



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE STAT3 EN LA CITOPROTECCIÓN MEDIADA
POR ERITROPOYETINA EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL TRATADAS CON
CISPLATINO ”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BLANCO FLORES IRMA CAROLINA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE STAT3 EN LA CITOPROTECCIÓN MEDIADA
POR ERITROPOYETINA EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL TRATADAS CON
CISPLATINO ”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BLANCO FLORES IRMA CAROLINA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. MAYO, 2018.



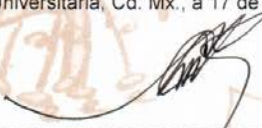
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de febrero del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **BLANCO FLORES IRMA CAROLINA** con número de cuenta **406037479** con la tesis titulada **"Estudio de la participación de STAT3 en la citoprotección mediada por Eritropoyetina en células de cáncer cervical tratadas con cisplatino"**, realizada bajo la dirección del **DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA**:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de abril del 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos Oficiales

A) Principalmente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme ingresar a un posgrado de calidad y así desarrollarme en el ámbito científico.

B) Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Biológicas (CVU- 631884, No. de apoyo – 393137).

El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnología (PAPIIT) (Clave IN204816).

C) Miembros del Comité Tutor

- a. A la **Dra. Leticia Rocha Zavaleta** mi tutor principal, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio.
- b. A la **Dra. Marcela Lizano Soberón** y a la **Dra. Isabel Soto Cruz** por su ayuda y guía para la realización de este trabajo.

Agradecimientos personales

Un agradecimiento especial a mi madre **Rosa María Flores Sánchez**, por todo tu apoyo incondicional durante este tiempo, aun durante los momentos difíciles que has atravesado siempre has mostrado una actitud optimista que me ha enseñado a ser fuerte y a nunca dejar de avanzar aun en la adversidad mas grande.

A la Dra. **Leticia Rocha Zavaleta** por haber depositado su confianza en mi al permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Gracias por sus consejos y su orientación en cada paso de este proyecto, por la manera de transmitir su conocimiento con pasión, gracias a esto logré superar muchos aspectos de mi y cambiar la manera en que observo y transmito las cosas.

A la Dra. **Marcela Lizano Soberón**, agradezco su guía y su apoyo durante este tiempo, sobre todo por sus observaciones, actitud positiva y motivadora ante mi trabajo.

A la Dra. **Isabel Soto Cruz**, por sus comentarios y observaciones acerca de como mejorar mi trabajo, agradezco su apoyo, su tiempo dedicado el cual me permitio mejorar la organización y estructura al plasmar mis ideas.

A la **M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías**, agradezco el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto.

Gracias por la ayuda que me brindaste desde el primer momento en el laboratorio, por tu tranquilidad al guiarme cuando erraba, tu actitud siempre positiva me ayudo a ver mis momentos malos como algo pasajero que había que superar.

Dedicatoria

A ti **A. Javier Hernández Juárez**, por que me has acompañado durante todo este trayecto, te has armado de valor y paciencia para ayudarme a enfrentar todos los obstáculos que he tenido, incluso aquellos que yo misma me he puesto. Me has ayudado a ampliar mi entendimiento y siempre me impulsaste para que alcanzara lo mejor que podía ser, tu manera de explicar y abordar cada tema me inyectaban de motivación para continuar en el camino. A ti, que has estado todos estos años a mi lado en los buenos y los malos momentos, nunca me has dejado caer. Gracias por todo esto y por ser parte fundamental de mi vida.

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
III.1 CÁNCER CERVICAL	3
III.2 TRATAMIENTO CONTRA CACU.....	3
III.3 CACU Y ANEMIA.....	4
III.4 ERITROPOYETINA Y CÁNCER	6
III.5 STAT3	8 ^o
III.6 SURVIVINA.....	11
III.6.1 Estructura y Función	11
III.7 INHIBIDORES DE LA VÍA JAK2/STAT3	13
III.7.1 Desarrollo clínico de inhibidores de STAT3	13
III.8 INHIBIDORES DE SURVIVINA Y SU POTENCIAL EN LA TERAPIA CONTRA CÁNCER	14
IV. ANTECEDENTES	16
V. HIPÓTESIS	17
VI. OBJETIVOS	17
VI.1 GENERAL.....	17
VI.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
VII.1 CULTIVO CELULAR	18
VII.2 DETERMINACIÓN DE LA IC50 DE CISPLATINO	18
VII.3 ENSAYO MTT	18
VII.4 ENSAYO DE PROTECCIÓN CON ERITROPOYETINA.....	19
VII.5 DETERMINACIÓN DE LA IC50 DE LOS INHIBIDORES S31-201 Y WP106.....	19
VII.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	19
VII.7 WESTERN BLOT	20
VII.8 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE STAT3 Y SURVIVINA.....	21
VII.8.1 Ensayo con el inhibidor de STAT3 WP1066.....	21
VII.8.2 Ensayo con el inhibidor de Survivina YM155	21
VII.8.3 Análisis estadístico.....	21
VIII. RESULTADOS	22
VIII.1 EFECTO PROTECTOR DE ERITROPOYETINA EN LA LÍNEA CELULAR SiHA SOBRE LA MUERTE INDUCIDA POR CISPLATINO. ...	22
VIII.2 WP1066 Y S31-201 SUPRIMEN LA FOSFORILACIÓN DE STAT 3.	24
VIII.3 WP1066 MUESTRA MAYOR POTENCIA EN LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE SURVIVINA Y NO ASÍ S31-201.	25
VIII.4 WP1066 INHIBE EL EFECTO CITOPROTECTOR DE EPO FRENTE A CISPLATINO EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL.	28
VIII.5 EL INHIBIDOR DE SURVIVINA YM155 SUPRIME EL EFECTO PROTECTOR DE EPO FRENTE A CISPLATINO EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICAL.	30
IX. DISCUSIÓN	32
X. CONCLUSIONES	39

XI. PERSPECTIVAS GENERALES	40
XII. REFERENCIAS.....	41
XIII. APÉNDICE.....	50

I. RESUMEN

El Cáncer cérvico uterino (CaCu) es la segunda neoplasia más común entre mujeres Mexicanas. La mayoría de mujeres con CaCu experimentan sintomatología clínica que incluye hemorragia vaginal, disminución de peso, síndrome urémico y anemia. En el caso de CaCu, la anemia se correlaciona con el estadio clínico; los pacientes con anemia con diagnóstico de CaCu tienen un peor pronóstico y el riesgo de presentar anemia en estos pacientes aumenta cuando se someten a quimioterapia, como el cisplatino, el cual es el quimiofármaco utilizado con intención curativa. La presencia de anemia derivada del tumor, así como, la terapia con cisplatino compromete el estado del paciente, por lo que es primordial restablecer los niveles de hemoglobina para que la quimioterapia continúe en pacientes con cánceres en estadios avanzados.

La eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) ha sido usada frecuentemente en pacientes con cáncer para la prevención o tratamiento de la anemia; sin embargo, se han documentado efectos negativos de rhEpo en comparación con el grupo control con respecto a la sobrevida libre de progresión tumoral en ensayos clínicos. Epo confiere a las células tumorales la capacidad de resistencia a la muerte mediada por cisplatino. Adicionalmente en estudios previos se encontró que Epo induce la activación de STAT3 e incrementa los niveles de survivina lo que sugiere que esta proteína es requerida para ejercer el efecto citoprotector de Epo contra cisplatino en CaCu. Por lo tanto, explorar el efecto de inhibidores tanto de STAT3 como de survivina es de gran importancia para desarrollar nuevos esquemas de tratamiento para resolver el problema que representa anemia-Epo-cáncer.

En este estudio demostramos el efecto de dos inhibidores WP1066 y YM155. WP1066 inhibe de manera directa la activación de STAT3; mientras que YM155 inhibe la expresión de survivina. Ambos, STAT3 y survivina están relacionados con el efecto citoprotector de Epo en CaCu. Nuestros resultados muestran que tanto WP1066 como YM155 inhiben el efecto protector mediado por Epo contra cisplatino. Ambos inhibidores muestran ser candidatos para una terapia concomitante en el tratamiento de anemia y quimioterapia en pacientes con CaCu.

II. ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer in Mexican women. Most women with cervical cancer have clinical symptoms including vaginal bleeding, weight loss, anemia and uremic syndrome. Anemia and cervical cancer correlates with the clinical stage. Patients with cervical cancer that present anemia have a worse prognosis. The risk of inducing anemia in patients with cervical cancer increases when they undergo chemotherapy, such as cisplatin. The presence of anemia derived from the tumor, as well as cisplatin therapy, compromises the patient condition, so it is essential to restore hemoglobin levels so that chemotherapy continues in patients with cancers in advanced stages.

Recombinant human erythropoietin (rhEpo) has been used frequently in cancer patients for the prevention or treatment of anemia, however clinical trials have showed negative effects of rhEpo compared to the control group with respect to progression free survival. rhEpo confers to the tumor cells the capacity of resistance to cell death mediated by cisplatin. Additionally, it was found that rhEpo induces the activation of STAT3 and increases the levels of survivin, which suggests it is required to exert the cytoprotective effect of Epo against cisplatin in cervical cancer. Therefore, analyzing the effect of inhibitors of both STAT3 and survivin is taking importance to develop new treatment schemes against the problem rhEpo/cisplatin.

In this study we evaluated the effect of two inhibitors WP1066 and YM155. WP1066 directly inhibits the activation of STAT3; while YM155 inhibits the expression of survivin. Both STAT3 and survivin are related to the cytoprotective effect of Epo in cervical cancer. Our results showed that both WP1066 and YM155 inhibit the protective effect mediated by EPO against cisplatin. Both inhibitors showed to be candidates for a concomitant therapy in the treatment of anemia and chemotherapy in patients with cervical cancer and open the possibility to test this inhibitor for clinical trials.

III. INTRODUCCIÓN

III.1 Cáncer cervical

El Cáncer cérvico uterino (CaCu) es la tercera neoplasia más común entre mujeres, con un estimado de 528,000 nuevos casos y 266,000 muertes a nivel mundial en 2012 (Ferlay et al., 2014). Así nueve de cada diez muertes en mujeres (87%) ocurre en países en vías de desarrollo.

Se ha identificado que la infección persistente con tipos de VPH de alto riesgo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CaCu y de sus lesiones precursoras, lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, por sus siglas en inglés) (Ferlay et al., 2014). Las SIL se presentan antes del desarrollo del cáncer cervical y se clasifican en dos grupos: de alto y bajo grado (HSIL y LSIL respectivamente por sus siglas en inglés) (Muñoz et al., 2003; Walboomers et al., 1999) (Solomon et al., 2002).

Las lesiones preinvasivas son asintomáticas, aunque otras condiciones coexistentes pueden producir síntomas incidentales (Schaffer et al., 2007). Durante la fase preinvasiva, la maduración normal de las células epiteliales se interrumpe, dando lugar a lesiones displásicas (Souhami et al., 2005). La mayoría de las lesiones displásicas de bajo grado revertirán sin intervención, mientras que otros pueden llegar a ser de alto grado expandiéndose para cubrir espesor del epitelio cervical. Posteriormente, las lesiones displásicas de alto grado, pueden progresar a estadios más avanzados. Una vez desarrollo carcinoma *in situ*, se procede a clasificar el estadio en que se encuentra el carcinoma cervical para su tratamiento.

III.2 Tratamiento contra CaCu

Los estadios para el carcinoma cervical son cuatro y son clasificados de acuerdo con la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)(Ferenczy & Franco, 2002). En el estadio 1, el carcinoma no ha invadido tejido adyacente u otros

órganos y solo se encuentra solo en el cuello del útero y se divide en 1A y 1B. Por lo general el estadio 1A no suele ser tratado con cirugía o quimioterapia ya que el tumor es menor a 7mm (Martin-Hirsch & Wood, 2011). En el estadio 1B, se divide en IB1, que es un tumor menor a 4 cm, y IB2 donde se presenta un tumor mayor a 4 cm. El tratamiento dependiendo del tamaño del tumor es remoción quirúrgica (estadio 1B1) o quimioradioterapia para el estadio 1B2, por lo general el fármaco de elección para el ultimo estadio es el cisplatino (DeVita, Lawrence, & Rosenberg, n.d.),

III.3 CaCu y anemia

La mayoría de mujeres con CaCu experimentan sintomatología clínica que incluye hemorragia vaginal, disminución de peso, síndrome urémico y anemia (“NHS Cervical Screening Programme Colposcopy and Programme Management Public Health England leads the NHS Screening Programmes,” 2016).

La anemia es una complicación frecuente de las enfermedades por tumores malignos, así como también, la terapia contra éstas, la anemia es clasificada como niveles de hemoglobina por debajo de 12g/dL para mujeres. En el caso de CaCu, la anemia se correlaciona con el estadio clínico y varía principalmente del 25% en el estadio I al 33% en el estadio II y puede aproximarse al 40% en el estadio III (Gupta et al., 2009). Debido a estos hechos, la anemia se considera un factor de pronóstico para la sobrevivencia de la paciente con cáncer cervical después del estadio clínico y del tamaño tumoral. En comparación con las pacientes con niveles normales de hemoglobina, las pacientes con anemia con diagnóstico de CaCu tienen un peor pronóstico, el riesgo de presentar anemia en pacientes con CaCu aumenta cuando se someten a quimioterapia, como el cisplatino, el cual es el quimiofármaco utilizado con intención curativa.

El cisplatino es un fármaco antitumoral de origen metálico que puede causar entrecruzamiento e intercruzamiento de bases de purina bloqueando la transcripción y replicación del ADN e impidiendo la reparación por la célula, por lo tanto, es ampliamente utilizado para tratar tumores sólidos.

A través de su interacción directa con diversas moléculas incluyendo: proteínas, ADN y lípidos, el cisplatino afecta diversos organelos y estructuras subcelulares interrumpiendo funciones críticas y consecuentemente activando señales apoptóticas.

El cisplatino tiene efectos adversos sobre el sistema renal causando disfunción tubular renal temprana progresiva, y posterior desconexión glomerular. La administración crónica de cisplatino en pacientes con cáncer causa anemia progresiva a niveles moderados y un estado de azotemia (concentración alta de nitrógeno en sangre) que causa la toxicidad de células blancas.

La presencia de anemia derivada del tumor, así como, la terapia con cisplatino compromete el estado del paciente, por lo que es primordial restablecer los niveles de hemoglobina para que la quimioterapia continúe en pacientes con cánceres en estadios avanzados.

La eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) ha sido usada frecuentemente en pacientes con cáncer para la prevención o tratamiento de la anemia; sin embargo, ensayos clínicos han documentado efectos negativos de rhEpo en comparación con el grupo control con respecto a la supervivencia libre de progresión tumoral (Hardee, Arcasoy, Blackwell, Kirkpatrick, & Dewhirst, 2006).

La eritropoyetina (Epo) parecía tener solo una función biológica, la estimulación del crecimiento de células sanguíneas, ahora sabemos que Epo es un factor de crecimiento pleiotrópico con acción en numerosas células y tejidos, incluyendo células malignas debido a que la expresión del receptor de Epo (rEpo) puede ejercer efectos directos en células cancerosas como estimulación de la proliferación, inhibición de la apoptosis, y modulación de la sensibilidad a quimioterapia o radiación (Leo et al., 2006).

III.4 Eritropoyetina y cáncer

La eritropoyetina (Epo) es una glicoproteína que consta de 193 aminoácidos y su gen se encuentra localizado en el cromosoma 7, la expresión de este gen se encuentra regulada por niveles de oxígeno durante la hipoxia. En el adulto esta proteína es producida principalmente por la corteza renal mientras que durante el desarrollo embrionario el hígado es el principal productor de Epo (Debeljak, Solár, & Sytkowski, 2014a).

Epo es secretada al torrente sanguíneo, circula hacia la médula ósea y se une a los receptores de Epo situados sobre la superficie celular de los progenitores eritroides promoviendo su sobrevivencia, proliferación y diferenciación (Debeljak et al., 2014a; Hedley et al., 2011).

La molécula madura de rEpo consiste de una región citoplasmática y una región extracelular transmembranal; Epo induce cambios conformacionales en el dominio extracelular del receptor que subsecuentemente permite la activación de la cinasa Janus 2 (JAK2, por sus siglas en inglés) asociada en la parte citoplasmática del receptor. JAK2 es activada por autofosforilación y a su vez tiene la capacidad de fosforilar ocho residuos de tirosina en la parte distal de la región citoplasmática del rEpo (Debeljak et al., 2014a; Jelkmann et al., 2008).

Las ocho tirosinas fosforiladas en el rEpo sirven como sitios de acoplamiento para varias proteínas intracelulares, las cuales subsecuentemente activan tres principales vías de señalización de Epo: La vía de JAK2/STAT3 (o STAT5), la vía de las MAP Cinasas y la vía de PI3K/AKT (Figura1); los genes cuya transcripción y traducción son estimulados por estas vías inducen diversos efectos biológicos como: proliferación, regulación de la apoptosis y resistencia a fármacos (Debeljak et al., 2014a; MULCAHY, 2001; Sinclair & Elliott, 2012).

La mayoría de los rEpo se encuentran localizados en la superficie de los progenitores eritroides. Sin embargo, la interacción Epo-rEpo ha sido identificada en diferentes tipos de células no hematopoyéticas y tejidos del sistema nervioso central, corazón, riñón, gastrointestinal, tracto reproductivo, endotelio y otros, en

estos tejidos Epo ha mostrado funciones protectoras en una manera anti-apoptótica o mitogénica (Debeljak, Solár, & Sytkowski, 2014b; Jelkmann et al., 2008).

Debido a que rEpo se encuentra presente en distintas células cancerosas, la administración de eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) en pacientes con cáncer puede presentar efectos adversos debido a la potencial activación de vías de señalización de Epo-rEpo que resultaría en protección tumoral (acción antiapoptotica) o proliferación (Debeljak, Solár, & Sytkowski, 2014b; Jelkmann et al., 2008).

A diferencia de las células hematopoyéticas en donde la señalización de Epo esta asociada con incremento en la proliferación y/o supervivencia celular, en células tumorales, Epo puede no inducir un incremento en la proliferación pero si incrementa la resistencia de las células cancerosas a distintas terapias (Debeljak et al., 2014a).

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que líneas celulares de cáncer cervical producen y secretan Epo y además, expresan el receptor funcional de Epo. Así como la estimulación del rEpo por Epo exógena indujo la activación de miembros de la vía JAK/STAT tales como: JAK2, STAT5 y STAT3 que ha sido asociado como un factor de mal pronóstico en cáncer cervical, los resultados mostraron un sistema endógeno rEpo/Epo en cáncer cervical capaz de activar señales de proliferación y supervivencia celular (Lopez et al., 2011).

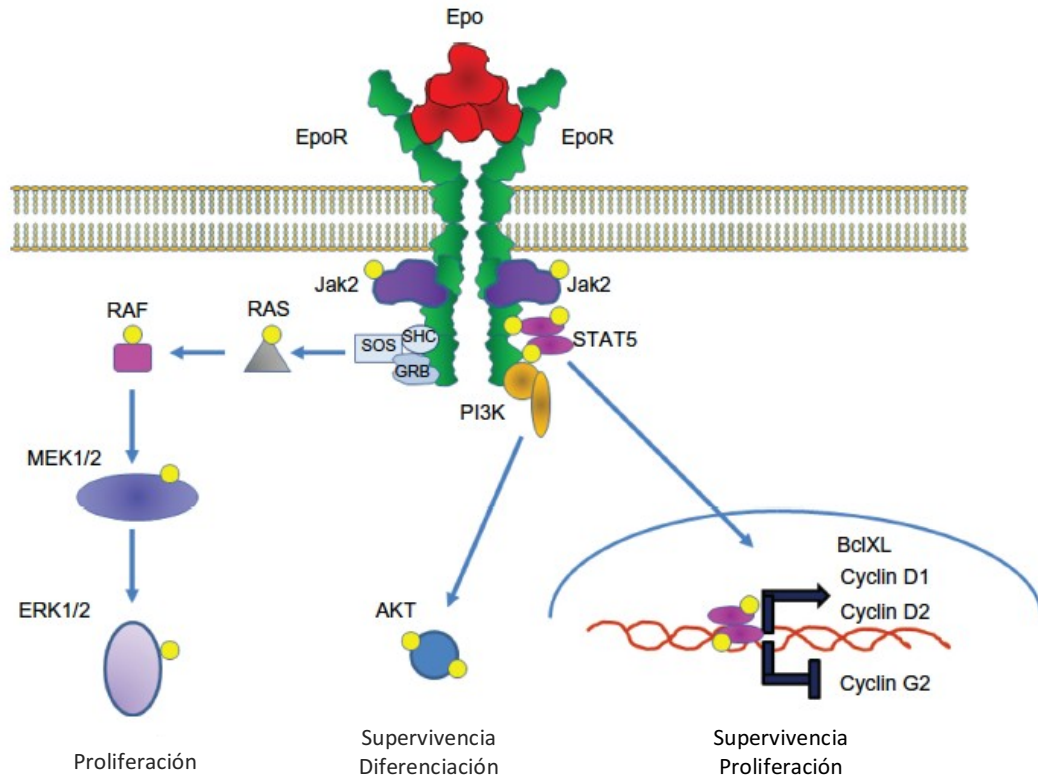


Figura 1. Activación y señalización del receptor de eritropoyetina. En el diagrama se muestran las principales cascadas de señalización y los efectos observados cuando una molécula de eritropoyetina se une a su receptor. Tomado y modificado de *The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells*. 2012.

III.5 STAT3

El transductor de señales y factor de transcripción-3 (STAT3, por sus siglas en inglés) actúa como mensajero y factor de transcripción que se une al DNA, pertenece a la familia de los factores de transcripción STAT que consiste de siete miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) (Carpenter & Lo, 2014).

De los siete miembros de esta familia de proteínas, STAT3 y STAT5 han demostrado ser los más importantes para la progresión del cáncer, no solo son cruciales para la transducción de señales de numerosos receptores que son

frecuentemente activados en células tumorales, también son factores de transcripción que regulan la expresión de un gran número de genes.

Aunque STAT3 y STAT5 contribuyen a la proliferación de las células tumorales y supervivencia, STAT3 ha resultado un blanco atractivo para el desarrollo de terapias ya que se encuentra constitutivamente activo en la mayoría de los tumores y ejerce una función crucial en células del microambiente del tumor lo que promueve la progresión tumoral (Yu, Lee, Herrmann, Buettner, & Jove, 2014).

Cuando Epo se une a su receptor se producen cambios conformacionales que permiten la activación de dos proteínas JAK2 que se encuentran en el dominio citoplasmático del rEpo, JAK2 se autofosforila y a su vez fosforila residuos de tirosina cinasa del rEpo. La fosforilación específica de los residuos de tirosina del receptor de Epo crean sitios de unión para reclutar a STAT3 mediante su dominio SH-2, la unión de STAT3 a estos sitios induce la fosforilación de la tirosina 705 (Tyr705) en su dominio c-terminal activándose (Figura 2).

La fosforilación de la Tyr705 en los monómeros de STAT3 provoca la dimerización de éstos por la interacción de la Tyr705 fosforilada de un monómero y el dominio SH-2 del otro; este dímero se disocia del receptor para translocarse al núcleo con ayuda de la importina α 5/NPI-1. En el núcleo, STAT3 induce la transcripción de genes involucrados en la supervivencia celular, proliferación, anti-apoptóticos y de respuesta inmune (Siveen et al., 2014; Yue & Turkson, 2009).

La fosforilación de la serina 727 (Ser727) de STAT3 en su dominio c-terminal, la cual puede ser llevada a cabo por numerosas citocinas, permite la máxima activación de la transcripción de los genes antes mencionados.

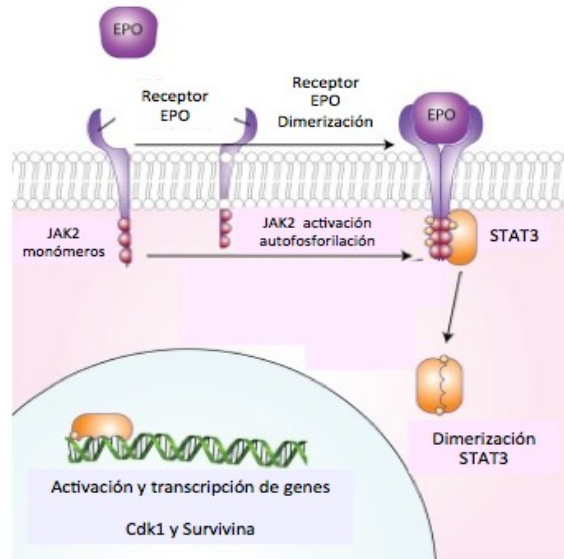


Figura 2. Activación de JAK2/STAT3 por estímulo del receptor de Eritropoyetina.

Al unirse Eritropoyetina a su receptor se induce su dimerización y la activación citoplasmática de JAK2 mediante autofosforilación induciendo la fosforilación de STAT3 en su tirosina 705 para permitir la formación del dímero de STAT3 Y su translocación al núcleo para participar en la transcripción de diversos genes. Tomado y modificado de *Stimulating erythropoiesis in neonates*, 2013.

En células normales la activación de STAT3 está estrictamente controlada para prevenir la desregulación de los genes, bajo condiciones fisiológicas su fosforilación ocurre entre los 15 y 60 minutos de exposición del ligando al receptor e incluso en presencia continua del ligando o citocina la activación de STAT3 disminuye en unas horas (Johnston & Grandis, 2011; Siveen et al., 2014).

Numerosos estudios han demostrado la activación constitutiva de STAT3 en una gran variedad de tumores humanos, incluyendo malignidades hematológicas (Leucemia, linfoma, mieloma múltiple), así como diversos tumores y líneas celulares (Glioma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, mama, ovario, endometrial, cervical, colon, páncreas, pulmón, cerebro, renal, y próstata), la señalización aberrante de STAT3 promueve el inicio y progresión de cáncer ya sea inhibiendo la apoptosis, induciendo la proliferación celular, angiogénesis, invasión y metastasis (Siveen et al., 2014).

Este incremento en los niveles de fosforilación de STAT3 es debido al exceso de citocinas, factores de crecimiento, entre otros, dentro del microambiente tumoral que activa STAT3 de manera paracrina. Al encontrarse activado STAT3 promueve proliferación mediante la transcripción de genes de importancia biológica en cáncer tales como: cdc2 (cell division cycle protein, también conocida como cinasa 1 dependiente de ciclina, Cdk1) que se encuentra involucrada en la regulación del ciclo celular (Siveen et al., 2014).

STAT3 también contribuye al proceso tumorigénico, principalmente por el aumento de señales para la supervivencia. Diversas proteínas anti-apoptóticas, tales como survivina, cruciales para la supervivencia del tumor son blancos directos de STAT3; su expresión se ve afectada como consecuencia de la inhibición de STAT3 (Siveen et al., 2014).

La activación constitutiva de STAT3 se ha detectado frecuentemente en diversos tipos de cánceres humanos entre ellos cáncer cervical (C.-L. Chen et al., 2007). Además, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la activación de STAT3 por EPO induce la expresión de survivina y sugiere que esta proteína es requerida para ejercer el efecto citoprotector de EPO contra cisplatino en CaCu (Córtes-Ballinas, 2016).

III.6 Survivina

III.6.1 Estructura y Función

Survivina es el miembro mas pequeño de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) con 142 aminoácidos y una masa molecular de 16.5kDa, la cual tiene un papel central en la regulación del ciclo celular e inhibición de la apoptosis mediante bloqueo de la activación de caspasas (Figura 3). Survivina ejerce una función importante en la regulación de la mitosis, es expresada de manera dependiente del ciclo celular y se encuentra mayormente en la fase G2-M, durante la mitosis survivina interactúa con los microtúbulos para regular la formación de estos

durante la división celular alterando su dinámica y la nucleación. Adicionalmente, survivina es un componente crítico del complejo cromosomal pasajero (CPC) debido a su asociación con proteínas internas del centrómero como Aurora B, INCENP (Inner Centromere Protein) y Borealina, survivina es requerida para dirigir el CPC al centromero, formar correctamente el huso bipolar y completar la citocinesis (X. Chen, Duan, Zhang, & Zhang, 2016; Khan, Khan, Yadav, Prasad, & Bisen, 2017; Peery, Liu, & Zhang, 2017; Pennati, Folini, & Zaffaroni, 2008).

La sobreexpresión de survivina inhibe la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis, aunque los mecanismos de inhibición de survivina son aun controversiales la unión directa e indirecta de survivina a los iniciadores o caspasas efectoras contribuyen a esta inhibición. La unión directa a caspasas 3, 7 y 9 ha sido propuesta así como la formación de un complejo entre survivina y la proteína X-IAP para la inhibición de caspasa 9; survivina inhibe la vía intrínseca de la apoptosis mediante unión a la proteína pro-apoptótica SMAC/DIABLO, esta proteína es liberada de la mitocondria durante la vía intrínseca y activa a caspasa 9 para inducir apoptosis. Survivina se une a SMAC/DIABLO y previene la activación de la caspasa 9 (Garg, Suri, Gupta, Talwar, & Dubey, 2016).

Survivina se encuentra presente en el citoplasma, mitocondria y núcleo y ejerce sus funciones dependiendo el compartimento donde se encuentre; su localización subcelular y propiedades funcionales son reguladas por su estructura y las modificaciones secundarias de la proteína, survivina es fosforilada en la treonina 117 por la cinasa Aurora B, esto dirige a survivina al centrómero y regula el ensamble del CPC. Su acumulación nuclear depende de la acetilación en lisina 129 por CREB - CBP (cyclic adenosine monophosphate response element- binding - protein) (Groner & Weiss, 2014).

Las modificaciones postraduccionales de survivina afectan sus niveles, la fosforilación en Thr34 por la proteína cdc2 puede promover su estabilidad en la metafase e importante en su función antiapoptótica (Groner & Weiss, 2014).

Estudios han mostrado una sobreexpresión de survivina en el 90% de líneas celulares de cáncer endometrial, así como en tumores del cuerpo uterino recurrentes comparados con tumores primarios; en cuanto a cáncer cérvico uterino se encontraron una mayor expresión en casos de adenocarcinoma, que generalmente es de peor pronóstico, esta sobreexpresión también se relaciona con la progresión de CIN (Cervical Intraepitelial Neoplasia) a carcinoma, además en la neoplasia intraepitelial cervical y carcinoma cervical escamoso la expresión de survivina se ha asociado con el tamaño del tumor y etapa clínica (Braný, Dvorská, Slávik, Školka, & Adamkov, 2017).

Survivina es una molécula importante en el campo de la investigación y en la terapia ya que se encuentra constitutivamente expresada en la mayoría de tipos de cáncer mientras que es indetectable en la mayoría de los tejidos humanos normales. Aunque survivina tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario, la expresión de survivina se encuentra en muy bajo nivel o en forma transitoria altamente controlada (Li, 2013).

La expresión aberrante de survivina ha sido asociada con la proliferación tumoral, progresión, angiogénesis, resistencia terapéutica y mal pronóstico (X. Chen et al., 2016).

III.7 Inhibidores de la vía JAK2/STAT3

III.7.1 Desarrollo clínico de inhibidores de STAT3

STAT3 es de importancia biológica en la inducción, en el inicio y progresión tumoral, y debido a que su inhibición suprime el crecimiento tumoral y aumenta la sensibilidad frente a agentes anti cancerígenos en una variedad de tumores se han desarrollado diversas moléculas dirigidas contra STAT3 como una prometedora terapia contra el cáncer. Diferentes acercamientos han sido explorados para inhibir de manera directa la vía de señalización de STAT3, inhibiendo su proteína o indirectamente a través del bloqueo de componentes río arriba de su vía de señalización.

Desafortunadamente solo unos cuantos compuestos han demostrado eficacia *in vivo* en modelos de xenotransplante y un menor numero de estos han logrado llegar a estudios clínicos (Santoni et al., 2015).

S31-201 es un inhibidor químico que bloquea la actividad de STAT3 al impedir la formación del dímero bloqueando el dominio SH-2 e impidiendo la unión de STAT3 al DNA y su actividad transcripcional, además induce inhibición del crecimiento y apoptosis por la inhibición de la activación constitutiva de STAT3, el tratamiento con S31-201 promueve la regresión en tumores de mama en modelos de xenotransplante (Zhao, Jiang, & Gao, 2011).

WP1066 es otro inhibidor químico que inhibe la fosforilación de STAT3, este es un análogo del inhibidor de JAK2 AG490, similar a este inhibidor WP1066 inhibe la fosforilación de JAK2 pero también ocasiona la degradación de la proteína, bloqueando de esta manera la señalización de STAT3. Debido a su solubilidad y a su rango de inhibición se sugirió que este compuesto podría ser un buen candidato para desarrollo clínico. Este inhibidor indujo apoptosis en células malignas de glioma *in vivo* e *in vitro* y ha mostrado efectos similares en otros tipos de cáncer.

III.8 Inhibidores de survivina y su potencial en la terapia contra cáncer

Survivina es un blanco para el desarrollo de fármacos poco convencional ya que su estructura no revela sitios de unión hidrofóbicos que pudieran servir como sitio de acoplamiento para ligandos de bajo peso molecular, varias estrategias indirectas han sido exploradas para afectar su función y el fenotipo de las células que la expresan, estas afectan la expresión y eventualmente la función de la proteína pero no están basadas en la unión directa del fármaco con survivina, sin embargo el hecho de que survivina no es una enzima o una molécula de superficie celular ha ocasionado una limitación en las terapias a desarrollar (Groner & Weiss, 2014).

Bloquear la transcripción del gen de survivina mediante la inhibición de factores de transcripción específicos ha sido ampliamente usado como alternativa indirecta, YM155 (sepantronium bromide), este compuesto inhibe la expresión de survivina a

nivel de mRNA y proteína, además exhibe una marcada respuesta anticancerígena en modelos preclínicos. Una ventaja de YM155 comparado con inhibidores previos de la expresión de survivina es que este es activo en un rango nano molar en una amplia variedad de líneas celulares tumorales; además de que ha mostrado capacidad de inducir regresión tumoral de xenotransplantes de células de linfoma, cáncer de próstata, y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Iwasa et al., 2008).

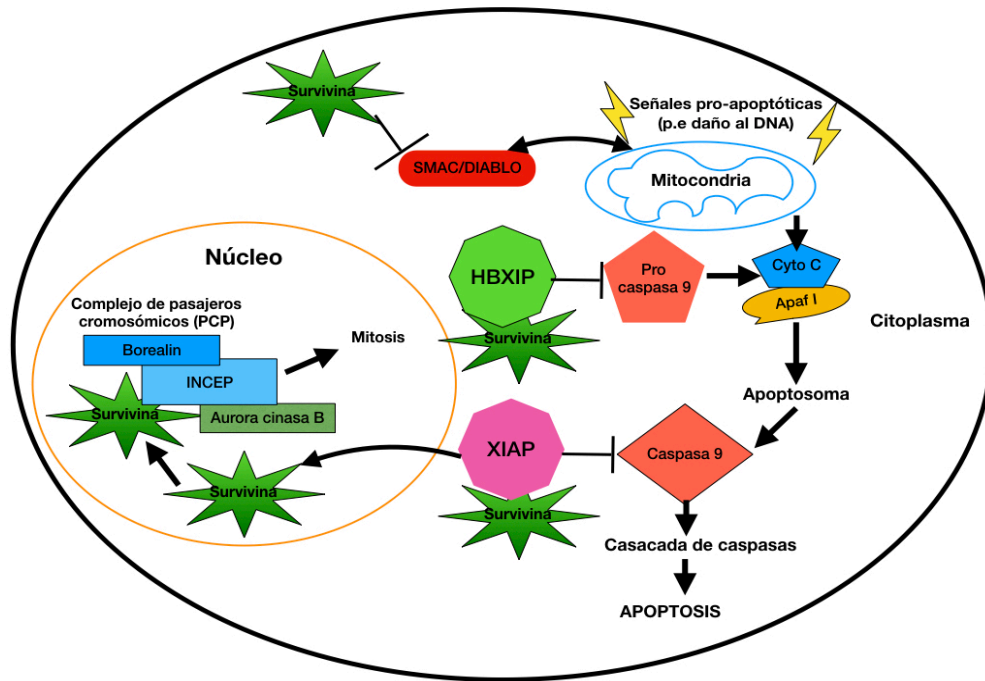


Figura 3. Participación de survivina en la regulación de apoptosis y el ciclo celular. Survivina regula la progresión del ciclo celular uniéndose al complejo cromosomal pasajero (CPC). Survivina inhibe la apoptosis uniéndose a SMAC/DIABLO previniendo la inhibición de las caspasas; también se ha postulado que survivina forma un complejo con la proteína XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) para estabilizarla y así inhibir a caspasa 9. Otra hipótesis sugiere que survivina requiere de la presencia de la proteína HBXIP (Hepatitis B virus X-interacting protein) para unirse a procaspasa 9 para prevenir su reclutamiento al apoptosoma e inhibir su activación. Tomado y modificado de *Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present and future promises*, 2017.

IV. ANTECEDENTES

Pacientes con cáncer cervical presentan anemia cuando están en tratamiento con cisplatino por lo que la Epo recombinante humana es usada para el tratamiento de anemia asociada al cáncer. Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con Epo confiere a las células tumorales la capacidad de resistencia a la muerte mediada por cisplatino. Se ha demostrado el efecto protector de Epo frente a la muerte por cisplatino *in vitro* e *in vivo* y que estos efectos dependen del rEpo y la activación de JAK2 (Vázquez-Mellado, 2009). Adicionalmente, se encontro que Epo induce la activación de STAT3 e incrementa los niveles de survivina lo que sugiere que esta proteína es requerida para ejercer el efecto citoprotector de Epo contra cisplatino en CaCu (Córtes-Ballinas, 2016).

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea que el efecto protector de Epo es mediado por la activación de STAT3. Por lo que inhibir STAT3 en células tumorales de CaCu sería necesario para restablecer el efecto de cisplatino, y caracterizar molecularmente el efecto nos daría alternativas de inhibición específica para resolver el problema del tratamiento conjunto de la anemia y el CaCu.

V. HIPÓTESIS

Al inhibir STAT3 en la línea celular SiHa el efecto citoprotector de eritropoyetina se abatirá y se inducirá la muerte celular mediada por cisplatino.

VI. OBJETIVOS

VI.1 General

Evaluar el efecto de la inhibición de STAT3 y su participación en el efecto citoprotector de eritropoyetina en la línea celular SiHa tratada con cisplatino.

VI.2 Objetivos Particulares

- Estudiar el efecto citoprotector de la estimulación con eritropoyetina en la línea celular SiHa al ser tratada con cisplatino.
- Evaluar el efecto citoprotector de Eritropoyetina en células SiHa tratadas con cisplatino al inhibir STAT3, utilizando los inhibidores químicos S31-201 y WP1066.
- Analizar la activación de Cdk1 y Survivina al inhibir STAT3 con los inhibidores químicos en la línea celular SiHa.
- Evaluar el efecto de la inhibición de survivina con YM155 en el efecto citoprotector de Epo en células SiHa tratadas con cisplatino.

VII. Materiales y métodos

VII.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular SiHa procedente de un carcinoma cervical humano, se cultivó en medio DMEM (CAISSON LABS) con suero fetal bovino al 2%, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina y moxifloxacino 1µg/mL. En cada pasaje se hizo un lavado a las células con PBS estéril (Apéndice A) y se les agregó 2 mL de Verseno estéril (Apéndice A) para despegarlas, se centrifugaron a 2500rpm durante 5 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en 4ml de medio fresco, el cultivo se mantuvo en incubación con 5% de CO₂ a 37°C.

VII.2 Determinación de la IC₅₀ de Cisplatino

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de Cisplatino, el ensayo se realizó por triplicado y se sembraron 25,000 células por pozo en placas de 96, se incubaron durante dos horas para permitir la adherencia celular en medio DMEM al 2% de SFB (Suero Fetal Bovino), pasado este tiempo se agregaron concentraciones crecientes de cisplatino (Noveldexis, PiSA) desde 0.5µg/mL hasta 125µg/mL para tener un volumen final de 200µl, la placa se incubó con 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas, la viabilidad celular se evaluó por medio de el ensayo de MTT.

VII.3 Ensayo MTT

Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular usando la técnica de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, por sus siglas en inglés). Una vez concluidas las 24 horas de exposición a cisplatino se removió el medio y se agregaron 100µL de medio DMEM fresco y 50 µL de MTT (0.5 µg/mL) a cada pozo, se mezcló y se dejó incubar por dos horas a 37°C y 5 % de CO₂. Una vez transcurridas las 2 horas, se retiró el medio con el MTT y se agregaron 150 µl de isopropanol a cada pozo para disolver el precipitado formado (formazan) y se analizó mediante espectrofotometría a 570nm utilizando el equipo BioTek ELx800, las absorbancias obtenidas se reportaron como porcentaje de viabilidad celular.

VII.4 Ensayo de protección con Eritropoyetina

Se sembraron 25,000 células por cada pozo en una placa de 96 pozos, se incubó durante 2 horas para permitir su adherencia y se agregaron concentraciones crecientes de Eritropoyetina desde 0U hasta 200U (Exetin-A, 4000UI/mL PiSA), se sometió a otro periodo de incubación por dos horas e inmediatamente se agregó la IC₅₀ de cisplatino a cada pozo conteniendo las distintas concentraciones de Eritropoyetina y se incubó a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, posteriormente se determinó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT, el ensayo se realizó por triplicado.

VII.5 Determinación de la IC₅₀ de los inhibidores S31-201 y WP1066

Se realizaron ensayos para determinar la IC₅₀ de los inhibidores de STAT3 a utilizar (S31-201 y WP1066), cada ensayo por triplicado, para esto se sembraron 25,000 células en placas de 96 pozos, se incubaron durante dos horas para permitir la adherencia celular en medio DMEM, pasado este tiempo se agregaron concentraciones crecientes de cada inhibidor, desde 0.3 µg/ml hasta 300µg/mL para S31-201 y desde 0.1 µg/mL hasta 100µg/mL para WP1066, se incubaron por 24 horas, posteriormente se removió el medio y se realizó el ensayo de MTT para obtener la viabilidad celular.

VII.6 Extracción de proteínas

Se sembraron 900,000 células en placas 6 pozos y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante dos horas para permitir su adherencia, después se agregaron concentraciones decrecientes del inhibidor S31-201 desde 344 µM hasta 21.5 µM a cada pozo y se incubó durante dos horas, transcurrido este tiempo se agregó como estímulo 150U/ml de Eritropoyetina a cada pozo durante 10 minutos, dejando un pozo con células sin tratamiento como control. Se repitió el cultivo para una segunda extracción de proteínas esta vez utilizando concentraciones decrecientes desde 70µM hasta 1 µM del inhibidor WP1066. La extracción de proteínas a 4 °C se realizó en hielo, se retiró el medio de los pozos y se hicieron dos lavados con

PBS frío, se agregó a cada pozo 100µl de buffer de lisis RIPA (Apéndice A) que contenía inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma Aldrich) y proteasas (Complete mini protease inhibitor cocktail, Roche), se recolectaron las células con ayuda de raspadores pequeños y se colocaron en microtubos de 600 µl, se resuspendió mediante pipeteo y se agitó durante 20 minutos a 4°C, después se centrifugó en frío a 12,000rpm por 3 minutos y se pasó el sobrenadante a otros microtubos de 600 µl para su cuantificación.

Para realizar la cuantificación se usó el kit DC Protein Assay (BIO-RAD); de acuerdo al instructivo se realizó una curva patrón de BSA (Bovine Serum Albumin, Santa Cruz Biotechnology) con 12 concentraciones partiendo de 0.2mg/mL a 1.6mg/mL. En una placa de 96 pozos se colocaron 5µl de cada dilución de la curva patrón y de cada muestra por triplicado, se adicionaron los reactivos en el orden indicado por el instructivo y se colocó en agitación suave por 15 minutos para su posterior lectura a 750 nm utilizando el equipo BioTek ELx 800, una vez obtenidos los datos se calculó la concentración de cada muestra utilizando la curva patrón.

VII.7 Western Blot

Con la proteína obtenida de cada tratamiento se realizó una electroforesis en un gel de acrilamida al 8% (SDS-PAGE) se ajustó la fuente de poder a 120 Volts y se dejó durante una hora y media, posteriormente se transfirió a una membrana de PVDF (0.45µm, Immobilon-P, Millipore) y se ajustó la fuente de poder a 120 mA durante toda la noche a 4°C. Después de la transferencia las membranas se tiñeron con Rojo de Ponceau para evaluar la transferencia y se bloquearon por dos horas a temperatura ambiente en BSA al 1 % en TBS-Tween al 0.1% (Apéndice A) para las proteínas fosforiladas y con leche al 5 % en TBS-Tween al 0.1% para las proteínas totales, se hicieron 3 lavados por 5 minutos con TBS-Tween; se incubaron a 4°C con agitación constante durante toda la noche con los siguientes anticuerpos: anti-STAT-3 [C3] (1:500, GeneTex), anti fosfo STAT-3 Tyr 705 (1:1000, GeneTex), anti-Survivina (1:300, GeneTex), anti-fosfo Survivina Thr34 (1:250, Santa Cruz Biotechnology), anti-Cdk-1 (1:300, Abcam) y anti-GAPDH

(1:15,000, Santa Cruz Biotechnology) como control de carga. Se hicieron 2 lavados de 5 minutos con TBS-Tween y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante con un anticuerpo secundario anti- Rabbit IgG-HRP (1:20,000, Santa Cruz Biotechnology), posteriormente se hicieron dos lavados adicionales con TBS-tween al 0.1%, las membranas se revelaron mediante ECL (Enhanced Chemiluminiscence-GeneTex).

VII.8 Ensayos de inhibición de STAT3 y survivina

VII.8.1 Ensayo con el inhibidor de STAT3 WP1066

Se sembraron 25,000 células en una placa de 96 pozos y se incubaron durante dos horas para permitir su adherencia, terminado este tiempo se agregó el inhibidor WP1066 (5 μ M, Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante 2 horas, después se sometió a un estímulo de 150U de eritropoyetina (Exetin-A, 4000UI/ml PiSA) durante 2 horas, finalmente se agregó la IC₅₀ cisplatino (83.5 μ M, Noveldexis, PiSA) y se incubó la placa durante 24 horas para medir la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

VII.8.2 Ensayo con el inhibidor de Survivina YM155

Se sembraron 25,000 células en una placa de 96 pozos y se incubaron durante dos horas para permitir su adherencia, terminado este tiempo se agregó el inhibidor YM155 (1nM, Adooq Bioscience) y se incubó durante 48 horas, después se sometió a un estímulo de 150U de eritropoyetina (Exetin-A, 4000UI/ml PiSA) durante 2 horas, finalmente se agregó la IC₅₀ cisplatino (83.5 μ M, Noveldexis, PiSA) y se incubó la placa durante 24 horas para medir la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

VII.8.3 Análisis estadístico

Para determinar si había diferencia entre los grupos de tratamiento se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.0 utilizando ANOVA de un factor y una prueba de Tukey, se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

VIII. Resultados

VIII.1 Efecto protector de Eritropoyetina en la línea celular SiHa sobre la muerte inducida por cisplatino.

Como primer objetivo se realizó el cálculo de la IC_{50} de cisplatino, se analizaron tres experimentos independientes en donde se midió la viabilidad celular en la línea SiHa a las 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de cisplatino y mediante regresión lineal se calculó un valor de $83.5\mu M$ que fue utilizado en todos los experimentos posteriores.

Trabajos previos han demostrado que Epo protege células tumorales de la muerte inducida por quimiofármacos (Vázquez-Mellado, 2009). Por lo tanto, para demostrar este efecto en la línea celular SiHa, estimulamos las células con diferentes concentraciones de Epo antes de la exposición de la IC_{50} de cisplatino. Nuestros resultados muestran que a $125 U/mL$ y a $150U /mL$ la viabilidad celular es significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con las demás concentraciones utilizadas y la IC_{50} cisplatino. Estos resultados sugieren que Epo induce un efecto protector contra la muerte celular inducida por este quimiofármaco, por lo anteriormente expuesto se eligió la dosis de $150U /mL$ para utilizarla en todos los ensayos posteriores (Figura 4).

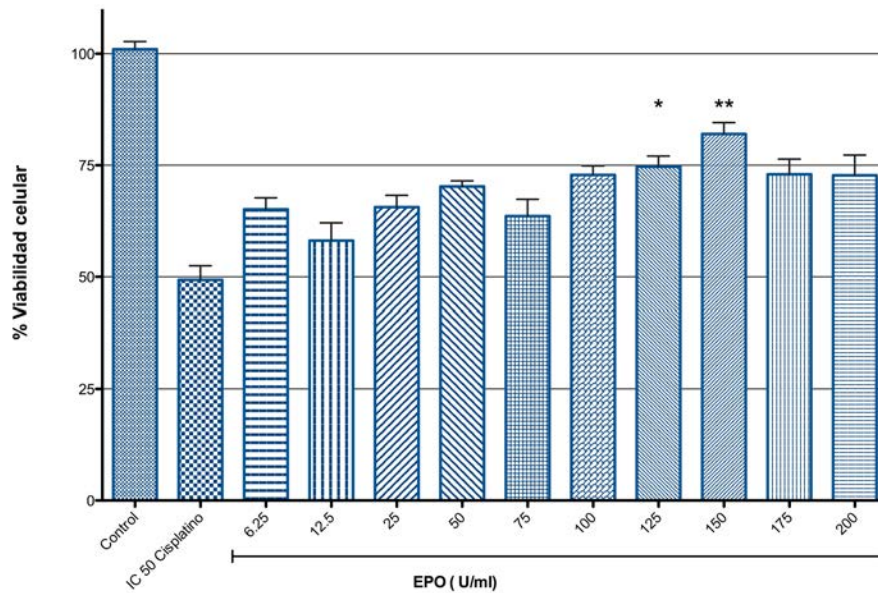


Figura 4. Efecto citoprotector de Eritropoyetina sobre la muerte inducida por cisplatino en células SiHa. Las células fueron estimuladas con dosis crecientes de eritropoyetina durante dos horas y posteriormente tratadas con la IC₅₀ de cisplatino durante 24hrs. La viabilidad celular se midió mediante MTT; se realizaron tres experimentos de manera independiente y se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. * $p < 0.05$ en comparación con la IC₅₀ de cisplatino y 0 U/mL de rhEPO.

Para identificar si el efecto citoprotector de Epo es mediado por la activación de STAT3 se seleccionaron inhibidores químicos de STAT3, S31-201 y WP1066, debido a que ambos han mostrado eficacia en diversos tipos de cáncer (Iwamaru et al., 2007; Siddiquee et al., 2007).

En primera instancia se determinó el efecto de ambos inhibidores en células SiHa, para realizarlo se obtuvo la dosis inhibitoria 50 de cada uno por 24 horas a diferentes concentraciones. S31-201 alcanzó una IC₅₀= 525.23 μ M y para WP1066 se obtuvo un IC₅₀= 7.38 μ M. Estos resultados muestran que se necesita una menor concentración de WP1066 para ejercer un efecto sobre la viabilidad celular en comparación con S31-201 y sugiere que WP1066 puede utilizarse a concentraciones que no induzcan una respuesta tóxica.

VIII.2 WP1066 y S31-201 suprimen la fosforilación de STAT 3.

Para determinar la concentración que ejerce un efecto sobre la activación de STAT3 (pTyr 705) se realizó un inmunoblot exponiendo a la línea celular SiHa a diferentes de concentraciones de ambos inhibidores a partir de las concentraciones obtenidas mencionadas anteriormente. Se observó que para el inhibidor S31-201 la inhibición de la fosforilación de STAT3 disminuyó progresivamente hasta la concentración de 172 μ M permaneciendo constante a concentraciones mayores (Figura 5).

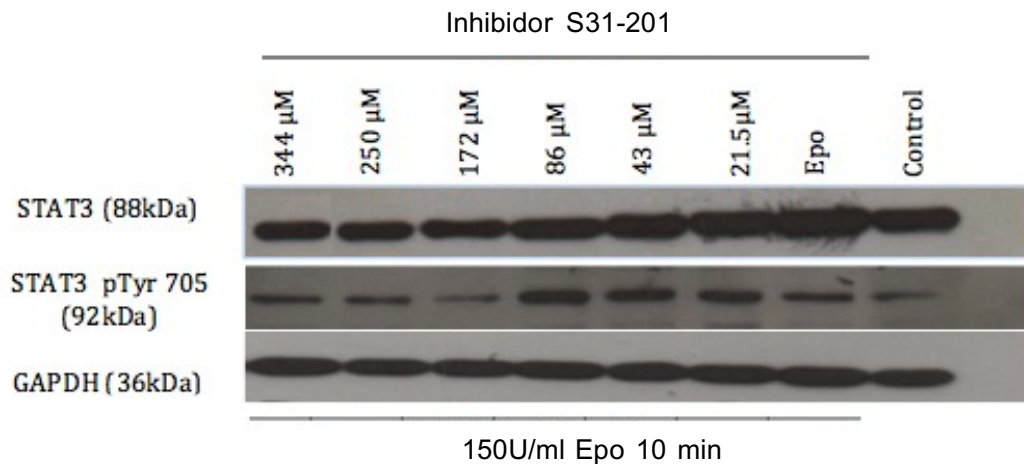


Figura 5. El Inhibidor S31-201 necesita dosis elevadas para inhibir la activación de STAT3 en células SiHa. Se presenta una disminución de fosforilación de STAT3 al estimular las células con Eritropoyetina y agregar concentraciones crecientes del inhibidor S31-201 durante 24 horas, se observó la presencia de STAT3, STAT3(pTyr705) y se utilizó GAPDH como control de carga.

La inhibición de la fosforilación de STAT3 mediada por WP1066 se alcanza a partir de la concentración de 17.54 μ M y se mantiene constante a 35.09 μ M hasta no percibirse a la concentración de 70.8 μ M. Los niveles de fosforilación detectados para ambos inhibidores sugieren que WP1066 posee mayor capacidad de

inhibición de la fosforilación de STAT3 que S31-201 al mostrar efecto con 10 veces menos concentración (Figura 6).

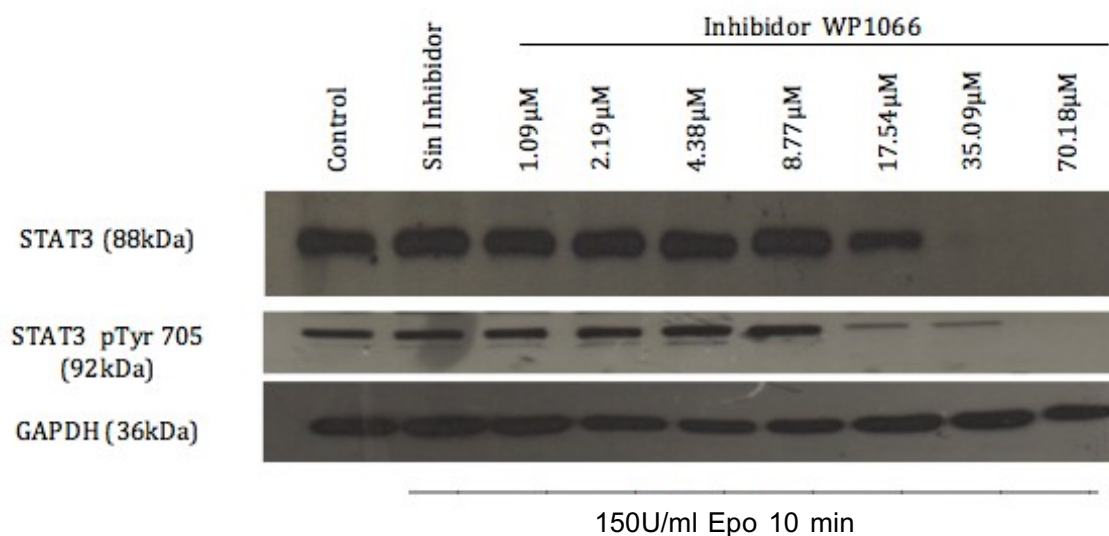


Figura 6. WP1066 inhibe la fosforilación de STAT3 en células de cáncer cervical SiHa. Al estimular las células con Eritropoyetina y agregar concentraciones crecientes del inhibidor WP1066 durante 24 horas, se observa una disminución progresiva de STAT3(pTyr705), y STAT3 en comparación con el control sin estímulo; se utilizó GAPDH como control de carga.

VIII.3 WP1066 muestra mayor potencia en la inhibición de la expresión y activación de survivina y no así S31-201.

La activación persistente de STAT3 induce la expresión del inhibidor de apoptosis survivina y confiere resistencia a quimiofármacos en células de diferentes tipos de cánceres (C.-L. Chen et al., 2007). Con base en nuestros resultados de la inhibición de STAT3 mediado por S31-201 y WP1066, determinamos el efecto de ambos inhibidores a diferentes concentraciones sobre la expresión Cdk1 y survivina, así como la activación de ésta última (fosforilación de la treonina 34, pThr 34). El inhibidor S31-201 no induce un efecto sobre de los niveles de fosforilación o expresión de survivina o Cdk1, inclusive a altas concentraciones (Figura 7 y 8). Por otra parte, WP1066 ejerce un efecto disminuyendo los niveles de fosforilación de survivina de manera dosis dependiente alcanzando una máxima

disminución a 17.54 μM (Figura 9). El efecto de WP1066 mantiene constantes los niveles de CdK1 (Figura 10). Estos resultados indican que S31-201 no induce un efecto sobre la vía de señalización de survivina rio abajo de su efecto inhibitorio de STAT3. En contraste, WP1066 ejerce su efecto disminuyendo los niveles de activación de survivina, aunque este efecto parece no ser afectado por la presencia de CdK1.

Con estos resultados decidimos utilizar al inhibidor WP1066 para experimentos posteriores ya que necesita menor concentración para ejercer su función y posee la capacidad de inducir un efecto en la vía STAT3/Survivina.

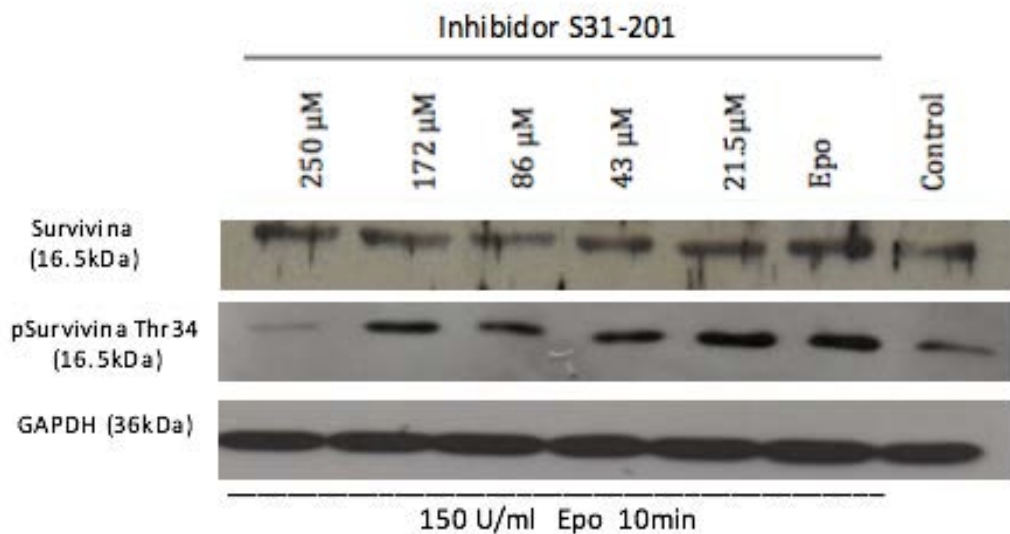


Figura 7. S31-201 no induce un efecto sobre la fosforilacion de survivina. Se analizó la presencia de survivina al estimular las células con Epo y distintas concentraciones de S31-201 durante 24 horas. La forma fosforilada de survivina (pThr34) no presentó cambios en comparación del control sin estímulo; se uso GAPDH como control de carga.

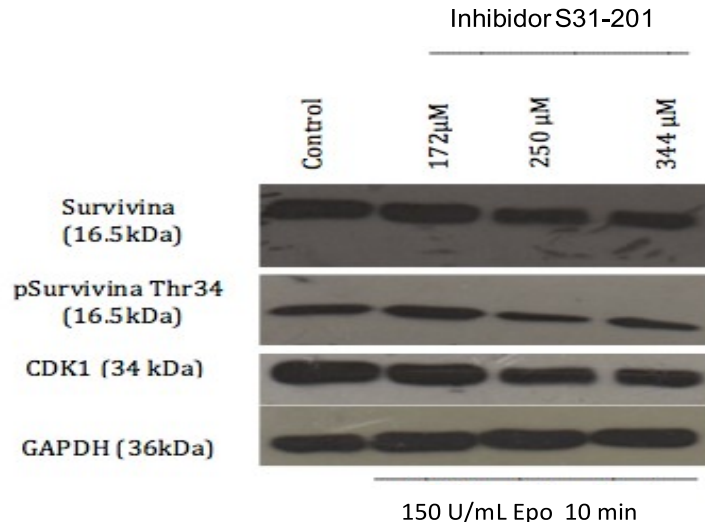


Figura 8. S31-201 no induce un efecto sobre la activación de survivina y expresión de Cdk1. Se analizó la presencia de Cdk1 y survivina al estimular las células con Epo y distintas concentraciones de S31-201 durante 24 horas. La forma fosforilada de survivina (pThr34) y cdk1 total no presentaron cambios en comparación con el control sin estímulo; se uso GAPDH como control de carga.

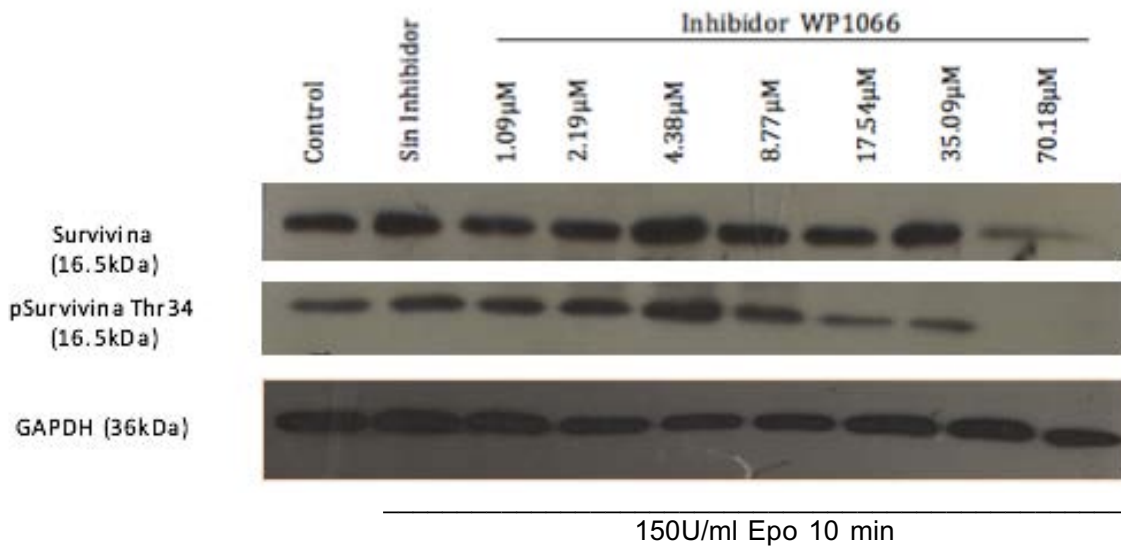


Figura 9. WP1066 inhibe la fosforilación de survivina en células SiHa.

Se estimularon las células con Eritropoyetina y se agregaron concentraciones crecientes del inhibidor WP1066 durante 24 horas, se observa una disminución progresiva de survivina(pThr34) en comparación con el control sin estímulo; se utilizó GAPDH como control de carga.

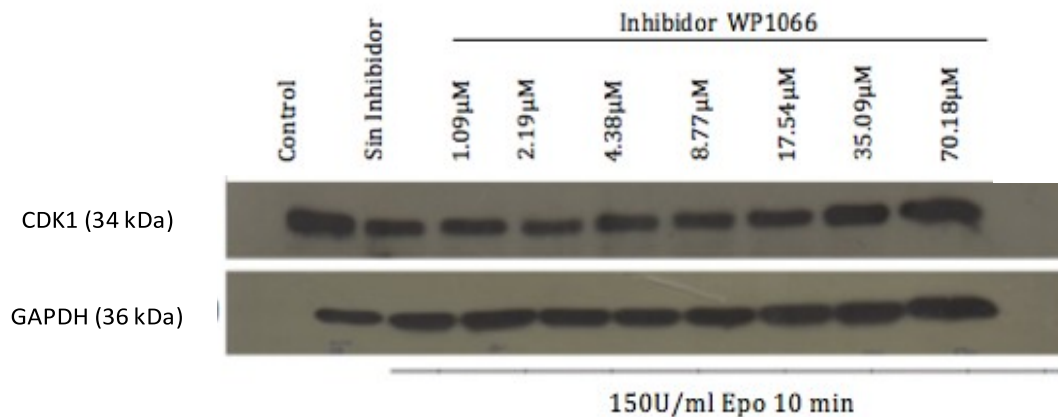


Figura 10. WP1066 no induce un efecto sobre la expresión de CdK1.

Se observa la presencia de CdK-1 total al estimular las células con Eritropoyetina y distintas concentraciones de inhibidor WP1066 durante 24 horas.

VIII.4 WP1066 inhibe el efecto citoprotector de Epo frente a cisplatino en células de cáncer cervical.

Se ha comprobado que el efecto de Eritropoyetina está relacionado con la inhibición de apoptosis cuando se activa STAT3 en células SiHa. Determinamos si la inhibición de STAT3 por WP1066 ejerce un efecto sobre la citoprotección mediada por Epo contra cisplatino. Se evaluó la viabilidad del cultivo celular SiHa expuesto a una concentración de 5 μM de WP1066 estimulado con EPO y añadiendo la IC₅₀ de cisplatino. Nuestros resultados indican que WP1066 disminuye la viabilidad celular en un 25% comparado con el efecto de Epo y cisplatino juntos, sugiriendo que WP1066

inhibe el efecto citoprotector mediado por Epo contra cisplatino. Además, los niveles de viabilidad son equiparables con la exposición de cisplatino sin Epo. Esto sugiere que WP1066 solo inhibe el efecto de Epo sin inducir muerte celular y permite que cisplatino ejerza su efecto.

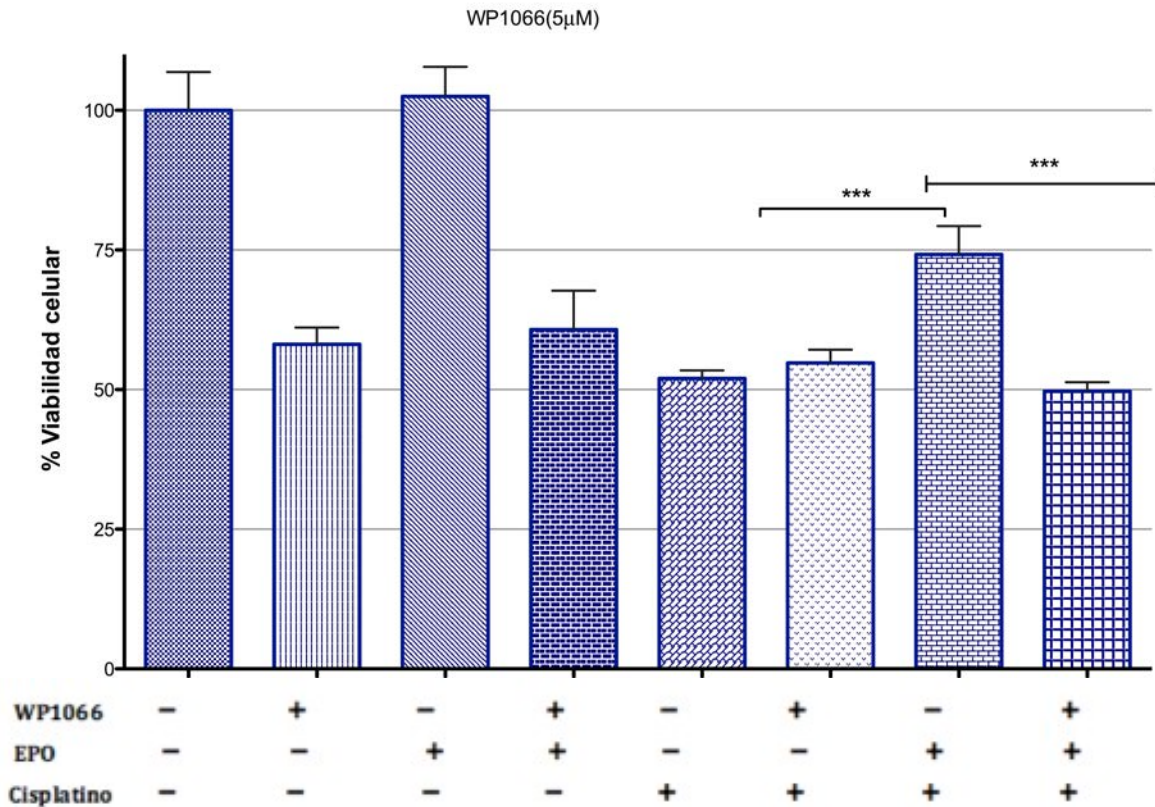


Figura 11. WP1066 Inhibe el efecto citoprotector de Epo frente a cisplatino en células SiHa. Las células fueron expuestas a 5 μ M del inhibidor WP1066 durante 2 horas, seguido de un estímulo de 150U de eritropoyetina por 2 horas y finalmente tratadas con la IC₅₀ de cisplatino durante 24 horas para su análisis mediante un ensayo de MTT. Se consideró $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. * $p < 0.05$ en comparación con la IC₅₀ de cisplatino y 0 U/mL de rhEPO.

VIII.5 El inhibidor de survivina YM155 suprime el efecto protector de EPO frente a cisplatino en células de cáncer cervical.

Se ha demostrado que la activación de survivina está altamente relacionada con la resistencia a quimiofármacos en cáncer (Peery et al., 2017). Exploramos el efecto del inhibidor de survivina YM155 ante la quimiprotección contra cisplatino (IC50) mediada por Epo en el cultivo celular SiHa. Para observar el efecto del inhibidor YM155 sobre la expresión de survivina se expuso el cultivo celular de SiHa a concentraciones de 1nM, 3nM y 5nM. La expresión de survivina disminuye en relación a un aumento en la concentración de YM155 (Figura 12). Al utilizar una concentración de 1nM de YM155 la viabilidad celular se abate en un 25% en comparación con el efecto Epo y cisplatino, y es equiparable con el efecto mostrado cuando se exponen a cisplatino en el cultivo celular. Estos resultados sugieren que YM155 inhibe el efecto de Epo y permite que cisplatino ejerza su acción sin potenciar el efecto de muerte celular (Figura 13). En comparación con el efecto mostrado de WP1066, YM155 muestra tener mejor viabilidad cuando es administrado solo, sugiriendo una mayor tolerancia en contraste con WP1066 en esta línea celular. Los resultados del tratamiento con el inhibidor YM155 sugieren que survivina está relacionada con el efecto citoprotector de EPO permitiendo al cisplatino ejercer su efecto.

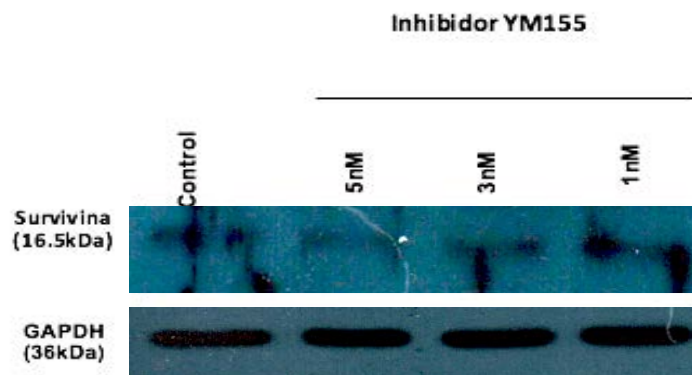


Figura 12. YM155 inhibe la expresión de survivina en células SiHa.

Se observa una disminución en la presencia de survivina al estimular las células con Eritropoyetina y distintas concentraciones del inhibidor YM155 durante 48 horas.

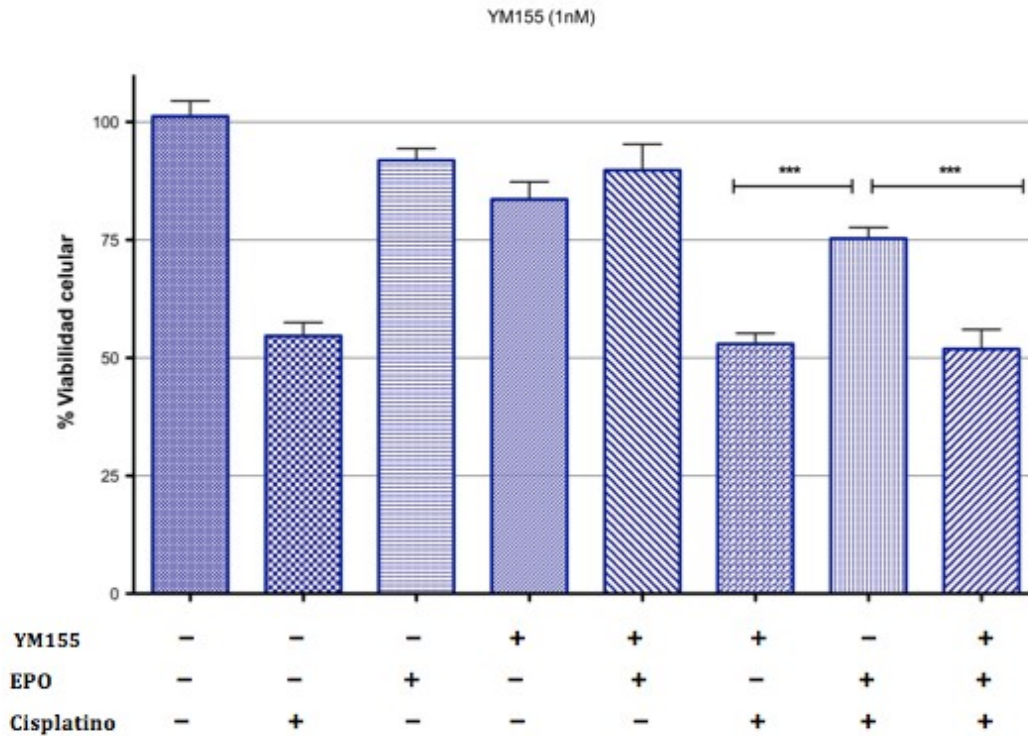


Figura 13. El efecto citoprotector de Epo es inhibido por YM155 en células SiHa. Las células fueron tratadas durante 48 horas con 1nM deYM155 y posteriormente estimulado con Epo por 2 horas y posteriormente la IC₅₀ de cisplatino durante 24hrs para realizar un ensayo de MTT; se realizaron tres experimentos de manera independiente y se consideró p<0.05 como estadísticamente significativo.*p <0.05 en comparación con la IC₅₀ de cisplatino y 0 U/mL de rhEPO.

IX. Discusión

La anemia es una consecuencia frecuente de CaCu debido a la deficiencia de hierro y hemorragias producidas por el crecimiento tumoral. Además, la anemia representa un pronóstico negativo en un paciente con CaCu (Candelaria, Cetina, & Dueñas-González, 2005). Para corregir la anemia en pacientes con cáncer, la utilización de rhEpo se ha convertido en una de las principales terapias para aumentar los niveles de hemoglobina. Durante un tiempo se consideró que Epo tenía solo un efecto biológico; la estimulación, proliferación y diferenciación de la línea eritroide (Hardee, Arcasoy, Blackwell, Kirkpatrick, & Dewhirst, 2006). Sin embargo, a diferencia de su acción principal como reguladora de la producción de eritrocitos, Epo está involucrada en proliferación y resistencia a quimiofármacos en células tumorales (Szenajch, Wcislo, Jeong, Szczylik, & Feldman, 2010). La expresión de Epo-rEpo se ha observado en células del cérvix, endometrio y ovario, también se le ha identificado en epitelio cervical displásico, tejido de carcinoma cervical y en líneas tumorales de CaCu (Lopez et al., 2011). En este estudio demostramos que Epo a concentraciones de 125 y 150 U/mL ejerce un efecto citoprotector contra cisplatino en una línea celular de CaCu (SiHa). Este efecto corrobora lo antes reportado por nuestro grupo de investigación en donde Epo mostró un efecto protector en SiHa, HeLa y C33 contra cisplatino (Córtes-Ballinas, 2009; Vázquez-Mellado, 2009). En otros tipos de cánceres Epo ha ejercido el mismo efecto en cáncer de ovario y cáncer de mama. Además, ha mostrado inducir la resistencia a otro tipos de compuestos como el paclitaxel y 5FU (Solar, Feldman, Jeong, Busingye, & Sytkowski, n.d.; Todaro et al., 2013). Sin embargo, estudios preclínicos son controversiales debido a que rhEpo induce radiosensibilidad, incrementa el tiempo de crecimiento de los tumores e incrementa la toxicidad a quimioterapéuticos. Por el contrario, otros estudios muestran el efecto adverso al usar Epo en pacientes con anemia debido a la activación de vías de sobrevivencia tumoral y a que se relaciona con la baja supervivencia de pacientes en estudios clínicos de cáncer de mama, cabeza y cuello que recibieron tratamiento con

rhEpo en comparación con el grupo control (Hardee et al., 2006). Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar terapias alternativas que puedan corregir la anemia en pacientes con CaCu cuyos efectos biológicos no presenten un riesgo al estimular las células tumorales y afectar la sobrevivencia de la persona.

Dentro de las vías de señalización activadas por Epo, se encontró que JAK/STAT se encuentra involucrada en la citoprotección de las células de carcinoma cervical, Epo induce la activación de JAK2, JAK3, STAT3 y STAT5 en modelos *in vitro* e *in vivo* (Lopez et al., 2011). La presencia de STAT3 activo de manera constitutiva se ha señalado como un factor de mal pronóstico para el desarrollo y progresión de cáncer cervical (Chen et al., 2007).

En células cancerosas hematopoyéticas y de mama, STAT3 activo se ha asociado con resistencia a quimiofármacos, así como en distintos tipos de tumores humanos la activación de esta proteína es suficiente para promover la formación de tumores. La activación constitutiva de STAT3 participa en la oncogénesis estimulando la proliferación, promoviendo la angiogénesis, mediando la evasión inmune y confiriendo resistencia a la apoptosis. STAT3 se ha encontrado activado en cáncer cervical, endometrial y de ovario por lo que se piensa que esta activación constitutiva es un mecanismo importante para la oncogénesis de cánceres ginecológicos (Chen et al., 2007).

Estudios han demostrado que la depleción de STAT3 aumenta la respuesta a cisplatino en células de cáncer de ovario, además sugieren que la activación constitutiva de STAT3 es un biomarcador de la resistencia a cisplatino relacionándolo con una pobre respuesta a este quimiofármaco (Han et al., 2013; Ji et al., 2013). Hallazgos en nuestro laboratorio mostraron que el estímulo con rhEpo incrementa la activación de STAT3 e induce la expresión de genes relacionados con la inhibición de apoptosis y proliferación celular, tales como, el gen de survivina y el de cdk1 (Córtes-Ballinas, 2016).

Debido a la importancia biológica de STAT3 para el desarrollo de tumores, es de gran interés para la terapia contra el cáncer, ya que las células cancerosas dependen más de la actividad de STAT3 que sus contrapartes normales. Por lo tanto, se han desarrollado inhibidores químicos para disminuir la activación constitutiva de STAT3. Estudios sugieren que la inhibición de STAT3 induce vías de apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral en modelos *in vivo*. (Chen et al., 2007). En este estudio se analizó el efecto de dos importantes inhibidores químicos de STAT3, S31-201 y WP1066. Exploramos el efecto citoprotector de Epo al inhibir STAT3 con estas dos moléculas y con esto dilucidar si la activación constitutiva de STAT3 en conjunto con el estímulo de Epo es responsable del efecto protector. Observamos que cuando STAT3 se inhibe con S31-201, este inhibidor necesita concentraciones muy altas para inducir una respuesta significativa en los niveles de activación de STAT3 indicando que no posee un efecto óptimo de inhibición. Estudios han mostrado que S31-201 inhibe la proliferación de células cancerosas hepáticas y de mama en ratones, e induce regresión tumoral en modelos de xenotransplante de tumores de mama (Siddiquee et al., 2007). Sin embargo, estudios de asociación molecular mostraron una interacción subóptima entre STAT3 y S31-201, lo que concuerda con nuestros resultados, en un esfuerzo por mejorar esta interacción diversas moléculas han sido desarrolladas (Furqan et al., 2013). Debido a esto y al efecto mostrado en nuestros resultados descartamos el uso del inhibidor S31-201.

En años recientes se han estudiado diversos inhibidores de fosforilación de tirosinas llamados tirfostinas, entre ellos el inhibidor de JAK2 llamado AG490. Aunque ha sido extensamente probado, no ha sido desarrollado para un adecuado uso clínico. Debido a esto se han sintetizado diversos derivados de AG490 y se ha probado su actividad; un análogo de este inhibidor, llamado WP1066, presenta una óptima solubilidad y un amplio perfil de inhibición lo que lo convierte en un candidato prometedor para desarrollo clínico. Estudios han mostrado que WP1066 inhibe la fosforilación de JAK2 y la vía de señalización de STAT3 río abajo, y a diferencia de su análogo AG490, WP1066 promueve la degradación de la proteína JAK2 sin afectar la expresión de su

RNA mensajero (Furqan et al., 2013).

En este trabajo se evaluó la acción de WP1066 en la línea celular SiHa. En contraste con S31-201, WP1066 requiere una concentración diez veces menor de WP1066 para ejercer un efecto biológico sobre STAT3 disminuyendo su actividad de manera dosis dependiente. Debido a la disminución de la fosforilación de STAT3 inducida por WP1066, exploramos los niveles de fosforilación de survivina, ya que su gen es blanco de STAT3. Encontramos un efecto similar al que se observó en los niveles de fosforilación de STAT3, estos cambios en la fosforilación de survivina son resultado de la inhibición de STAT3; por otra parte, no se presentó algún efecto en la expresión de la proteína Cdk-1 ni en concentraciones donde se ve afectada la activación de STAT3. Con base en nuestros hallazgos de inhibición de STAT3 y survivina, evaluamos el efecto citoprotector de Epo contra cisplatino inhibiendo a STAT3 con WP1066 a una concentración de 5 μ M. WP1066 abatió el efecto protector mediado por Epo permitiendo que cisplatino ejerza su efecto, lo cual sugiere que STAT3 está directamente relacionado con el efecto producido por Epo. Este efecto puede ser atribuido a que WP1066 directamente inhibe a STAT3, por lo que Epo no puede inducir su efecto de sobrevivencia a través de esta vía. Se ha demostrado que WP1066 induce muerte celular al inhibir a STAT3, y así permitir la activación de caspasas (Ferrajoli et al., 2007). Por otra parte, WP1066 no ha sido evaluado en células de CaCu por lo que no se dispone de información para comparar su efecto en este tipo de cáncer. Sin embargo, estudios *in vivo* muestran que la administración intraperitoneal en ratones de WP1066 inhibió el crecimiento de un tumor de glioma maligno subcutáneo durante los 30 días de seguimiento y los niveles de STAT3 fosforilado en el grupo tratado con el inhibidor permanecieron inhibidos hasta tres semanas después de la última administración con WP1066 (Ferrajoli et al., 2007). Además, WP1066, posee una amplia actividad antitumoral mostrada contra cáncer de cabeza y cuello, pancreático, de vejiga, de riñón, gástrico, etc. (Iwamaru et al., 2007). Estudios paralelos muestran que la inhibición de STAT3 por WP1066 disminuye la incidencia de metástasis de cerebro e incrementa la sobrevivencia en un modelo preclínico de metástasis a cerebro por cáncer de mama; además este inhibidor

sensibiliza frente a cisplatino a células de carcinoma oral escamoso, suprime crecimiento, migración e invasión de cáncer de ovario y aumenta la efectividad de cisplatino *in vitro* (Geiger, Grandis, & Bauman, 2016; Horiguchi et al., 2010; Judd et al., 2014; Zielinski et al., 2014). Con esta evidencia y con base en nuestros resultados podemos concluir que WP1066 tiene un efecto antitumoral a través de la inhibición de STAT3.

Aunque la importancia de la activación de STAT3 se ha señalado como responsable de proliferación, inhibición de apoptosis y metástasis, recientemente se ha mostrado que STAT3 en tejidos de pacientes con cáncer cervical está asociado con un incremento de genes antiapoptóticos como el de survivina (Lee et al., 2015; Tang et al., 2015; Zhou et al., 2015). La expresión aberrante de survivina está altamente asociada a la resistencia a la quimioterapia, la evidencia sugiere que la desregulación en la expresión induce mecanismos moleculares que incrementan la estabilidad de la proteína y se ha asociado con el efecto antiapoptótico. La sobreexpresión es debida a la regulación constante del promotor del gen de survivina por activación constante de STAT3 en las células tumorales (Ramírez de Arellano et al., 2015). Interesantemente, survivina se ha encontrado sobreexpresada en tejidos tumorales y no en tejidos normales por lo que hace que esta proteína sea de interés para terapias dirigidas contra tumores, En este estudio se inhibió la expresión de survivina con el inhibidor transcripcional denominado YM155 y debido a que al inhibir la activación de STAT3 abate el efecto citoprotector de Epo, decidimos investigar si este efecto se mantenía al bloquear la expresión de survivina sin inhibir río arriba a STAT3. Nuestros resultados indican que la estimulación de Epo inhibiendo survivina no protege a las células tumorales SiHa contra cisplatino, indicando que survivina está fuertemente asociada con el efecto citoprotector de Epo. Interesantemente, solo al inhibir survivina el efecto es similar al observado en la inhibición de STAT3 por WP1066. Se ha corroborado en otros estudios que YM155 inhibe el promotor de survivina sin afectar a las otras proteínas antiapoptóticas, esta molécula inhibe eficazmente el crecimiento de tumores en xenotransplantes de cáncer de próstata (Gritsko et al., 2006). Además, YM155 induce muerte celular en un rango de concentración nanomolar en un amplio

panel de líneas celulares tumorales y en modelos de xenotransplante de melanoma, cancer de mama, pulmón y vejiga sin toxicidad aparente (T. Nakahara et al., 2007). Desde el desarrollo de YM155 han existido numerosas controversias para determinar el mecanismo de acción exacto por lo que se han propuesto varias alternativas de acuerdo a la evidencia, por lo tanto no se considera YM155 como un inhibidor específico de la expresión de survivina (Takahito Nakahara et al., 2011; Rauch et al., 2014; Zhang et al., 2015). El incremento de survivina en células cancerosas después de la quimioterapia se ha evaluado y es responsable de la resistencia en contra de múltiples tipos de terapias, por lo que su inhibición es utilizada sola o en combinación con otros fármacos antitumorales como potencial cura del cáncer (Cheng et al., 2012; Glaros et al., 2012).

Aunque en los últimos años YM155 y WP1066 han sido probados en ensayos preclínicos, YM155 se ha utilizado como terapia única o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, los resultados obtenidos no han sido favorables debido a que resultados contrarios han sido encontrados cuando YM155 se evaluó contra distintos tumores sólidos con una eficacia limitada. Por otra parte, en distintos ensayos preclínicos de cáncer de pulmón de células no pequeñas y próstata YM155 no mejoro la respuesta en los pacientes, ni como agente único de tratamiento o en combinación con carboplatino y paclitaxel (Zhang et al., 2015). Mientras los ensayos *in vivo* con YM155 sugieren que survivina es un buen blanco terapéutico, los resultados clínicos muestran que su desarrollo clínico es cuestionable ya que su administración no puede ser controlada en ciclos cortos si no de manera continua, actualmente no hay ensayos preclínicos en proceso de YM155. (Giaccone et al., 2009; Kelly et al., 2013). Sin embargo, debe considerarse que el efecto mostrado por YM155 puede ser específico para ciertos tipos de tumor. Este estudio demuestra por primera vez su efecto sobre células tumorales de cáncer cervical que deberá corroborarse con otras líneas celulares.

Por otra parte, WP1066 ha sido seleccionado por sus propiedades farmacológicas, su amplio rango de inhibición, su ventana terapéutica y su actividad validada *in vivo*

en un amplio rango de modelos tumorales, estas características han llevado al desarrollo de una formulación de spray oral para ensayos preclínicos (Peery, Liu, & Zhang, 2017). Estudios preclínicos de WP1066 han corroborado su eficacia mostrada en ensayos in vivo e indican que WP1066 es el primer inhibidor químico de STAT3 capaz de lograr y mantener concentraciones en tejidos asociadas con actividad farmacológica *in vivo* (Madden et al., 2012; Zielinski et al., 2015). Actualmente WP1066 se encuentra en un ensayo preclínico fase I en pacientes con glioma recurrente maligno y metástasis a cerebro por melanoma.

Dados todos los resultados obtenidos en los diversos estudios y ensayos clínicos realizados con ambos inhibidores, creemos que el uso de WP1066 podría ser un mejor agente terapéutico para el tratamiento de pacientes con CaCu, por lo que se debería explorar su valor terapéutico ya que se podría inhibir a survivina a través de la inhibición de la señalización de STAT3 río arriba. Este estudio provee de información para sugerir el uso de inhibidores de la vía JAK2/STAT3/survivina como una alternativa de tratamiento ya que podría ser usado en concentraciones subletales como apoyo a la terapia con Cisplatino y Eritropoyetina para resolver el problema que representa anemia-Epo-cáncer.

X. Conclusiones

- La eritropoyetina protege a células de cáncer cervical SiHa de la muerte inducida por cisplatino.
- STAT3 regula el efecto citoprotector inducido por Epo y al inhibir su activación se restablece el efecto de muerte por cisplatino.
- Al inhibir a survivina se pierde el efecto de Epo por lo cual está altamente relacionada con el efecto citoprotector y la supervivencia de las células.
- Estos hallazgos nos permiten explorar el uso de WP1066 y YM155 como alternativas de terapia para las pacientes con CaCu que presenten anemia.

XI. Perspectivas Generales

- Evaluar los efectos de inhibir STAT3 en la citoprotección mediada por Epo en otro tipo de líneas celulares de cancer cervical utilizando WP1066.
- Inhibir a survivina mediante YM155 para evaluar el efecto citoprotector de Epo contra cisplatino en distintas lineas celulares de cáncer cervical.
- Validar los resultados obtenidos en modelos de xenotransplante para determinar si el efecto de los inhibidores podría funcionar en con otro tipo de quimioterapéuticos.

XII. Referencias

- [1] Braný, D., Dvorská, D., Slávik, P., Školka, R., & Adamkov, M. Survivin and gynaecological tumours. *Pathology - Research and Practice*, 213(4), 295–300, 2017.
- [2] Candelaria, M., Cetina, L., & Dueñas-González, A. Anemia in Cervical Cancer Patients: Implications for Iron Supplementation Therapy. *Medical Oncology*, 22(2), 161–168, 2005.
- [3] Carpenter, R. L., & Lo, H.-W. STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*, 6(2), 897–925, 2014.
- [4] Chen, C.-L., Hsieh, F.-C., Lieblein, J. C., Brown, J., Chan, C., Wallace, J. A., Lin, J. Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *British Journal of Cancer*, 96(4), 591–9, 2007.
- [5] Chen, X., Duan, N., Zhang, C., & Zhang, W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal of Cancer*, 7(3), 314–23, 2016.
- [6] Cheng, Q., Ling, X., Haller, A., Nakahara, T., Yamanaka, K., Kita, A., Li, F. Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), 179–197, 2012.
- [7] Córtes-Ballinas. Evaluación de la participación de survivina en el efecto protector de eritropoyetina contra la muerte por cisplatino en cáncer cervical. *Tesis Maestría En Ciencias Bioquímicas. UNAM, 2016.*

- [8] Debeljak, N., Solár, P., & Sytkowski, A. J. Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Frontiers in Immunology*, 5, 563, 2014.
- [9] DeVita, V. T., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (n.d.). *Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*, 2011.
- [10] Di Saia, P. J., Creasman, W. T., & Di Saia, P. J. *Clinical gynecologic oncology*. Elsevier/Saunders, 2012.
- [11] Ferenczy, A., & Franco, E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *The Lancet. Oncology*, 3(1), 11–6, 2002.
- [12] Ferrajoli, A., Faderl, S., Van, Q., Koch, P., Harris, D., Liu, Z., Estrov, Z. WP1066 Disrupts Janus Kinase-2 and Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Cancer Research*, 67(23), 11291–11299, 2007.
- [13] Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *International Journal of Cancer*, 2014.
- [14] Furqan, M., Akinleye, A., Mukhi, N., Mittal, V., Chen, Y., & Liu, D. STAT inhibitors for cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 90, 2013.
- [15] Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., & Dubey, S. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International*, 16, 49, 2016.
- [16] Giaccone, G., Zatloukal, P., Roubec, J., Floor, K., Musil, J., Kuta, M., ... Shamsili, S. Multicenter Phase II Trial of YM155, a Small-Molecule Suppressor of Survivin, in Patients With Advanced, Refractory, Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(27), 4481–4486, 2009.

- [17] Glaros, T. G., Stockwin, L. H., Mullendore, M. E., Smith, B., Morrison, B. L., & Newton, D. L. The “survivin suppressants” NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 70(1), 207–212, 2012.
- [18] Groner, B., & Weiss, A. Targeting survivin in cancer: novel drug development approaches. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 28(1), 27–39, 2014.
- [19] Geiger, J. L., Grandis, J. R., & Bauman, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncology*, 56, 84–92, 2016.
- [20] Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Jove, R. Persistent Activation of Stat3 Signaling Induces Survivin Gene Expression and Confers Resistance to Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 12(1), 11–19, 2006.
- [21] Gupta, S., Singh, P. K., Bisth, S. S., Bhatt, M. L., Pant, M. C., Gupta, R., ... Negi, M. P. S. Role of recombinant human erythropoietin in patients of advanced cervical cancer treated by chemoradiotherapy. *Cancer Biology & Therapy*, 8(1), 13–17, 2009.
- [22] Ji, T., Gong, D., Han, Z., Wei, X., Yan, Y., Ye, F., ... Gao, Q. (2013). Abrogation of constitutive Stat3 activity circumvents cisplatin resistant ovarian cancer. *Cancer Letters*, 341(2), 231–239, 2013.
- [23] Hardee, M. E., Arcasoy, M. O., Blackwell, K. L., Kirkpatrick, J. P., & Dewhirst, M. W. Erythropoietin biology in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(2), 332– 9, 2006.

- [24] Hedley, B. D., Allan, A. L., Xenocostas, A., Lacombe, C., Mayeux, P., Arcasoy, M., Brufsky, A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(20), 6373–80, 2011.
- [25] Horiguchi, A., Asano, T., Kuroda, K., Sato, A., Asakuma, J., Ito, K., Asano, T. STAT3 inhibitor WP1066 as a novel therapeutic agent for renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 102(11), 1592–1599, 2010.
- [26] Iwamaru, A., Szymanski, S., Iwado, E., Aoki, H., Yokoyama, T., Fokt, I., ... Kondo, Y. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both in vitro and in vivo. *Oncogene*, 26(17), 2435–2444, 2007.
- [27] Iwasa, T., Okamoto, I., Suzuki, M., Nakahara, T., Yamanaka, K., Hatashita, E., Nakagawa, K. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(20), 6496–504, 2008.
- [28] Jelkmann, W., Bohlius, J., Hallek, M., Sytkowski, A. J., Hodges, V. M., Rainey, S., et al. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67(1), 39–61, 2008.
- [29] Johnston, P. A., & Grandis, J. R. (2011). STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges. *Molecular Interventions*, 11(1), 18–26, 2011.
- [30] Judd, L. M., Menheniott, T. R., Ling, H., Jackson, C. B., Howlett, M., Kalantzis, A., Giraud, A. S. (2014). Inhibition of the JAK2/STAT3 Pathway Reduces Gastric Cancer Growth In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 9(5), e95993, 2014.

- [31] Kelly, R. J., Thomas, A., Rajan, A., Chun, G., Lopez-Chavez, A., Szabo, E., Giaccone, G. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 24(10), 2601–2606, 2013.
- [32] Khan, Z., Khan, A. A., Yadav, H., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22, 8, 2017.
- [33] Lee, H.-T., Xue, J., Chou, P.-C., Zhou, A., Yang, P., Conrad, C. A., Huang, S. Stat3 orchestrates interaction between endothelial and tumor cells and inhibition of Stat3 suppresses brain metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(12), 10016–10029, 2015.
- [34] Leo, C., Horn, L.-C., Rauscher, C., Hentschel, B., Liebmann, A., Hildebrandt, G., & Hockel, M. Expression of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Cervical Cancer and Relationship to Survival, Hypoxia, and Apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 12(23), 6894–6900, 2006.
- [35] Li, F. Chapter Five – Discovery of Survivin Inhibitors and Beyond: FL118 as a Proof of Concept. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 305, pp. 217–252), 2013.
- [36] Lopez, T. V., Lappin, T. R. J., Maxwell, P., Shi, Z., Lopez-Marure, R., Aguilar, C., & Rocha-Zavaleta, L. Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *International Journal of Cancer*, 129(11), 2566–2576, 2011.
- [37] Martin-Hirsch, P. L., & Wood, N. J. Cervical cancer. *BMJ Clinical Evidence*, 2011.

- [38] Madden, T., Johansen, M., Culotta, K. S., Heimberger, A., Fokt, I., Conrad, C., & Priebe, W. Abstract 3783: Pharmacokinetics and CNS biodistribution of WP1066, a novel small molecule inhibitor of STAT-3 phosphorylation. *Cancer Research*, 72(8 Supplement), 3783–3783, 2012.
- [39] Mulcahy, L. The erythropoietin receptor. *Seminars in Oncology*, 28, 19– 23, 2001.
- [40] Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518–527, 2003.
- [41] Nakahara, T., Takeuchi, M., Kinoyama, I., Minematsu, T., Shirasuna, K., Matsuhisa, A., Sasamata, M. YM155, a Novel Small-Molecule Survivin Suppressant, Induces Regression of Established Human Hormone-Refractory Prostate Tumor Xenografts. *Cancer Research*, 67(17), 8014–8021, 2007.
- [42] Peery, R. C., Liu, J.-Y., & Zhang, J.-T. Targeting survivin for therapeutic discovery: past, present, and future promises. *Drug Discovery Today*, 2017.
- [43] Pennati, M., Folini, M., & Zaffaroni, N. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(4), 463–476, 2008.
- [44] Rauch, A., Hennig, D., Schäfer, C., Wirth, M., Marx, C., Heinzl, T., Krämer, O. H. Survivin and YM155: How faithful is the liaison? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(2), 202–220, 2014.
- [45] Ramírez de Arellano, A., Lopez-Pulido, E. I., Martínez-Neri, P. A., Estrada Chávez, C., González Lucano, R., Fafutis-Morris, M., Pereira-Suárez, A. L. STAT3 activation is

required for the antiapoptotic effects of prolactin in cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, 15, 83, 2015.

[46] Santoni, M., Massari, F., Del Re, M., Ciccarese, C., Piva, F., Principato, G., Cascinu, S. Investigational therapies targeting signal transducer and activator of transcription 3 for the treatment of cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(6), 809–824, 2015.

[47] Schaffer, A., Koushik, A., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Mansour, N., Arseneau, J., Biomarkers of Cervical Cancer Risk Study Team. Insulin-like Growth Factor-I and Risk of High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(4), 716–722, 2007.

[48] Siddiquee, K., Zhang, S., Guida, W. C., Blaskovich, M. A., Greedy, B., Lawrence, H.R., Turkson, J. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), 7391–6, 2007.

[49] Sinclair, A., & Elliott. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics: Targets and Therapy*, Volume 6, 163, 2012.

[50] Siveen, K. S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A. P., Bishayee, Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(2), 136–154, 2014.

[51] Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287(16), 2114–9, 2002.

- [52] Souhami, L., Corns, R., Duclos, M., Portelance, L., Bahoric, B., & Stanimir, G. Long-term results of high-dose rate brachytherapy in cervix cancer using a small number of fractions. *Gynecologic Oncology*, 97(2), 508–513, 2005.
- [53] Szenajch, J., Wcislo, G., Jeong, J.-Y., Szczylik, C., & Feldman, L. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(1), 82–95, 2010.
- [54] Nakahara, T., Kita, A., Yamanaka, K., Mori, M., Amino, N., Takeuchi, M., Sasamata, M. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Science*, 102(3), 614–621, 2011.
- [55] Tang, Y. J., Sun, Z. L., Wu, W. G., Xing, J., He, Y. F., Xin, D. M., & Han, P. Inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) suppresses ovarian cancer growth, migration and invasion and enhances the effect of cisplatin in vitro. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 2450–2460, 2015.
- [56] Todaro, M., Turdo, A., Bartucci, M., Iovino, F., Dattilo, R., Biffoni, M., ... Ronchi, A. (2013). Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy. *Cancer Research*, 73(21), 6393–6400, 2013.
- [57] Vázquez-Mellado. Efecto de la eritropoyetina recombinante humana sobre la muerte de células de carcinoma cervical inducida por quimiofármacos de distinta acción. *Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM*, 2009.
- [58] Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Muñoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, 189(1), 12–19, 1999.

- [59] F Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., & Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 736–746, 2014.
- [60] Yue, P., & Turkson, J. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(1), 45–56, 2009.
- [61] Zhao, M., Jiang, B., & Gao, F.-H. Small Molecule Inhibitors of STAT3 for Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 18(26), 4012–4018, 2011.
- [62] Zielinski, R., Rusin, A., Priebe, A., Arumugam, J., Venugopal, R., Skora, S., Priebe, W. A. Abstract 3806: STAT3/STAT5 blockade by WP1066 inhibits ovarian cancer cell proliferation and induces cell death. *Cancer Research*, 74(19 Supplement), 3806–3806, 2014.
- [63] Zhang, Q., Zhang, C., He, J., Guo, Q., Hu, D., Yang, X., Ma, J. STAT3 inhibitor stattic enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, 36(3), 2135–2142, 2015.
- [64] Zhou, X., Ren, Y., Liu, A., Jin, R., Jiang, Q., Huang, Y., Zhang, L. (2015). WP1066 Sensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to Cisplatin by Targeting STAT3/miR-21 axis. *Scientific Reports*, 4(1), 7461, 2015.
- [65] Zielinski, R., Rusin, A., Madden, T., Conrad, C., Johansen, M., Fokt, I., Priebe, W. Abstract 4540: Development of orally bioavailable formulation of WP1066 and its evaluation *in vivo*. *Cancer Research*, 75(15 Supplement), 4540–4540, 2015.

XIII. Apéndice

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g

Se disolvieron los componentes en un litro de agua destilada, se ajusto el pH a 7.4, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos y se almaceno en refrigeración a 4 °C.

Verseno

Tris Base	3.04g
NaCl	8.0g
KCl	0.4g
EDTA	0.4g

Se disolvieron los componentes en un litro de agua destilada, se ajusto el pH a 7.7, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos y se almaceno en refrigeración a 4 °C.

RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay buffer)

150mM	NaCl
1.0%	Triton X-100
0.5%	Desoxicolato de sodio
50mM	Tris HCl

Se disolvieron los componentes en 250 mL de agua destilada, se ajusto el pH a 8.0 y se almaceno en refrigeración a 4 °C.

TBS-Tween al 0.1%

Trizma HCl	1.2g
NaCl	4g
Tween 20	500µL

Se disolvieron los componentes en 500 mL de agua destilada, se ajusto el pH a 7.6 y se almaceno en refrigeración a 4 °C.