoechst y de la fluorescencia de la P-gp, lo cual permite ubicar la localización de la expresión de las proteína de interés.



**Figura 16. Expresión y localización de la P-gp en las líneas celulares HepG2, HepG2/RI y HepG2/PTX**

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16 una expresión baja de P-gp en las células HepG2. De manera interesante las células HepG2/RI mostraron un incremento en la fluorescencia asociada a la expresión de P-gp en comparación con las células HepG2 control, además el resultado del Merge en las células HepG2/RI muestran la localización de P-gp en la membrana lo cual está relacionado con su activación funcional y por tanto, con el fenotipo de resistencia a la MDR. Por su parte analizamos la expresión y localización de P-gp en las células HepG2/PTX que son unas células control positivo a MDR por ser resistentes a PTX, las cuales fueron obtenidas por Sánchez *et al.*, 2022, después de ser sometidas a tratamientos crecientes de PTX, los resultados muestran una clara sobreexpresión de P-gp y su localización en membrana de las células lo cual es un indicativo del fenotipo de MDR.

Como se ha mencionado la resistencia al tratamiento quimioterapéutico puede verse impactado por la RI y algunos reportes indican que pacientes con DM2 se relacionan con peores resultados de respuesta al tratamiento farmacológico del CHC. Feng, Y., *et al.*, 2011, analizaron el efecto terapéutico de la quimioterapia intraarterial en pacientes con CHC con o sin DM, encontraron que de los 52 pacientes con CHC avanzado 14 eran diabéticos y 38 no diabético, ambos grupos se sometieron a quimioterapia intraarterial con cisplatino y fluorouracilo, los pacientes no diabéticos tenían una tasa más baja de progresión de la enfermedad de 16 % frente al 43 % de los diabéticos  $p= 0.039$ . La mediana del tiempo hasta la progresión fue significativamente mayor en los individuos no diabéticos (mediana de 206 días) en comparación con los diabéticos (mediana de 88 días;  $p= 0.02$ ), estos resultados mostraron que la quimioterapia intraarterial aplicada para el tratamiento del CHC fue menos eficaz en pacientes diabéticos, además, en la línea celular HepG2, la insulina fue más importante para promover la proliferación celular y mejorar la resistencia a los medicamentos cisplatino o fluorouracilo en comparación a la glucosa (Feng, Y., *et al.*, 2011).

### **7.3 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE RESISTENCIA A PTX EN LAS CÉLULAS HEPG2/RI.**

Nuestros resultados anteriores muestran un incremento en la expresión de P-gp en las células HepG2/RI respecto a las células HepG2 parentales, sugiriendo que la RI contribuye al desarrollo de un fenotipo de MDR asociado a la sobreexpresión de P-gp, proteína que juega un papel importante en el desarrollo de esta resistencia a diversos agentes antineoplásicos.

La sobreexpresión de la P-gp está asociada con la expulsión del fármaco antineoplásico por lo que es requerida una mayor concentración del fármaco en comparación a la inicial para lograr el mismo efecto citotóxico en las células cancerosas. Por lo anterior, para identificar si el incremento de la expresión de la P-gp que se observó en la figura 16 del presente trabajo está asociada al fenotipo de RI, se procedió a determinar la  $CI_{50}$ , es decir, la concentración del fármaco PTX que es necesaria para inhibir el crecimiento celular a la mitad (Aykul S., y Martínez,

E. 2016), este dato permite conocer la potencia de un fármaco o la capacidad de respuesta a este, por lo que con el fin de conocer si la RI por si sola presenta una inducción de resistencia a la acción de PTX, se compararon la línea control negativo a MDR HepG2 parental, la línea de prueba HepG2/RI y la línea control positivo a MDR HepG2/PTX, esta última fue tratada con concentraciones ascendentes de PTX con el fin de inducir una resistencia controlada y así emplearla como un control positivo de una línea cancerosa MDR.

En la tabla 1, se observó que la  $CI_{50}$  de las células HepG2 parentales fue de 25nM, mientras que la  $CI_{50}$  de las células HepG2/PTX se incrementó a 150nM, la línea de prueba que fue HepG2/RI requirió una  $CI_{50}$  de 50nM, con este dato se pudo obtener el índice de resistencia a fármacos (DRI), que fue de 6 para la línea HepG2/PTX y de 2 para la línea HepG2/RI, ambos valores en comparación a la línea parental, el valor del DRI es indicador de cuántas veces más es resistente al fármaco la línea celular evaluada en comparación con su línea celular original, el valor del DRI obtenido será indicativo de la sensibilidad de la línea celular al fármaco, clasificándose según el DRI de 0 a 2, >2 a 10 y >10 como sensibles a los medicamentos, moderadamente resistentes y altamente resistentes a los medicamentos respectivamente.

**Tabla 1. Concentración inhibitoria media [ $CI_{50}$ ] de las células.**

Células	PTX [ $CI_{50}$ ]	*DRI
HepG2	25nM	
HepG2/RI	50nM	2
HepG2/PTX	150nM	6

\*DRI = índice de resistencia a fármacos

Si bien el DRI es un indicativo de la sensibilidad a los medicamentos, el valor que presentan las células HepG2/RI en comparación con la línea parental fue de 2 por

lo que es necesaria el doble de la concentración del PTX para lograr inhibir la viabilidad celular en un 50%, el mismo DRI indica que la línea resistente a PTX ya era capaz de resistir hasta 6 veces la  $CI_{50}$  de la línea parental.

El incremento en la  $CI_{50}$  requerida para la línea HepG2/RI sugiere un posible efecto de MDR que podría ser explicado por una mala regulación de la función y expresión de P-gp, donde la RI estaría contribuyendo en la inducción del desarrollo de la MDR en células HepG2 por medio de la activación aberrante de vías de señalización asociadas a la insulina (Liu, X., *et al.* 2016), citocinas proinflamatorias (Ho, E., y Piquette, M. 2006; Fernández, C., *et al.* 2004), mismas que también tendrían la capacidad de regular la MDR a través de la transcripción génica, expresión y la actividad de la P-gp (Abbas, S., *et al.* 2019).

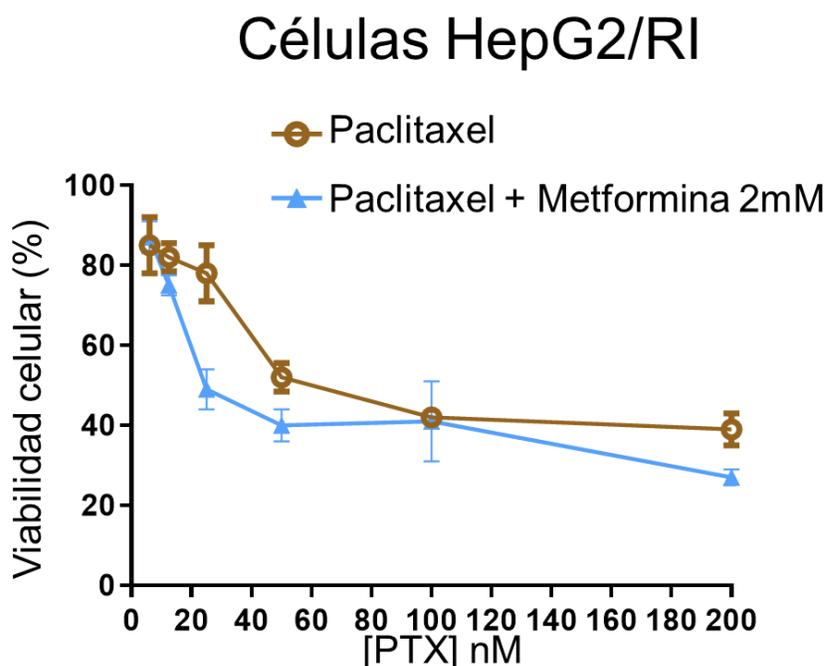
#### **7.4 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REVERSIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA SOBRE EL FENOTIPO DE RESISTENCIA EN CÉLULAS HEPG2/RI.**

Una vez que observamos que la inducción de RI promueve la expresión de la P-gp e incrementa la  $CI_{50}$  de PTX en las células HepG2/RI, nos interesó verificar que este proceso de generación de MDR estuviera relacionado con la alteración aberrante de vías de señalización intracelular afectadas por la RI por lo que investigamos que efecto tendría sobre el fenotipo HepG2/RI, el aplicar un tratamiento insulinosensibilizante que logre revertir la resistencia a esta hormona.

La metformina, un fármaco ampliamente recetado para el tratamiento de la DM2, es uno de los moduladores metabólicos más ampliamente reconocidos, además de otras propiedades moleculares como la inhibición de ROS, de la vía mTORC1 y la activación de AMPK, mecanismos que han sugerido su posible utilidad como agente antitumoral (Quin B., *et al.* 2013; Morales, D., y Morris, A., 2015), por lo que decidimos evaluar el efecto de PTX en combinación con metformina para analizar

este último fármaco mostraba algún efecto en la reversión del fenotipo MDR de la línea HepG2 generado por sobreexpresión de la P-gp.

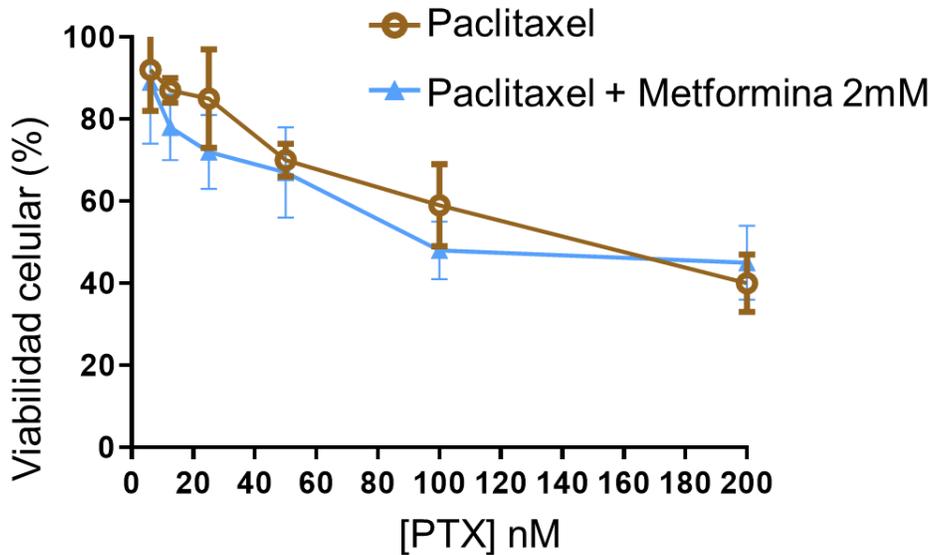
En este sentido continuando con los experimentos, las células fueran tratadas con metformina 2mM, tratamiento previamente determinado por Rocha Garduño *et al.*, 2022, el cual se ha relacionado a la reversión de la RI en células insulino dependientes como las de hígado. Los resultados (figura 17) muestran que la  $CI_{50}$  de PTX en las células HepG2/RI disminuyó cuando estas fueron tratadas con metformina lo cual sugiere una posible reversión de la MDR o la potencialización del efecto antineoplásico del PTX.



**Figura 17.** Respuesta en la viabilidad celular de las células HepG2/RI al administrar metformina con PTX.

Posteriormente analizamos el efecto del tratamiento con PTX combinado con metformina en la línea celular HepG2/PTX resistente a PTX, de manera interesante observamos que disminuyó la  $CI_{50}$  de PTX, lo que sugiere que el tratamiento farmacológico combinado, sensibilizó a las células al efecto citotóxico del PTX como se observa en la Figura 18.

## Células HepG2/PTX



**Figura 18.** Respuesta en la viabilidad celular de las células HepG2/PTX al administrar metformina con PTX.

Otros reportes han demostrado que el efecto principal de la metformina de revertir la RI podría aumentar también la sensibilidad del paciente a los fármacos quimioterapéuticos, lo que reduce tanto la progresión de los tumores y mejora el pronóstico del paciente. Esto podría ser un indicador de una posible correlación entre la RI y la tolerancia tumoral a los quimioterapéuticos. Un estudio confirmó que la RI confirió resistencia tumoral a varios fármacos quimioterapéuticos, como cisplatino, 5-fluorouracilo, vincristina y mitomicina (Liu X. *et al.* 2016).

Por su parte hay estudios que muestran que la radiosensibilización con metformina de las células de cáncer de páncreas en una concentración micromolar actúa a través de la AMPK, indicando que la metformina puede aumentar la eficacia de la radioterapia para el cáncer de páncreas (Fasih, H., *et al.* 2014).

El otro estudio Chai *et al.*, 2015 investigaron el papel de la metformina en la quimiorresistencia de las células de cáncer de páncreas a la gemcitabina y los

posibles mecanismos celulares y moleculares, encontraron que la metformina aumenta la sensibilidad de las células de cáncer de páncreas a la gemcitabina, por la supresión de la activación de la señalización de P70S6K a través de la inhibición de la fosforilación de ERK. Estudios de muestras de tumores primarios revelaron una relación entre la activación de la señalización de la P70S6K y la malignidad del cáncer de páncreas, misma que en ese estudio, a través del análisis de los datos clínicos del estudio mostro una tendencia en el beneficio de la metformina para los pacientes diabéticos con cáncer de páncreas la quimiorresistencia del cáncer de páncreas (Chai *et al.*, 2015).

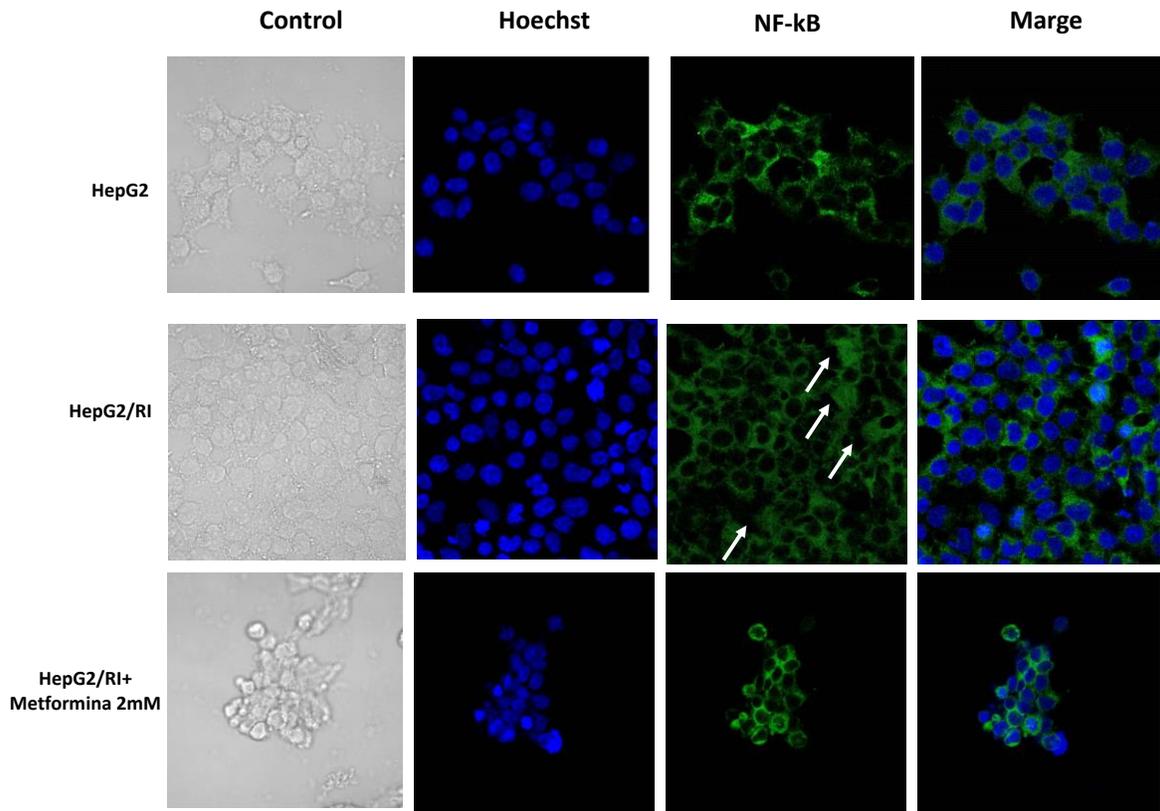
Sin embargo, los mecanismos exactos de resistencia de las células tumorales inducidas por IR a los quimioterapéuticos aún no se conocen, por ello, procedimos a corroborar su relación con la expresión y localización del NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción importante en el proceso inflamatorio, supervivencia y proliferación celular.

## **7.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE NF-KB EN CÉLULAS HEPG2/RI**

La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un evento común en muchos tipos de cáncer, incluyendo el de hígado, esta molécula está implicada en la regulación de la supervivencia celular, la inflamación y la respuesta inmunológica, algunos reportes sugieren que la RI puede activar directamente la vía de señalización del NF- $\kappa$ B, lo que a su vez puede promover la defensa, proliferación y supervivencia celular en el cáncer. además, la RI también puede aumentar la producción de citocinas proinflamatorias, que al mismo tiempo pueden activar la vía del NF- $\kappa$ B en el cáncer de hígado convirtiéndose en un círculo constante de activación mutua.

Por tal motivo nos interesó analizar el efecto de la RI sobre la activación de NF- $\kappa$ B, para lo cual mediante la técnica de inmunofluorescencia, se analizó la expresión y localización del NF- $\kappa$ B en los grupos celulares, los resultados se muestran en la figura 19, observamos que en las células HepG2 hay una expresión tenue y la

localización de NF- $\kappa$ B es en la membrana celular, mientras que en las células HepG2/RI con una resistencia a la acción de la insulina, se observó un incremento en la expresión del NF- $\kappa$ B y a su vez, la traslocación al núcleo de algunas células se ve incrementada, recordando que la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo se asocia con su activación que conlleva a desarrollar sus funciones como factor de transcripción.



**Figura 19. Expresión y localización del NF- $\kappa$ B en las líneas celulares HepG2 y HepG2/RI y HepG2/RI tratadas con metformina 2mM**

Esto sugiere un posible vínculo entre la RI y la inflamación, a través de las citocinas en células de mamíferos que se puede explicar por la activación aberrante de vías de señalización intracelulares como la vía PI3K/AKT que tiene un sinergismo con el NF- $\kappa$ B o con mTOR, estas vías de señalización y factores de transcripción tienen un importante papel en la inhibición de apoptosis, aumento del crecimiento celular y metabolismo celular a través de la expresión de proteínas relacionadas con la

apoptosis, transportadores ABC (que incluyen a la P-gp), síntesis de glucógeno y regulación de la glicolisis, es posible que la inducción de la RI en las células promueva la activación de otros receptores como el IGFS o que las vías alternativas relacionadas con moléculas inflamatorias generen una activación atípica de las vías intracelulares que culminan con la defensa de la célula neoplásica.

Reportes indican que la metformina puede potenciar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia en el cáncer mediante la reducción de los niveles de citocinas proinflamatorias y la regulación de la expresión de genes implicados en la inflamación y la supervivencia celular (Strekalova, E., *et al.* 2017).

Por otro lado, Boursi, B *et al.*, en 2017 demostraron que la metformina inhibe la proliferación de células de mieloma al estimular la apoptosis y la detención del ciclo celular mediante un mecanismo que implica la doble inhibición de las vías mTORC1 y mTORC2 mediadas por la activación de AMPK. En 2018, Wang, Y. *et al.*, indican que la metformina inhibe la expresión de una variedad de vías de señalización como IGF1, PI3K/AKT que regula la proliferación celular.

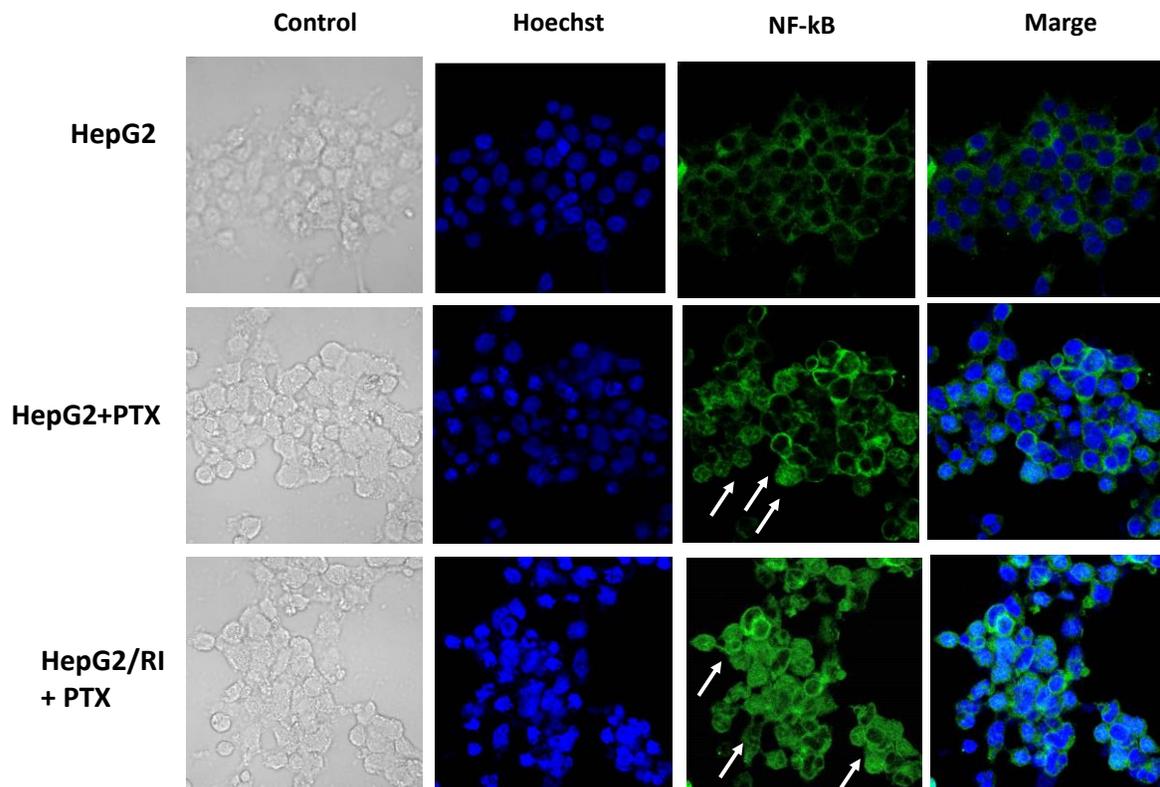
Por lo que nos interesó observar el efecto que pudiese tener la metformina como fármaco insulinosensibilizante, sobre el NF-κB, para ello se realizó un tratamiento a las células HepG2/RI con metformina 2nM. Los resultados muestran un incremento en la localización de NF-κB en la membrana asociado a su forma inactiva, sugiriendo que la RI contribuye a la activación de NF-κB.

Normalmente, los miembros de NF-κB se mantienen inactivos en el citoplasma mediante la unión con moléculas inhibitoras de la familia IκB, pero, en respuesta al estímulo adecuado como las citocinas o agentes que dañan el ADN incluidos fármacos quimioterapéuticos (Pahl H. 1999; Karin M. 1999), las moléculas de IκB se fosforilan en dos residuos críticos de serina por IKK, finalmente el NF-κB libre ingresa al núcleo y activa la transcripción de una variedad de genes que participan en la defensa celular, incluyendo la respuesta inmunológica e inflamatoria, la adhesión celular, el control del crecimiento y la apoptosis (Liu, R, *et al.*, 2020; Auphan N. *et al.* 1995; Di Donato J., *et al.* 1997; Chu Z., *et al.* 1999; Israel A. 2010).

Por lo anterior, nuestro interés se centró en comparar el efecto que puede tener el PTX sobre el NF- $\kappa$ B en los grupos de células HepG2 y HepG2/RI, esto con el fin de observar si la RI repercute de alguna manera en la activación del mencionado factor de transcripción.

Los resultados presentados en la figura 20 muestran que la expresión del NF- $\kappa$ B en la línea HepG2 fue en citoplasma, de manera interesante en esta figura se tiene que al aplicar el tratamiento con PTX en la línea celular HepG2/RI se potencializó la expresión del NF- $\kappa$ B y, además, su presencia se asocia con su activación dado que su localización fue mayormente en el núcleo celular.

Si bien en la línea celular HepG2 tratadas con PTX (15nM) se observa la localización de NF- $\kappa$ B en núcleo, el efecto en la línea celular HepG2/RI tratada con PTX fue más significativo, lo que indica una mayor activación de este factor de transcripción en una línea resistente a la insulina al responder a un agente citotóxico como el PTX.



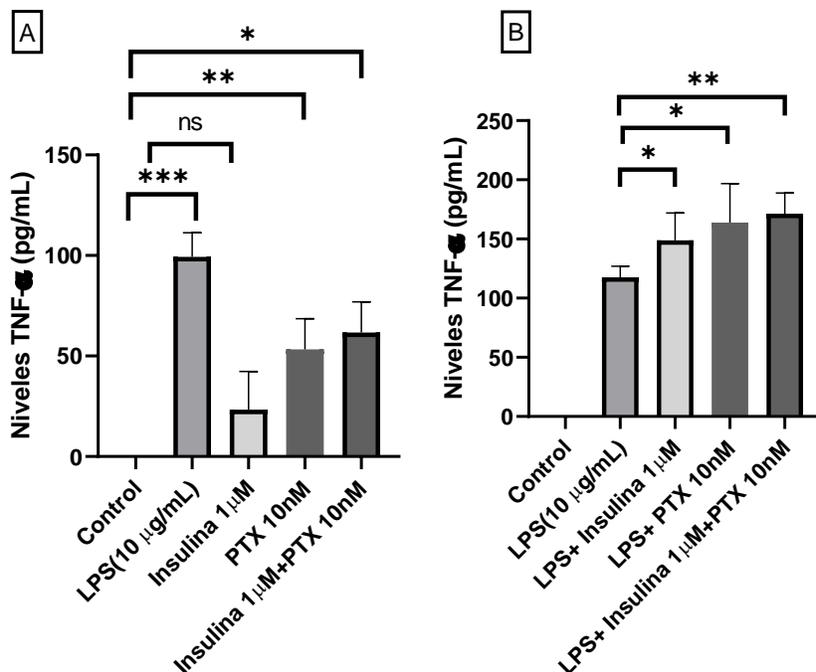
**Figura 20. Expresión y localización del NF- $\kappa$ B en las líneas celulares HepG2 y HepG2/RI tratadas con PTX.**

Nuestros resultados corroboran que el tratamiento con PTX promueve la activación del NF- $\kappa$ B y que la RI contribuye significativamente en la activación de este al aplicar un tratamiento con PTX.

La activación de la vía del NF- $\kappa$ B es esencial para llevar a cabo la transcripción de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y la supervivencia y proliferación celular, entre otras funciones relacionadas con la respuesta inmunológica, por ejemplo, el TNF- $\alpha$  que es una citocina proinflamatoria, cuando se une a su receptor específico en la superficie celular, activa una cascada de señalización intracelular que culmina con la activación de la cinasa IKK y conduce a la fosforilación e inhibición del I $\kappa$ B por tanto translocando al núcleo al NF- $\kappa$ B y activando la transcripción de genes diana.

## **7.6 CUANTIFICACIÓN DE TNF- $\alpha$**

Por lo anteriormente mencionado, nuestro interés se centró en analizar TNF- $\alpha$  en la línea de células macrófagos RAW 264.7, bajo las siguientes condiciones: C (Control sin tratamiento); LPS (tratadas con lipopolisacárido 10  $\mu$ g/mL), PTX (10nM) e Insulina (1 $\mu$ M) o en combinación de estos tratamientos. Las figuras 21A y 21B muestran los resultados obtenidos.



**Figura 21. Niveles de TNF- $\alpha$  células RAW 264.7. A) Control sin tratamiento, LPS 10 $\mu$ g/mL, PTX 10nM e Insulina 1 $\mu$ M; B) Control sin tratamiento, LPS 10 $\mu$ g/mL, LPS + PTX 10nM e LPS + Insulina 1 $\mu$ M. La prueba estadística realizada fue *t-student* \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ . ns: no estadísticamente significativo.**

Los resultados presentados en la figura 21A muestran un incremento en los niveles TNF- $\alpha$  cuando los macrófagos se estimulan con LPS, un antígeno componente de la pared celular de las bacterias gram negativas que se une al receptor TLR4 en la superficie de los macrófagos y otras células del SI, al generarse esta unión, se activa una cascada de señalización intracelular que lleva a la producción de TNF- $\alpha$ , por lo que el tratamiento con LPS en el presente experimento fue un control positivo en la producción de esta citocina. Algunos reportes sugieren que la activación de TLR4 se asocia con quimiorresistencia, por lo que nos interesó indagar el efecto de tratamientos con el antineoplásico PTX sobre la producción de TNF- $\alpha$  en la línea celular RAW 264.7. Nuestros resultados muestran figura 21A que el tratamiento con PTX, incrementó la producción de TNF- $\alpha$  respecto al control sin tratamiento de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, aunque se ve un incremento sobre los niveles de TNF- $\alpha$  en el tratamiento con insulina este incremento no fue

estadísticamente significativo, pero en el tratamiento combinados de PTX+insulina se observa un incremento de TNF- $\alpha$  estadísticamente significativo.

En la figura 21B muestra los resultados de la producción de TNF- $\alpha$  inducida como respuesta al LPS en combinación con PTX, insulina y PTX + insulina, los resultados muestran que las respectivas combinaciones con LPS muestran una diferencia estadísticamente significativa respecto al control de la estimulación con LPS.

Reportes asocian que la activación de TLR4 da como resultado la activación de la ruta de señal de NF- $\kappa$ B y la inducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (Byrd-Leifer C., *et al.* 2001; Li Y, *et al.* 2014). También se ha reportado que la señalización del TLR4 en las células tumorales puede reducir significativamente la eficacia terapéutica al promover la inflamación crónica, la angiogénesis y la recuperación de las células dañadas, por lo que estos estudios sugiere que el bloqueo de la señalización de TLR4 durante la terapia con antineoplásicos es esencial para aumentar la capacidad de respuesta de tumores primarios a los tratamientos farmacológicos y prevenir la recaída en sitios secundarios (Zainik *et al.*, 2009).

Por otra parte, la activación de los TLRs por insulina en macrófagos es un área de investigación emergente en el campo de la inmunometabolismo.

Algunos estudios sugieren que la activación de los TLRs por insulina en macrófagos puede tener un efecto negativo en la salud metabólica y por tanto, aumentar el riesgo de enfermedades metabólicas como la obesidad y DM2, por tal motivo efectuamos la evaluación del efecto de insulina sobre la activación de TNF- $\alpha$ . Nuestros resultados muestran en la figura 22A observamos PTX y la combinación de insulina + PTX incremento los niveles de TNF- $\alpha$ , respecto a los tratamientos individuales.

En general estos resultados sugieren que PTX promueve la activación de los TLR4 lo que podría estar asociado a la quimioresistencia al aumentar la respuesta de defensa en las células a las que se dirige.

Existen reportes que indican que la activación de TLR4 en los hepatocitos contribuye a la inflamación y el desarrollo de RI asociadas a la obesidad (Jia L., *et al.*, 2014).

El siguiente objetivo fue analizar el efecto que pudiesen tener los tratamientos de insulina, PTX e insulina + PTX en combinación con la estimulación con LPS en los macrófagos. Los resultados mostrados en la figura 22B indican un incremento en la producción de TNF- $\alpha$  respecto al estímulo únicamente con LPS.

Estos resultados sugieren que los tratamientos con PTX e insulina podrían aumentar la expresión y/o activación de TLR4 en los macrófagos, lo que lleva a una mayor sensibilidad a los ligandos de TLR, como el LPS y por tanto, incrementar la respuesta de los macrófagos reflejada en un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ .

Estudios asocian que el TLR4 incrementa la resistencia al PTX en células de cáncer de mama humano al activar la vía NF- $\kappa$ B, esto conlleva a la transcripción de genes proinflamatorios que alteran el microambiente tumoral (Rajput S., Volk L., y Ran S. 2013). Un estudio en células de cáncer de ovario indica que la activación del TLR4 por LPS o PTX puede promover la supervivencia del tumor y aumentar la resistencia a la quimioterapia en estas células, sugiriendo que la inhibición de la señalización del TLR4 podría mejorar la respuesta a la farmacoterapia antineoplásica (Szajnik M., *et al.* 2009).

Berguetti *et al.*, en otro estudio de 2019, en líneas celulares de cáncer cervicouterino resistentes sugieren que el TNF- $\alpha$  modula la expresión de la P-gp, lo que contribuye a la proliferación celular y podría inducir la transformación de células no tumorales adyacentes a través de vesículas extracelulares.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, aunado a lo reportado por otros grupos de investigación en el tema, son importantes para comprender el vínculo que existe entre RI, inflamación y el desarrollo de MDR en cáncer, particularmente en el CHC.

## **7.7 EFECTO DE PIOGLITAZONA (INSULINOSENSIBILISANTE) EN COMBINACIÓN CON PTX**

La activación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B es un mecanismo común en la resistencia a diversos tratamientos contra el cáncer, además este factor de transcripción juega un papel clave en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunológica (Labbozzetta M., *et al.* 2020; Abdin S., *et al.* 2021; Liu, T., *et al.* 2017). También se ha encontrado que la activación crónica de NF- $\kappa$ B puede contribuir al desarrollo de la RI, dado que la activación del NF- $\kappa$ B puede darse por diversas causas como el estrés oxidativo y la inflamación, es posible que la activación del NF- $\kappa$ B pueda disminuir la expresión de los INSR en las células y reducir la sensibilidad de los tejidos insulino dependientes a esta hormona (Baker *et al.*, 2011).

Por lo anteriormente visto, la inhibición del NF- $\kappa$ B puede reducir la inflamación, la respuesta inmunológica y también se ha asociado con la modulación de la RI, por lo que este factor de transcripción ser una potencial diana terapéutica.

Tanto el NF- $\kappa$ B como el proliferador de peroxisomas (PPAR), específicamente para este trabajo, el gamma ( $\gamma$ ), son reguladores importantes de la inflamación y la respuesta inmunológica en el cuerpo humano.

Los receptores de los PPAR son una familia de sensores críticos de lípidos, así como reguladores de diversas vías metabólicas, es justo por esta cualidad de moléculas con propiedades reguladoras metabólicas es que se ha hecho que moduladores de estas se empleen ampliamente en el tratamiento de numerosas enfermedades, incluida la dislipidemia, DM2, otros trastornos metabólicos y, en años recientes, están sumergiéndose en su asociación con el cáncer (Cheng HS *et*

*al.*, 2023). Algunos reportes indican que la activación de los PPAR- $\gamma$  inhibe potentemente la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en musculo esquelético (Remels A., *et al.*, 2009). Así mismo, la activación de PPAR- $\gamma$  por ligandos específicos como las tiazolidinedionas, puede disminuir la actividad de NF- $\kappa$ B y, por tanto, la expresión de genes proinflamatorios (Liu C., *et al.*, 2020).

La pioglitazona es un medicamento antidiabético de la clase de las tiazolidinedionas que actúa como un agonista de los PPAR- $\gamma$ , este fármaco puede mejorar la capacidad del músculo esquelético para absorber glucosa mediante la insulina, sin aumentar la producción de insulina natural, también puede mejorar las alteraciones dislipidémicas, además, la pioglitazona es efectiva en el tratamiento de DM2, algunas investigaciones anteriores indican que puede proteger contra el estrés oxidativo en el hígado y el riñón de conejos diabéticos (Yang H., *et al.*, 2009; Gumieniczek A., *et al.* 2003).

La activación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B es un mecanismo común en el desarrollo de MDR contra el cáncer y puede ser una potencial blanco terapéutico para mejorar la eficacia de los tratamientos antineoplásicos de los pacientes.

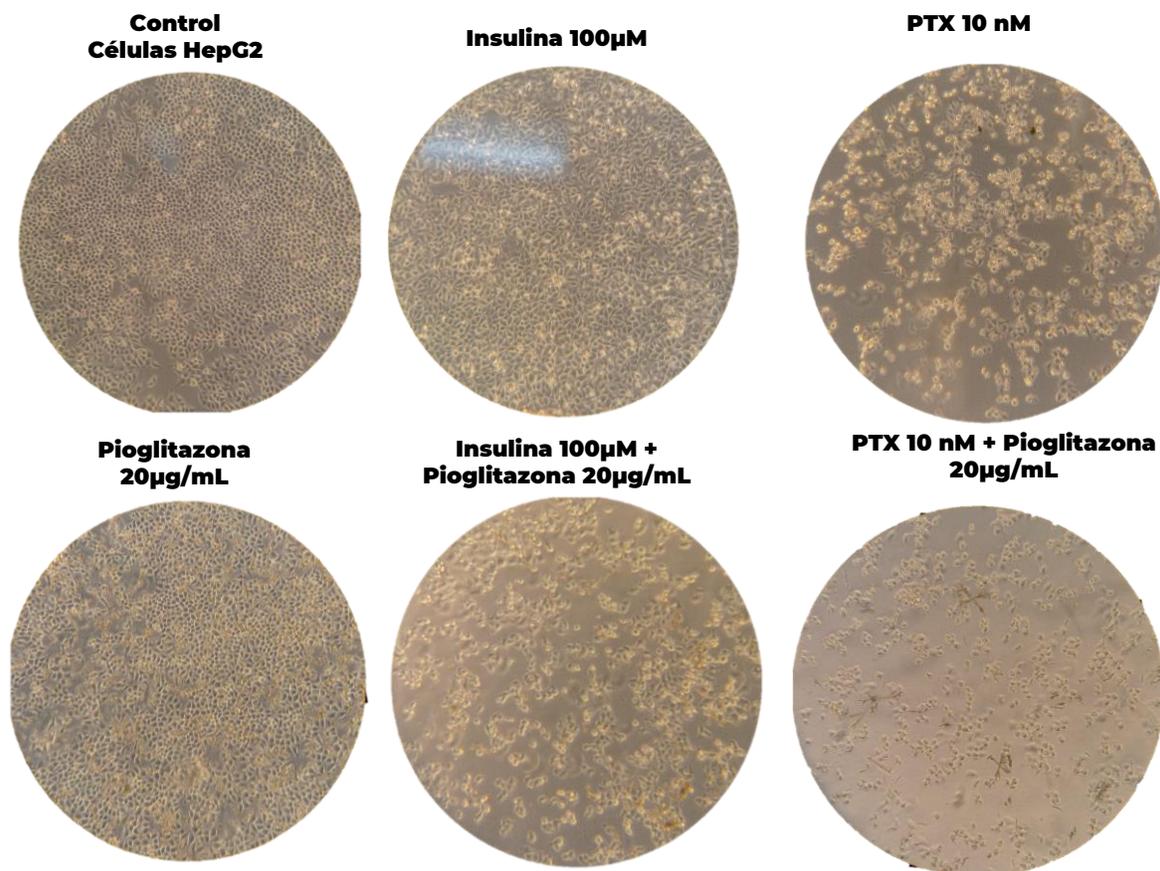
Por lo que fue de nuestro interés analizar el efecto de esta tiazolidinediona en conjunto a PTX sobre nuestras líneas celulares.

Aunado a todo lo mencionado, nos interesó analizar el efecto de pioglitazona sobre la proliferación de células HepG2 de CHC en combinación con el PTX, como antecedente nuestros resultados anteriores mostraron un efecto significativo del efecto de PTX+insulina en la activación del NF- $\kappa$ B y en la producción del TNF- $\alpha$ .

Los resultados obtenidos son presentados en la figura 22, donde se muestra que el tratamiento de las células con PTX en combinación con Pioglitazona potencializo el efecto sobre la inhibición de proliferación celular en comparación al efecto del tratamiento individual de PTX, el tratamiento de Pioglitazona individual no mostro

ningún efecto sobre la proliferación por lo que el efecto citotóxico mostrado es propio de PTX, sugiriendo que la pioglitazona podría estar regulando vías que son alteradas por PTX como la activación de NF- $\kappa$ B que anteriormente mostramos que es alterada por el tratamiento con PTX (Figura 20 ) y el incremento de los niveles de TNF- $\alpha$  asociada a la activación de TLR-4 (Figura 21).

También en la figura 22 observamos que el tratamiento con insulina promovió un efecto de aumento de la proliferación celular y cambios morfológicos asociados a un mayor tamaño celular. De manera interesante el tratamiento con pioglitazona promovió claramente un efecto sobre la inhibición de la proliferación, sugiriendo el efecto modulador de pioglitazona sobre la insulina en las células HepG2 de CHC.



**Figura 22. Efecto sobre la viabilidad y morfología celular en la línea HepG2 control; insulina, PTX, pioglitazona, insulina + pioglitazona y PTX + pioglitazona.**

Existen algunos reportes que mencionan el uso de la pioglitazona como coadyuvante, por ejemplo, en 2020, los resultados de un estudio realizado por Piątkowska I. *et al.*, en células de adenocarcinoma renal tratadas con metotrexato (fármaco utilizado comúnmente en el tratamiento de diversos tipos de cáncer) mostraron que el tratamiento combinado con pioglitazona mejoró significativamente la eficacia de la quimioterapia al reducir la proliferación de las células cancerosas y aumentar la apoptosis (muerte celular programada).

Además, el estudio también analizó los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la quimioterapia y cómo la pioglitazona puede modular estos mecanismos, se encontró que este fármaco inhibió la activación de NF- $\kappa$ B y mejoró la expresión de la proteína BAX, ambas involucradas en resistencia a la quimioterapia, por lo que el estudio sugiere que la pioglitazona puede ser una terapia adyuvante efectiva en el tratamiento del adenocarcinoma renal y que su efecto podría estar mediado por la inhibición de la proteína NF- $\kappa$ B y la mejora de la expresión de la proteína BAX (Piątkowska I., *et al.* 2020).

Finalmente, con base todo lo anteriormente mencionado y los resultados que obtuvimos, se sugiere que el tratamiento con PTX promueve la activación del NF- $\kappa$ B y este efecto se ve potencializado en células con RI. A su vez, en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 los tratamientos con PTX e insulina incrementaron los niveles de la citocina TNF- $\alpha$ , este efecto fue potencializado en respuesta al estímulo del LPS, sugiriendo la activación de TLR4 pudiera estar asociado con el desarrollo de una quimiorresistencia y el uso de un fármaco insulinosensibilizante como es la pioglitazona, potencializo el efecto citotóxico del PTX en las células HepG2 de CHC sugiriendo la inactivación de NF- $\kappa$ B y TLR4 vía activación de PPAR- $\gamma$ .

## 8 CONCLUSIONES

La inducción de la RI en células HepG2 de carcinoma hepatocelular contribuyó con el desarrollo de un fenotipo de MDR y la activación del NF- $\kappa$ B.

### 8.1 CONCLUSIONES PARTICULARES

- La línea HepG2/RI muestra un incremento en la expresión de P-gp en comparación con las HepG2 parentales lo que sugiere que la RI contribuye al desarrollo de la MDR.
- El tratamiento con PTX promueve la activación del NF- $\kappa$ B e incremento los niveles de TNF- $\alpha$ , sugiriendo que PTX favorece un ambiente inflamatorio.
- El tratamiento con metformina y pioglitazona (insulinosensibilizantes) potencializó el efecto citotóxico de PTX sobre las células HepG2/RI, sugiriendo que la modulación de la RI puede contribuir a la reversión de la MDR.
- El tratamiento de pioglitazona potencializó el efecto de PTX sugiriendo la inactivación del NF- $\kappa$ B y TLR4 vía activación de PPAR- $\gamma$ .

## 9 PERSPECTIVAS

- Realizar tratamientos con agentes hipoglucemiantes para observar el comportamiento de la RI, el proceso inflamatorio y su impacto en la inducción y reversión de la MDR en células HepG2/PTX.
- Realizar tratamientos con agentes inmunomoduladores para observar el comportamiento de la RI, el proceso inflamatorio y su impacto en la inducción y reversión de la MDR en células HepG2/PTX.

## 10 REFERENCIAS

- A Ho, E., y Piquette, M. (2006). Regulation of Multidrug Resistance by Pro-Inflammatory Cytokines. *Current Cancer Drug Targets*, 6. 295-311.
- Abbas, S., Dinmohammadic, F., Alizadehd, A., y Elahiana, F. (2019). Inflammatory pathway interactions and cancer multidrug resistance regulation. *Life Sciences*, 235. 116825
- Abdin S., *et al.* (2021). Nuclear factor- $\kappa$ B signaling inhibitors revert multidrug-resistance in breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 1(340).
- Alison R., *et al.* (2011). Chronic Inflammation and Hepatocellular Carcinoma. *Recent Results in Cancer Research* 185, DOI: 10.1007/978-3-642-03503-6\_8
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes, 2020
- Armengol C, *et al.* (2017). Carcinoma hepatocelular: presente y futuro. *Med Clin (Barc)*.
- Astudillo, H., *et al.* (2010). El papel de la quimioresistencia en los tumores sólidos. *GAMO*, 9:3. 117-126.
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity Through Induction of I $\kappa$ B Synthesis. *Science* 270: 286–290.
- Avgerinos, K. I., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2018). Obesity and Cancer Risk Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*.
- Aykul S, Martinez-Hackert E. Determinación de la mitad de la concentración inhibitoria máxima mediante análisis de interacción de proteínas basado en biosensores. *Bioquímica anal.* 2016 1 de septiembre; 508: 97-103
- Baker R., (2011). NF- $\kappa$ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*, 13(1):11-22.
- Baylin, S. Y Jones, P. (2016). Determinantes epigenéticos del cáncer. *Cold Spring Harbor. Perspectivas en biología.* 8. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505

- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tjahjadi, Al., y Ruslami, R. (2020). Diabetes tipo 2 y su impacto en el sistema inmunológico. *Revisiones actuales de diabetes*. 16 (5). Pp: 442–449.
- Berguetti, T.; (2019). TNF- $\alpha$  Modulates P-Glycoprotein Expression and Contributes to Cellular Proliferation via Extracellular Vesicles. *Cells*,
- Boursi, B., (2017). Impact of metformin on the progression of MGUS to multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, 58. Pp: 1265–1267.
- Byrd-Leifer C., *et al.* (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of taxol. *Eur J Immunol*, 31. Pp: 2448–2457.
- Cayman. Información del producto. 2NBD-Glucosa. Consultado: 050622. Disponible en línea: <https://fnkprddata.blob.core.windows.net/domestic/data/datasheet/CAY/11046.pdf>
- Cedillo, L., *et al.* (2015). ¿Qué es y cómo funciona el sistema inmunológico? *Ciencia*. 18-25. Recuperado de: [https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66\\_2/PDF/Sistema\\_Immune.pdf](https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/66_2/PDF/Sistema_Immune.pdf)
- Chai, X., *et al.* (2015). Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133+ Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling. *Sci Rep*, 5. 14404
- Chang, Y., *et al.* (2018). Tenulin and isotenulin inhibit P-glycoprotein function and overcome multidrug resistance in cancer cells. *Phytomedicine*.
- Chen, H., Zhou, X.-H., Li, J.-R., Zheng, T.-H., Yao, F.-B., Gao, B., & Xue, T.-C. (2021). Neutrophils Driving inflammation during the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 522, 22–31.
- Chen, K., Li, Y., Guo, Z., Zeng, Y., Zhang, W., Wang, H. (2020). Metformina: aplicaciones clínicas actuales en pacientes no diabéticos con cáncer. *Aging*. 12:4. Pp: 3993-4009.
- Cheng H., *et al.* (2019). Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*, 20(20).

- Chi T., *et al.* (2021). PPAR- $\gamma$  Modulators as Current and Potential Cancer Treatments. *Front Oncol*, 11. 737-776.
- Chu Z., *et al.* (1999) IKK $\gamma$  mediates the interaction of cellular I $\kappa$ B kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem* 274: 15297–15300.
- Cunha, A., *et al.* (2021). Reposicionamiento de la metformina para el tratamiento del cáncer gastrointestinal. *World J Gastroenterol*. 27:17. Pp:1883-1904.
- Dana N., *et al.* (2019). PPAR  $\gamma$  agonist, pioglitazone, suppresses melanoma cancer in mice by inhibiting TLR4 signaling. *J Pharm Pharm Sci*, 22(1). Pp:418-423.
- De Fronzo R., y Ferrannini E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 14:173–194.
- Wang Y., *et al.* (2014). Diabetes mellitus and poorer prognosis in hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 9:5.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388: 548–554.
- Donadon V, Balbi M, Perciaccante A, Casarin P and Zanette G. (2009). Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2:25–33.
- Dongiovanni, P., Romeo, S., Valenti, L. (2014). Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: Role of environmental and genetic factors. *World J Gastroenterol*, 20:36. 12945-12955
- Farrell G. (2014). Insulin resistance, obesity, and liver cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 12:117–119
- Fasih. H, *et al.* (2014). Radiosensitization of pancreatic cancer cells by metformin through the AMPK pathway. *Radiat Res*. 182(1). Pp: 50-9.

- Federación Internacional de Diabetes (FID). Atlas de diabetes de la FID, 10ª ed. Bruselas, Bélgica. 2021.
- Feng YH, Lin CY, Huang WT, Wu CL, Fang JL and Tsao CJ. (2011). Diabetes mellitus impairs the response to intra-arterial chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 28:1080–1088.
- Feng YH, Lin CY, Huang WT, Wu CL, Fang JL, Tsao CJ. Diabetes mellitus impairs the response to intra-arterial chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 28(4). Pp:1080-8.
- Fernandez, C., Buyse, M., German, M., Gimenez, F. (2004). Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 7:3. Pp: 359-371.
- Forbes. *Cáncer y tumores alcanzan costo promedio de atención por 2.6 mdp: AMIS.* (3 de febrero del 2021). Consultado el 050522. Recuperado de: <https://www.forbes.com.mx/noticias-cancer-y-tumores-cost-promedio-de-atencion-por-2-6-mdp-amis/>
- Friesen M., *et al.* (2022). Desarrollo de un modelo fisiológico de resistencia a la insulina en adipocitos derivados de células madre humanas. Consultada 050522. Disponible en <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.22.481495v1>
- G. del Mora, R., Olmo, A., Aguilar, M., O'Valle, F. (1998). P Glycoprotein: A New Mechanism to Control Drug-Induced Nephrotoxicity. *Exp Nephrol*, 6. Pp: 89–97
- Gaikwad, S., y Ray, P. (2012). Imágenes no invasivas de la señalización de PI3K/Akt/mTOR en cáncer. *Revista americana de medicina nuclear e imagen molecular.* 2:4. Pp: 418-431.
- Garima Mathur, G., Nain, S., y Kumar, P. (2015). Cancer: An Overview. *Academic Journal of Cancer Research* 8:1, 1-9.
- González N., Valadez I., Morales A., y Ruvalcaba N. (2016). Sub-diagnóstico de diabetes y prediabetes en población rural. *Revista de Salud Pública y Nutrición*, 15:4. 9-13.

- Gumieniczek A., *et al.* (2003). Effect of the new thiazolidinedione-pioglitazone on the development of oxidative stress in liver and kidney of diabetic rabbits. *Life Sci* 74. Pp: 553–562.
- Hanna, R., Zhou, C., Malloy, K., Gehrig, P. y Bae-Jump V. (2012). La metformina potencia los efectos del paclitaxel en las células de cáncer de endometrio mediante la inhibición de la proliferación celular y la modulación de la vía mTOR. *Gynecol Oncolo.* 125(2): 458–469
- Hernandez, I., y Luján, M. (2021). Aspectos relevantes de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Hepatología*, 2. 310-324. <https://doi.org/10.52784/27112330.137>.
- Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE and Hafkemeyer P. (2002). Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology.* 36:874–884.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Comunicación social características de las defunciones registradas en México durante enero a agosto de 2020. Comunicado de prensa núm. 61/21. 27 de enero de 2021 Disponible en:  
[https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020\\_Pnles.pdf](https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020_Pnles.pdf)
- Instituto Nacional de Cancerología (INCan). ¿Qué es el cáncer? (13 de junio del 2019). Consultado el 03/01/2022. Disponible en:  
<https://www.infocancer.org.mx/?c=conocer-el-cancer&a=que-es>
- Instituto de Investigación de, Cáncer (CRI). Ministerio de Salud de la India. Cáncer. Consultada: 02/09/22. Disponible en línea:  
<https://tmc.gov.in/tmh/pdf/book.pdf>
- Israel A (2010) The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000158.
- Jia, L., *et al.* (2014). Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun* 5.
- Karin M (1999) How NF-kappa B is activated: the role of the Ikappa B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867–6874.

- Katzung, B., y Trevor, A. (2019). *Farmacología básica y clínica* (14<sup>a</sup>. ed). México: McGraw-Hill.
- Kim J., *et al.* (2017). Insulin resistance and the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 32:5. Pp: 100-1106.
- Kourelis TV and Siegel RD: Metformin and cancer: New applications for an old drug. *Med Oncol*. 29:1314–1327. 2012.
- La carga mundial del cáncer. ¿Por qué están aumentando las tasas mundiales de cáncer?, Asociación Americana de cáncer. Consultado el 01/12/24. Disponible en línea: <https://www.cancer.org/about-us/our-global-health-work/global-cancer-burden.html#:~:text=Cancer%20is%20the%20second%20leading,%2Dmiddle%2Dincome%20countries1>.
- Labbozzetta M., *et al.* (2020). Can NF-κB Be Considered a Valid Drug Target in Neoplastic Diseases? Our Point of View. *Int J Mol Sci*, 21(9):3070.
- Lengyel, E., *et al.* (2015). La metformina inhibe el crecimiento del cáncer de ovario y aumenta la sensibilidad al paclitaxel en modelos de ratón. *Revista americana de obstetricia y ginecología*. 212:479. Pp: 1-10.
- León, J., *et al.* (2015). Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*, 83(6). 543-551.
- Levy, J. R., & Belsky, M. (1990). Down-Regulated Insulin Receptors in HepG2 Cells Have an Altered Intracellular Itinerary. *The American Journal of the Medical Sciences*, 299(5), 302–308. doi:10.1097/00000441-199005000-0000
- Li W., *et al.* (2019). Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *J Exp Clin Cancer Res*. 38(1). Pp: 327.
- Li Y, *et al.* (2014). Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *J Pain*, 15(7). Pp:712-725
- Li, X., Mu, P., Qiao, H., Wen, J., Deng, Y. (2018). JNK-AKT-NF-κB controls P-glycoprotein expression to attenuate the cytotoxicity of Deoxynivalenol in

mammalian cells. Biochemical Pharmacology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.020>

- Liu J.F., Ma Y., Wang Y., Du Z.Y., Shen J.K., Peng H.L. Reduction of lipid accumulation in HepG2 cells by luteolin is associated with activation of AMPK and mitigation of oxidative stress. *Phytother Res.* 2011;25(4):588-96. DOI: 10.1002/ptr.3305
- Liu X, Li L, Li J, Cheng Y, Chen J, Shen M, Zhang S and Wei H: Insulin resistance contributes to multidrug resistance in HepG2 cells via activation of the PERK signaling pathway and upregulation of Bcl-2 and P-gp. *Oncol Rep* 35: 3018-3024, 2016.
- Liu, C., *et al.* (2020). Pioglitazone and PPAR- $\gamma$  modulating treatment in hypertensive and type 2 diabetic patients after ischemic stroke: a national cohort study. *Cardiovasc Diabetol*, 19(2).
- Liu, R, *et al.*, (2020). La via PI3K/AKT como un enlace clave que modula la resistencia a múltiples fármacos de cánceres. *Cell Death and Disease*, 11:797.
- Liu, T., *et al.* (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2.
- Liu, X., *et al.* (2016). Insulin resistance contributes to multidrug resistance in HepG2 cells via activation of the PERK signaling pathway and upregulation of Bcl-2 and P-gp. *Oncology reports*, 3:5. 3018-3024.
- Liu., *et al.* (2020). Paclitaxel Suppresses Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis Through Regulating Circ-BIRC6/miR-877-5p/YWHAZ Axis. *OncoTargets and Therapy*, 13
- Liuu, L., *et al.* (2008). Insulin therapy restores impaired function and expression of P-glycoprotein in blood–brain barrier of experimental diabetes. *Biochemical pharmacology*, 7 5. Pp:1649–1658.
- Llovet, J., *et al.* (2013). Brivanib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma Who Were Intolerant to Sorafenib or for Whom Sorafenib Failed: Results From the Randomized Phase III BRISK-PS Study. *Journal of Clinical Oncology*, 31:28. 3509–3516.

- Lomonte B. (2018) Nociones de Inmunología. Quinta edición. Instituto Clodomiro Picado. Facultad de microbiología. Universidad de Costa Rica.
- Loomba, R., Friedman, S. L., & Shulman, G. I. (2021). Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*, 184(10), 2537–2564.
- Marengo, A., Rosso, C., & Bugianesi, E. (2016). Liver Cancer Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis. *Annual Review of Medicine*, 67(1), 103–117
- Martínez J., *et al.* (2016). Carcinoma hepatocelular. *Medicine*, 12:12. 683-692.
- Martínez-Mier G, *et al.* (2020). Carcinoma hepatocelular en hígado no cirrótico: características clínicas y resultados en Veracruz, México. *Revista de Gastroenterología de México*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2019.11.007>
- Masafumi Ikeda, M., Morizane, C., Ueno, M., Okusaka, T., Ishii, H., y Furuse, J. (2018). Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *Jpn. J Clin Oncol*, 48:2. 103-114
- Mirzaei, S., *et al.* (2019). Inflammatory pathway interactions and cancer multidrug resistance regulation. *Life Sci*, 15:235.
- Mirzaei, S., *et al.* (2022). Advances in understanding the role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular pathways, therapeutic strategies, and prospects. *Drug Discovery Today*. 27:2. Pp: 436-449.
- Molly E. Band. (2020). Sugar Babies. *Diabetes in the Pediatric Population. Physician Assistant Clinics*, 5. 237–246.
- Mouri MI, Badireddy M. (2021). Hyperglycemia. Consultada el 14 de enero 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/>
- Nguyen, A., y Horuzsko, A. (2015). Kupffer Cell Metabolism and Function. *Journal of enzymology and metabolism*, 1:1.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. (2010). Secretaria de Salud. Recuperada de

[http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/marco\\_juridico/normas/nom\\_14.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/marco_juridico/normas/nom_14.pdf)

- Núñez, M., *et al.* (2022). Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer. *Cancers*, 14(2), 307.
- Observatorio Global del cáncer (GLOBOCAN). Cáncer hoy. Consultado el 030112022. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
- Oliveras-Ferraro C, Cufí S, Vazquez-Martin A, Menendez OJ, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Joven J and Menendez JA: Metformin rescues cell surface major histocompatibility complex class I (MHC-I) deficiency caused by oncogenic transformation. *Cell Cycle*. 11:865–870. 2012.
- Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Consultado el 030112022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853–6866.
- Petersen, M., y Shulman, G. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*, 98. 2133–2223
- Petersmann A., *et al.* (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 127 (Suppl 1). S1-S7
- Piątkowska I., *et al.* (2020). Pioglitazone as a modulator of the chemoresistance of renal cell adenocarcinoma to methotrexate. *Oncol*
- Pierre Koch, P., Gehringer, M., y Laufer, S. (2015). Inhibidores de c-Jun N-Terminal Kinases: una actualización. *Revista de Química Medicinal*, 58:1. 72-95
- Pollak, F. (2016). Resistencia a la insulina: verdades y controversias. *Revista Médica Clínica Las Condes*; 27(2) 171-178.
- Ponziani, F. *et al.* (2018). Hepatocellular carcinoma is associated with gut microbiota profile and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*.
- Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute; NCI). ¿Qué es el cáncer?." (05 de mayo del 2021). Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

- Rajput S, Volk L., Ran S. (2013). TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 12(8). Pp:1676-87.
- Reig, M., *et al.* (2021). Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Med Clin (Barc)*, 156:9. 463.e1–463.e30
- Reinehr, T. Inflammatory markers in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus. *Clinica Chimica.* (2019);496. Pp: 100-107.
- Reinehr, T., y Ludwig, C. Inflammation Markers in Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome in the Pediatric Population. *Current Diabetes Reports.* (2018). 18:131. Pp: 1-12.
- Remels A., *et al.* (2009). PPARgamma inhibits NF-kappaB-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(1). Pp: 174-83.
- Ringelhan, M., Pfister, D., O'Connor, T., Pikarsky, E., & Heikenwalder, M. (2018). The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nature Immunology*, 19(3), 222–232.
- Rocha-Garduño. Evaluación del efecto de lecitina de soya sobre la reversión de resistencia a insulina y modulación de lípidos intracelulares en células HepG2/RI resistentes a insulina. Tesis de Maestría, en preparación., 2022.
- Sánchez C. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Rev. Med. Clin. Condes*, 24:4. 553-562.
- Schlesinger, S., *et al.* (2013). Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort. *Ann Oncol*, 24. Pp: 2449-2455.
- Shen Z, Ye Y, Bin L, Yin M, Yang X, Jiang K and Wang S: Metabolic syndrome is an important factor for the evolution of prognosis of colorectal cancer: Survival, recurrence, and liver metastasis. *Am J Surg.* 200:59–63. 2010. View Article: Google Scholar : PubMed/NCBI
- Škubník, J.; Pavlíčková, V.; Ruml, T.; Rimpelová, S. (2021). Current Perspectives on Taxanes: Focus on Their Bioactivity, Delivery and

Combination Therapy. *Plants*, 10, 569.  
<https://doi.org/10.3390/plants10030569>

- Stefan, N., Häring, H.-U., & Cusi, K. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*
- Strelakova E., *et al.* (2017). Metformin sensitizes triple-negative breast cancer to proapoptotic TRAIL receptor agonists by suppressing XIAP expression. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Jun;163(3):435-447.
- Szajnik M., *et al.* (2009). TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 28(49). Pp:4353-63.
- Thermo scientific. (2010). Consultada: 05102022. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011717\\_Hoechst\\_33342\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf)
- Tossetta, G. (2022). La metformina mejora la sensibilidad del cáncer de ovario al paclitaxel y los medicamentos a base de platino: una revisión de los hallazgos in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12893.
- Tsugane S and Inoue M. (2010). Insulin resistance and cancer: Epidemiological evidence. *Cancer Sci.* 101:1073–1079.
- Valdés-Gómez W., Almirall-Sánchez A., y Gutiérrez-Pérez M. Factores de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en adolescentes. *Medisur [revista en Internet]*; 17(3). 2019. Pp: 356-364. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4155>
- Villalva-Pérez, JM, *et al.* (2020). Caracterización de células Huh7 tras la inducción de resistencia a la insulina y post-tratamiento con metformina. *Citotecnología.* 72:4. 499–511.
- Wang, Y., (2018). Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res*, 37(63).
- Wisnu, Y., y Aryandono, T. (2019). The Effect of P-Glycoprotein (P-gp), Nuclear Factor-Kappa B (Nf-kb), and Aldehyde Dehydrogenase-1 (ALDH-1)

Expression on Metastases, Recurrence and Survival in Advanced Breast Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20. Pp: 1511-1518.

- Yang H., *et al.* (2009). The PPARgamma agonist pioglitazone ameliorates aging-related progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 20(11). Pp:2380-2388.
- Yang L., *et al.* Regulation of AMPK-related glycolipid metabolism imbalances redox homeostasis and inhibits anchorage independent growth in human breast cancer cells. *Redox Biol*, 17. Pp: 180–91.
- Yu, Z. (2020). Metformina afecta la sensibilidad a paclitaxel de células de cáncer de ovario a través de la autofagia mediada por Long Noncoding RNASNHG7/miR-3127-5p Axis. *Bioterapia del cancer y radiofarmaceuticas*. 1-10.
- Zajnik M., *et al.* survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 28(49). Pp:4353-63.
- Zhang W., y Ling V. (2000). Cell-Cycle–Dependent Turnover of P-Glycoprotein in Multidrug-Resistant Cells. *Journal of cellular physiology* 184. pp17–26.
- Zhao, Y. (2019). La combinación de metformina y paclitaxel suprime la proliferación e induce apoptosis de células de cáncer de próstata humano vía estrés oxidativo y objetivo de la vía dependiente de mitocondria. 17. Pp: 4277-4284.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE FARMACIA**  
Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

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

**Nombre del alumno:** L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes

**Título de la tesis:** “Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF-κB en células HepG2 de carcinoma hepatocelular”

**Grado a obtener:**

**Maestría en Farmacia**

**Doctorado en Farmacia**

**Miembro del jurado:** Dra. Leticia González Maya

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):**

---

---

---

e-firma UAEM

**Firma Jurado**

05/mayo/2023

**Fecha**

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2º piso.  
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia [posgrado\\_ff@uaem.mx](mailto:posgrado_ff@uaem.mx)



*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023

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

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

#### Sello electrónico

**LETICIA GONZALEZ MAYA** | Fecha:2023-05-09 09:32:02 | Firmante

J5GuF6x3hXN+pXSgDpwe0nlY4nD6VR/qVuX1P9zjoX/Clo30cxtgxVBaXSeEY15AQ9GTC5ewDOfKLP/R/J4Qi6sjAXDfk4TG7yVOdiDjIWM/it6X6o0f4I/zJGaxg1z6ja3ILOJHzoIfCFUo7/us8OiAD9GM3CgznZ7ka2t0IESDzpZnjx9Uo8XlqTtUuQHzmCuHUrRhiGiUzLm1gZQ5G5/UNxYjalKIMM4xK2RpT4XxoNBPIQiapGj+5beb4vN1mG/DCWdbQnA9c3QHPR0eqRUjyxDqrS1pj3oMdU8ufFsHFpGQ90tvc5irBg+u+1egvxEfBYfhwTjNYo2gulRTDw==

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



yRz8ADxG2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8jEJW6Bp6zpnBvizwVRxRmxFAY0nbydw>



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

**Nombre del alumno:** L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes

**Título de la tesis:** “Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF-κB en células HepG2 de carcinoma hepatocelular”

**Grado a obtener:**

**Maestría en Farmacia**

**Doctorado en Farmacia**

**Miembro del jurado:** Dr. Cairo David Toledano Jaimes

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):**

---

---

---

e-firma UAEM

**Firma Jurado**

05/mayo/2023

Fecha



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

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

#### Sello electrónico

CAIRO DAVID TOLEDANO JAIMES | Fecha:2023-05-09 12:27:55 | Firmante  
V0T9TE4hM6LeC.JI9w1IKUvB9hFISHun6U6f7dsMo7emC6cUpe45GBqVBOvdXCzIPXGqrmtR12gS6IU9M4SDi2li1QOU66609PhT6ln+gFGoVlqj6SSA4EJWkDw144ojYC17za/XkK6oZC7WcgYuHIIQ9B18SKA+pMwqIXrQ1z4GhOoqCREc/8MsqJdduff7WeydInm8mggfObI4mREsolXy4WtG2R5+c0kDHX7/35vyD6E5Zn/QmIVaW/+yA5uK80bDSHvLGDJ0w0Ua/AMJe0IYc7IDqZxSu05Y+Z7oUJZARXhSwWmLuaSzBmg66hzIT0GWtAw6W0XeonGpAkRrA==

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



NA5f7UyOe

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/WLarh8MiAxKZqVj7pTCpQuLrGAoF3iw9>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



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

**Nombre del alumno:** L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes

**Título de la tesis:** “Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF- $\kappa$ B en células HepG2 de carcinoma hepatocelular”

**Grado a obtener:**

**Maestría en Farmacia**  
 **Doctorado en Farmacia**

**Miembro del jurado:** Dr. Julio César Almanza Pérez

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):**

---

---

---

e-firma UAEM

**Firma Jurado**

05/mayo/2023

Fecha



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

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

**Sello electrónico**

**JULIO CESAR ALMANZA PEREZ** | Fecha:2023-05-08 22:56:36 | Firmante  
Um3afdzxMiNS8zgeO7UNTNgaBmftdLCHVlzwfXNoWgCM1N5ou015/h616xK/XnHdd17fC9F8eZYInx273wNBGQFiXsjLL7utjPu30JrVMi/FYpxotN937hKbrStpv4yY1faVyKBfK3a0f  
fxl4i5lIX+yW7E6kCwlJmydrc7OuYyB9Pr+LIDak+NkdBH3eWrNhuZPNiUXggRK1PiraZX4aw0sOEDzsDAMuKWXvixPXuJMN7p6ny5XuJIS7vxtFjaXai/hg7/SSV/5btLypdZRYPTpl  
45xWFAMR/BKia7e8rOR6JrgfEHw/1mx9DPuTHt5PV48IU6MNI0b/SYOdcPQ==



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

[d5uVyPhTI](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VQmr22fls3pFlrhuFVOnOPtndtyahPrh>





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

**Nombre del alumno:** L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes

**Título de la tesis:** “Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF-κB en células HepG2 de carcinoma hepatocelular”

**Grado a obtener:**

**Maestría en Farmacia**

**Doctorado en Farmacia**

**Miembro del jurado:** Dr. Mauricio Castillo Salazar

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):**

---

---

---

e-firma UAEM

**Firma Jurado**

05/mayo/2023

**Fecha**

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

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

#### Sello electrónico

**MAURICIO CASTILLO SALAZAR** | Fecha:2023-05-09 13:56:41 | Firmante  
hem3YINjPGPSM/4AAMhpH8x/gSWUhYQdKaGaAqHVEQmVsAQiYR4bei9WHno/srbmfUJZ3wrHw2UHVvbmJx+jZT45AC3tYQkPOEN6k/WYJPWhumo7TZtC/h37WU7MS/o23  
ACwiHSQgk63+JtAxamSe5zBKcDWYcDfZO/zpRDK3HMc6zrFCrjBmOdr9iRn48nY9UXikMrTmmqHWTnwiXACrSMQOPbyg8+3zOkGdzm5FN8UM6sPhb7SiJ853Djma+YjxiTY  
YDHtkQO4qBZffU4JM3A/E7ONDxyEDtffMe4U5wJlyWJyqzetaxBMS40TmlqEpVX0dMN0a+dc1pHqfmhrQ==

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



[RzEvh4BUj](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b1QLCMQAeekh6sTMVW6YvOkJY6jEI3Ve>



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

**Nombre del alumno:** L.F Eduardo Antonio Sánchez Fuentes

**Título de la tesis:** “Análisis del impacto de la inducción de la resistencia a la insulina sobre el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y la modulación del NF-κB en células HepG2 de carcinoma hepatocelular”

**Grado a obtener:**

**Maestría en Farmacia**

**Doctorado en Farmacia**

**Miembro del jurado:** Dra. Jessica Nayelli 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):**

---

---

---

e-firma UAEM

**Firma Jurado**

05/mayo/2023

**Fecha**



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

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

**Sello electrónico**

**JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA** | Fecha:2023-05-08 19:31:01 | Firmante  
C4iL\_yvaeQo4W/PYbxKS//iDtDxPzD5AVQNIgJVDJMPiV3oAdQW/0ArB+O4jaZY1gVw6J88qxAKKMKgwP8ZjMib8KVNb2PFNfxX5MR2inVV52n+gM00A19AXWpWB2TNbL+qKbu7CS1yVebP1hMvCd+5opee0TNwvN6ewZ2Nt2ftrIUZ7YsNpul6ayyWkyczEtnsOZotZ7KiY3L4bvuoogSIJNzW7325xZQFMR9THzXedy9OjJo9UYAohLPgegDqsmgj8/icOWF2PqW2FTBKDHsN3FAB2RufDTeQ8HESzxcHfAG0IHg3aKm7uC4urbMzUAwgeJlkkKedEjX7mKbX2rA==

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



**CQrisGAYa**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3ITQmvIEZ0g5cPdbiBkUgmtBBR7dOPzc>



*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023