



universidad  
de león

Departamento de Ciencias Biomédicas  
Área de Fisiología

---

***Potencial terapéutico de la melatonina en el carcinoma hepatocelular: estudios in vivo e in vitro de los mecanismos moleculares implicados***

---



Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria Diana Isabel Sánchez  
Paniagua para la obtención del título de Doctor por la Universidad de León

León, 2018





universidad  
de león

## **INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

**(Art. 13.2 del R.D. 99/2011)**

La Dra. Dña. María Jesús Tuñón González y la Dra. Dña. Irene Crespo Gómez, Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Potencial terapéutico de la melatonina en el carcinoma hepatocelular: estudios *in vivo* e *in vitro* de los mecanismos moleculares implicados.” realizada por la Lcda. Dña. Diana Isabel Sánchez Paniagua, en el programa de doctorado Biomedicina y Ciencias de la Salud, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al Art. 13.2 del R.D. 99/2011, en León a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

Las directoras de la Tesis Doctoral

**Fdo: Dra. María Jesús Tuñón González**

**Fdo: Dra. Irene Crespo Gómez**





universidad  
de león

## ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

(Art. 13.2 del R.D.99/2011)

La Comisión Académica del programa de doctorado en Biomedicina y Ciencias de la Salud en su reunión celebrada el día \_\_\_ de \_\_\_\_ de 2018 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Potencial terapéutico de la melatonina en el carcinoma hepatocelular: estudios *in vivo* e *in vitro* de los mecanismos moleculares implicados”, dirigida por las Dras. Dña. María Jesús Tuñón González y Dña. Irene Crespo Gómez, y elaborada por la Lcda. Dña. Diana Isabel Sánchez Paniagua, cuyo título en inglés es el siguiente “Therapeutic potential of melatonin in hepatocellular carcinoma: *in vivo* and *in vitro* studies of the molecular pathways implicated”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Art. 13.2 del R.D. 99/2011, en León a \_\_\_ de \_\_\_\_ de 2018.

VºBº

La Presidenta de la Comisión Académica,      La Secretaria del programa de doctorado,

Fdo.: Dra. María Jesús Tuñón González

Fdo.: Dra. María José Cuevas González



*Durante la realización de la presente tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos en revistas científicas:*

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2018. Melatonin modulates dysregulated circadian clocks in mice with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Pineal Research*. 65:e12506. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2018. Melatonin attenuates dysregulation of the circadian clock pathway in mice with CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis and human hepatic stellate cells. *Frontiers in Pharmacology*. 9:556. Factor de impacto: 4,4; 33/257 en Farmacología y Farmacia (Q1).

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, I. Crespo, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2017. Melatonin prevents deregulation of the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Journal of Pineal Research*. 62:e12369. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, M. Álvarez, M. J. Tuñón, J. González-Gallego. 2017. Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells. *Biofactors*. 43:272-282. Factor de impacto: 3,236; 113/290 en Bioquímica y Biología Molecular (Q2).

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2017. Sphingosine 1-phosphate signaling as a target in hepatic fibrosis therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 8:579. Factor de impacto: 4,4; 33/257 en Farmacología y Farmacia (Q1).

J. Ortiz de Urbina, B. San-Miguel, A. Vidal-Casariago, I. Crespo, D. I. Sánchez, J. L. Mauriz, J. M. Culebras, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. 2017. Effects of oral glutamine on inflammatory and autophagy responses in cancer patients treated with abdominal radiotherapy: a pilot randomized trial. *International Journal of Medical Sciences*. 14:1065-1071. Factor de impacto: 2,399; 36/155 en Medicina, General e Interna (Q1).

I. Crespo, B. San Miguel, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, M. Álvarez, J. González Gallego, M. J. Tuñón. 2016. Melatonin inhibits the sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *Journal of Pineal Research*. 61-2:168-176. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).

B. San Miguel, I. Crespo, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, J. Ortiz de Urbina, M. J. Tuñón, J. González-Gallego. 2015. Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *Journal of Pineal Research*. 59:151-162. Factor de impacto: 10,391; 3/84 en Fisiología (Q1).



*Parte de los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral han sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos con publicación de resúmenes en revistas científicas:*

D. I. Sánchez, B. González-Fernández, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin modulates dysregulated circadian clocks in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin attenuates dysregulation of the circadian clock pathway in mice with CCl<sub>4</sub>-induced fibrosis and human hepatic stellate cells. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

I. Crespo, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Mitochondrial mediated antiviral immunity in a viral model of acute liver failure. XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 18-21 Septiembre 2018, Cádiz.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2018.

D. I. Sánchez, B. San-Miguel, I. Crespo, B. González-Fernández, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina regula las alteraciones de los genes *Clock* en un modelo animal de hepatocarcinoma. 43º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:36.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina regula la alteración de los ritmos circadianos mediante la inhibición del receptor nuclear Rev-erb $\alpha$  en modelos *in vivo* e *in vitro* de fibrosis hepática. 43º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:38.

I. Crespo, B. González-Fernández, D. I. Sánchez, B. San-Miguel, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Efecto de la melatonina en la respuesta inmune innata y la mitofagia en un modelo animal de fallo hepático agudo. 43º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 21-23 Febrero 2018, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2018; 41:40.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, D. Martín-Sánchez, F. Jorquera, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Effect of melatonin on the circadian clock pathway in liver fibrosis and progression to hepatocarcinoma. 53º *Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)*. 11-15 Abril 2018, París.

Journal of Hepatology, 2018; 68:S133.

D. I. Sánchez, I. Crespo, B. González-Fernández, B. San-Miguel, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin regulates the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 13-16 Septiembre 2016, Zaragoza.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2016; 72(Suppl1):S34.

I. Crespo, B. San-Miguel, V. M. López, D. I. Sánchez, B. González-Fernández, J. L. Mauriz, M. Almar, J. Ortiz de Urbina, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Protocatechuic acid prevents inflammation and fibrosis, and regulates the sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphatesignaling pathway in an animal model of colitis. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF). 13-16 Septiembre 2016, Zaragoza.

Journal of Physiology and Biochemistry, 2016; 72(Suppl1):S74.

D. I. Sánchez, B. San-Miguel, I. Crespo, B. González-Fernández, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Efectos de la melatonina sobre las respuestas, inflamatoria y proliferativa en un modelo animal de hepatocarcinoma. 41º Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 17-19 Febrero 2016, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2016; 39:32.

B. González-Fernández, B. San-Miguel, I. Crespo, D. I. Sánchez, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La melatonina reduce la respuesta inflamatoria y modula la respuesta inmune y la vía de los esfingolípidos en un modelo animal de fibrosis hepática. 41º Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). 17-19 Febrero 2016, Madrid.

Gastroenterología y Hepatología, 2016; 39:32.

B. González-Fernández, D. I. Sánchez, I. Crespo, B. San-Miguel, J. Ortiz de Urbina, M. Álvarez, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. Melatonin impairs the inflammatory response and inhibits the sphingosine kinase signaling pathway in an animal model of liver fibrosis. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). 13-17 Abril 2016, Barcelona.

Journal of Hepatology, 2016; 64:S705.

B. San-Miguel, D. I. Sánchez, I. Crespo, J. Ortiz de Urbina, J. M. Culebras, J. González-Gallego, M. J. Tuñón. La glutamina reduce la inflamación y modula la respuesta autofágica en pacientes con cáncer pélvico abdominal tratados con radioterapia. XXX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE). 15-16 Octubre 2015, Alicante.

Nutrición Hospitalaria, 2015; 31:115.



## *Financiación*

---

Durante la ejecución de la presente Tesis Doctoral, Diana Isabel Sánchez Paniagua ha sido beneficiaria de una beca predoctoral concedida por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).





- *¿Quién soy?*

- *Para el universo no soy nada, para mí lo soy todo.*

*Miguel de Unamuno.*





***A tí***



## **Agradecimientos**

*A María Jesús Tuñón González y a Irene Crespo Gómez, directoras de esta tesis, por creer en mí, por sus consejos y ayuda durante este período de mi vida.*

*A Marcelino Álvarez Martínez por acercarme a este mundo, la investigación biomédica. Por creer en mí como alumna y, finalmente, como veterinaria. Todo es poco para agradecer tu confianza, preocupación constante y cariño depositados en mí.*

*A la Asociación Española contra el Cáncer (AECC) por hacer posible esta tesis doctoral. Y muy en especial al Dr. Serafín de Abajo Olea y al Dr. Estanislao de Luis Calabuig, por su gran labor en la AECC de León y por su incesante apoyo a la investigación en la lucha contra el cáncer.*

*Al área de Fisiología Animal del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de León, y a toda esa gente que ha formado parte de mi día a día en el IBIOMED, por haberme enseñado a investigar.*

*A Irene Crespo Gómez, por sus enseñanzas como directora de tesis. Por su apoyo, confianza y amistad. Siempre sonreiré al recordar la expresión: “¡Primera noticia!”, tras repetir algo que ya te habíamos contado. Gracias por esos momentos irrepetibles.*

*A Beatriz San-Miguel de Vega, por haberme transmitido sus conocimientos, por su ayuda y comprensión. Y por estar ahí en los malos momentos.*

*A Bárbara González Fernández, compañera y amiga. Por los buenos momentos juntas, y los muchos que nos esperan. Y por ese congreso pre-tesis en Cádiz que no olvidaré.*

*A Sara que, aunque la conocí en el último periodo de tesis, ha sido más que una compañera, una amiga. Siempre recordaré la alegría con la que llegaba cada mañana, y que contagiaba al resto. Me quedo con su frase: "Chuchí, ¡que esta vida no es la de cursillo!"*

*A Anna y a Raquel, por todo lo que me enseñasteis, vuestra paciencia cuando no comprendía cosas básicas para vosotras, y por la compañía a deshoras en el laboratorio.*

*A Néstor, Carolina y Flavia. No podía olvidarme de vosotros. Néstor, tus saludos de cada mañana y tus visistas al despacho para tomar café, no los olvido. Y vosotras, chicas, se que llegaréis alto porque he visto en vosotras una vocación incondicional por la investigación.*

*A Carlos, por darme la fuerza necesaria para iniciar, continuar, y acabar esta tesis. Gracias por quererme.*

*A mis padres por estar, ahí, SIEMPRE. Gracias por vuestro amor, ayuda y comprensión. Espero estéis orgullosos de este logro que es tanto mío como vuestro.*

**GRACIAS**

---

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Tablas.....</b>	<b>V</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1    Carcinoma hepatocelular (CHC).....	7
2.1.1    Epidemiología .....	7
2.1.2    Etiología, factores de riesgo y carcinogénesis.....	8
2.1.3    Presentación clínica, diagnóstico y tratamiento .....	11
2.1.4    Modelos experimentales para el estudio del CHC .....	16
2.2    Procesos celulares involucrados en el CHC.....	17
2.2.1    Metástasis.....	17
2.2.2    Angiogénesis.....	18
2.2.3    Hipoxia .....	20
2.3    Mecanismos moleculares implicados en el CHC.....	22
2.3.1    Vías de señalización asociadas a daño hepático .....	22
2.3.2    Vía de los esfingolípidos .....	30
2.3.3    Otros mecanismos: estrés del retículo endoplasmático (RE), autofagia y apoptosis .....	35
2.4    Ritmos circadianos .....	48
2.4.1    Genes reloj y mecanismo molecular del reloj circadiano.....	50
2.4.2    Genes reloj y cáncer .....	52
2.4.3    Reloj circadiano y ciclo celular.....	53

2.5	La melatonina.....	55
2.5.1	Síntesis, metabolismo y regulación .....	56
2.5.2	Funciones.....	59
2.5.3	Mecanismos de acción .....	60
2.5.4	Melatonina y cáncer .....	62
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
4.1	Material.....	71
4.2	Soluciones .....	72
4.3	Animales.....	72
4.4	Líneas celulares .....	73
4.5	Diseño experimental.....	73
4.6	Métodos analíticos.....	76
4.6.1	Análisis bioquímicos .....	76
4.6.2	Ensayo de proliferación celular .....	76
4.6.3	Silenciamiento con ARN de interferencia (ARNip) .....	76
4.6.4	Estudio histológico.....	76
4.6.5	Estudio inmunohistoquímico.....	77
4.6.6	Obtención de homogeneizado total.....	78
4.6.7	Obtención de las fracciones citosólica y nuclear.....	79
4.6.8	Concentración de proteína .....	79
4.6.9	Western blot.....	80
4.6.10	Microscopía electrónica de transmisión .....	83
4.6.11	Extracción, purificación y cuantificación del ARN .....	84
4.6.12	Tratamiento del ARN con ADN-asas.....	85

4.6.13	Reacción de la transcriptasa inversa .....	86
4.6.14	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-qPCR) .....	87
4.6.15	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	91
4.6.16	Tratamiento estadístico.....	91
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
5.1	Efecto de la administración de melatonina sobre el daño hepático en el modelo animal de CHC inducido por DEN .....	93
5.1.1	Efecto de la melatonina sobre marcadores séricos de daño hepático .....	93
5.1.2	Efecto de la melatonina sobre las características macroscópicas y microscópicas hepáticas.....	94
5.2	Efecto de la administración de melatonina sobre diferentes mecanismos y vías de señalización en el modelo animal de CHC inducido por DEN.....	97
5.2.1	Efecto de la melatonina sobre proteínas reguladoras del ciclo celular, la proliferación, y la apoptosis.....	101
5.2.2	Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica .....	106
5.2.3	Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE .....	110
5.2.4	Efecto de la melatonina sobre el eje esfingosina quinasa (SphK)/esfingosina 1-fosfato (S1P), y otras vías de señalización relacionadas .....	112
5.3	Efecto de la administración de melatonina en la regulación del ritmo circadiano en el modelo animal de CHC inducido por DEN.....	123
5.4	Efecto de la administración de melatonina en la regulación del ritmo circadiano en células Hep3B .....	135
5.4.1	Efecto de la administración de melatonina y SR9009 sobre la proliferación de células Hep3B .....	135

5.4.2	Efecto de la administración de melatonina sobre la apoptosis y la proliferación, tras el silenciamiento génico de BMAL1, en células Hep3B.....	138
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>141</b>
6.1	Efecto de la administración de la melatonina sobre el daño hepático y la progresión tumoral en el modelo animal de CHC inducido por DEN.....	144
6.2	Efecto de la melatonina sobre el eje esfingosina quinasa (SphK)/esfingosina 1-fosfato (S1P), y otras vías de señalización relacionadas, en el modelo animal de CHC inducido por DEN .....	145
6.3	Efecto de la melatonina sobre la regulación del ritmo circadiano en el modelo animal de CHC inducido por DEN y en células Hep3B.....	150
6.3.1	Efecto de la melatonina sobre el ciclo celular y la apoptosis, y su relación con el ritmo circadiano.....	153
6.3.2	Efecto de la melatonina sobre la autofagia y su relación con el ritmo circadiano .....	154
6.3.3	Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y su relación con el ritmo circadiano.....	156
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>



<b>Figura 1.</b> Factores de riesgo y mecanismos moleculares implicados en la hepatocarcinogénesis.....	11
<b>Figura 2.</b> Estadificación BCLC y protocolo de tratamiento.....	14
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B.....	24
<b>Figura 4.</b> Cascada de fosforilación de la vía Ras/MAPKs.....	26
<b>Figura 5.</b> Activación de la subunidad catalítica de PI3K (p110) y fosforilación de AKT.....	28
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la activación de JAK-STAT y translocación al núcleo.....	30
<b>Figura 7.</b> Vía de señalización de la S1P. Enzimas que participan en la síntesis, el transporte y la degradación de S1P.....	32
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la UPR.....	36
<b>Figura 9.</b> Diferentes tipos de autofagia.....	39
<b>Figura 10.</b> Circuito molecular y vías de señalización que regulan la autofagia.....	41
<b>Figura 11.</b> Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	46
<b>Figura 12.</b> Mecanismo molecular del reloj circadiano.....	52
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática del ciclo celular.....	54
<b>Figura 14.</b> Biosíntesis de la melatonina.....	57
<b>Figura 15.</b> Estimulación o inhibición de la síntesis de melatonina.....	58

<b>Figura 16.</b> Diseño y grupos experimentales .....	75
<b>Figura 17.</b> Imágenes representativas de la histopatología hepática .....	95
<b>Figura 18.</b> Imágenes representativas de los hígados a las 40 semanas .....	95
<b>Figura 19.</b> Expresión relativa de ARNm de IL-6 .....	97
<b>Figura 20.</b> Expresión relativa de ARNm de HGF y c-Met .....	98
<b>Figura 21.</b> Expresión relativa de ARNm de PDGF- $\beta$ y PDGFR- $\beta$ .....	99
<b>Figura 22.</b> Expresión relativa de ARNm de VEGF y CD105 .....	100
<b>Figura 23.</b> Expresión proteica de VEGF y VEGFR-2 .....	100
<b>Figura 24.</b> Expresión proteica de PCNA, Ciclina D1, Ciclina E, CDK4 y CDK6 .....	102
<b>Figura 25.</b> Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de Ki67 .....	103
<b>Figura 26.</b> Expresión proteica de p21 y p53 .....	104
<b>Figura 27.</b> Expresión proteica de PARP1/2, Bax y Bcl2 .....	105
<b>Figura 28.</b> MET de las secciones hepáticas de los diferentes grupos de estudio .....	108
<b>Figura 29.</b> Expresión proteica de la forma fosforilada de Atg13, Beclina-1, LC3-I/II, p62/SQTM1, LAMP-2, y p-mTOR .....	109
<b>Figura 30.</b> Expresión proteica de HSP90, HSP70 y GRP78 .....	111
<b>Figura 31.</b> Expresión relativa de ARNm de SphK1 y SphK2 .....	113
<b>Figura 32.</b> Expresión proteica de SphK1 y SphK2 .....	113
<b>Figura 33.</b> Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de SphK1 .....	114
<b>Figura 34.</b> Nivel de S1P en homogeneizados de hígado .....	115
<b>Figura 35.</b> Expresión relativa de ARNm de S1p1, S1p2 y S1p3 .....	116
<b>Figura 36.</b> Expresión proteica de S1P1, S1P2 y S1P3 .....	117

<b>Figura 37.</b> Expresión relativa de ARNm de SGLP1 .....	118
<b>Figura 38.</b> Expresión proteica de SGLP1 .....	119
<b>Figura 39.</b> Expresión proteica de las subunidades de PI3K, p110 y p85, AKT, p-AKT, mTOR y p-mTOR.....	120
<b>Figura 40.</b> Expresión proteica de las subunidades de NF- $\kappa$ B, p65 y p50.....	121
<b>Figura 41.</b> Expresión proteica de STAT3, p-STAT3, ERK, p-ERK, p38 y p-p38.....	122
<b>Figura 42.</b> Expresión relativa de ARNm de Clock, Bmal1 y Npas2 .....	124
<b>Figura 43.</b> Expresión proteica de CLOCK y BMAL1 .....	125
<b>Figura 44.</b> Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de BMAL1.....	126
<b>Figura 45.</b> Expresión relativa de ARNm de Per1, Per2, Per3 y Cry1.....	127
<b>Figura 46.</b> Expresión relativa de ARNm de CK1 $\epsilon$ .....	127
<b>Figura 47.</b> Expresión relativa de ARNm de Rev-erb $\alpha$ , Rev-erb $\beta$ y Rora.....	129
<b>Figura 48.</b> Expresión proteica de REV-ERB $\alpha$ , REV-ERB $\beta$ y ROR $\alpha$ .....	130
<b>Figura 49.</b> Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de REV-ERB $\alpha$ .....	131
<b>Figura 50.</b> Expresión relativa de ARNm de Sirt1.....	132
<b>Figura 51.</b> Expresión relativa de ARNm de MT1.....	133
<b>Figura 52.</b> Expresión relativa de ARNm de Hif-1 $\alpha$ y Hif-2 $\alpha$ .....	134
<b>Figura 53.</b> Expresión relativa de ARNm de Rev-erb $\alpha$ , Rev-erb $\beta$ , Bmal1 y Clock.....	136
<b>Figura 54.</b> Expresión proteica de Ciclina D1 y c-Myc.....	137
<b>Figura 55.</b> Respuesta proliferativa en células Hep3B.....	137

<b>Figura 56.</b> Confirmación del silenciamiento de BMAL1 .....	138
<b>Figura 57.</b> Expresión proteica de Bax, Caspasa 3 activa y PARP1/2.....	138
<b>Figura 58.</b> Respuesta proliferativa en células Hep3B.....	139

<b>Tabla 1.</b> Composición de los diferentes geles de separación .....	81
<b>Tabla 2.</b> Composición del gel de concentración.....	82
<b>Tabla 3.</b> Secuencias específicas de los iniciadores utilizados para la RT-qPCR por Syber Green.....	89
<b>Tabla 4.</b> Sondas específicas utilizadas para la RT-qPCR por <i>Taqman</i> .....	90
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones hepáticas de ALT y AST .....	94
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la administración de melatonina sobre los cambios histológicos hepáticos tras la administración de DEN.....	96



5-FU	5-Fluorouracilo
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferasa
ADD	Aminoácido aromático descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFP	Alfa-fetoproteína
AKT	Proteína quinasa B
ALT	Alanina aminotransferasa
AMC	Autofagia mediada por chaperonas
AMPc	Adenina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
APAF-1	Factor 1 activador de proteasas apoptóticas
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Enzima endorribonucleasa
ARNip	ARN pequeño de interferencia
ARNm	ARN mensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
ATF6	Factor activador de transcripción 6
Atg	Gen relacionado con la autofagia
Bcl-2	Gen del linfoma de células B2
BIP	Proteína de unión a inmunoglobulinas
BMAL1	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo
BNIP3	Proteína de interacción con Bcl-2
BSA	Albúmina sérica bovina
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer

cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CHC	Carcinoma hepatocelular
CK1ε	Caseína quinasa 1 épsilon
CLOCK	Del inglés, <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CRY	Criptocromo
DEN	Dietilnitrosamina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMS	N, N-dimetilesfingosina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilén glicol tetracético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ERAD	Degradación de proteínas asociada al retículo endoplasmático
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GRP	Proteína regulada por glucosa
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF	Factor inducible por hipoxia
HIOMT	Hidroxindol O-metiltransferasa
HRE	Elementos de respuesta hipóxica
HRP	Peroxidasa de rábano picante



HS	Choque térmico
HSP	Proteínas de choque térmico
i.p.	Vía intraperitoneal
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
I $\kappa$ B	Inhibidor de kappa B
IKK	I $\kappa$ B quinasa
IL	Interleucina
IRE1	Enzima dependiente de inositol 1
JAK2	Quinasa Janus 2
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun
LAMP	Proteína de membrana lisosomal
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3
LPP1-3	Fosfatasa de fosfolípidos 1-3
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MAPKK	MAPK quinasa
MAPKKK	MAPKK quinasa
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia electrónica de transmisión
miARN	microARN
MMP	Metaloproteinasas
MT	Receptor de melatonina
mTOR	Proteína diana de rapamicina en células de mamífero
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NF- $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear Kappa B
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NPAS2	Del inglés, <i>Neuronal PAS domain-containing protein 2</i>
NR1D	Receptor nuclear subfamilia 1, grupo D
NSQ	Núcleo supraquiasmático

OMS	Organización Mundial de la Salud
p62/SQSTM1	Proteína p62/sequestrosoma 1
PAR-1	Receptor 1 activado por proteasas
PBS	Tampón fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	Proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol
PE	Fosfatidiletanolamina
PER	Periodo
PERK	Proteína quinasa de retículo endoplasmático activada por estrés
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinasa
PIP <sub>2</sub>	Fostatidil-inositol difosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidil-inositol trifosfato
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVDF	Di-fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROR $\alpha$	Receptor nuclear de ácido retinoico alfa
RQ1	ADNasa libre de ARNasa
RT-qPCR	Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
S1P	Esfingosina 1-fosfato
S1P1-5	Receptores S1P 1-5
S1PL	S1P liasa
SPP1-2	Fosfatasas S1P 1-2
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIRT1	Histona deacetilasa sirtuina 1
SphK	Esfingosina quinasa
SSF	Solución salina fisiológica
STAT3	Activador de la transcripción 3
TAC	Tomografía axial computarizada
TEMED	Tetrametiletildiamina

TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor de TNF de tipo 1
TPH	Triptófano hidrolasa
ULK1	Quinasa 1 tipo Unc-51
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del VEGF
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana



## ***1 RESUMEN***

---



El carcinoma hepatocelular (CHC) constituye el principal tumor primario de hígado a nivel mundial. Es una de las neoplasias con mayor prevalencia, constituyendo entre el 75 y 85% de todos los casos de cáncer hepático. Aunque es el quinto y noveno tipo de cáncer más frecuente en hombres y mujeres respectivamente, se posiciona en segundo y sexto lugar como causa de muerte asociada a cáncer. La detección y diagnóstico del CHC son realmente complicados debido a la inespecificidad de los síntomas que presenta y a la tardía aparición de aquellos que indican fallo hepático. En la actualidad, esta enfermedad tiene un pobre pronóstico y los pacientes con CHC o cirrosis avanzada presentan tasas de supervivencia de 2 años en menos del 32% de los casos. Los tratamientos que mejor pronóstico presentan son la extirpación quirúrgica y el trasplante de hígado; sin embargo, la efectividad de dichos procedimientos solamente se encuentra en pacientes con un proceso tumoral poco desarrollado y diagnosticado de forma temprana. Además, la quimioterapia convencional no es realmente efectiva en pacientes con tumores no extirpables mediante cirugía.

Un mayor entendimiento del proceso de carcinogénesis se torna crucial para identificar las posibles dianas terapéuticas y definir terapias alternativas o que potencien los tratamientos convencionales. A pesar de que no existe una única vía de señalización responsable del desarrollo del CHC, hay evidencias que señalan que ciertas cascadas de señalización se encuentran alteradas con mayor frecuencia y, por tanto constituirían importantes dianas para el diseño de nuevas drogas.

Por todo ello, y basándonos en el creciente interés farmacológico de la melatonina como agente anticancerígeno y oncostático, el principal objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de la melatonina en un modelo animal experimental de CHC desarrollado en ratones tras la administración de dietilnitrosamina (DEN) analizando las principales vías de señalización implicadas en su desarrollo, así como los mecanismos implicados en los efectos oncostáticos de la hormona. Además, se empleó la línea de células de hepatocarcinoma humano (Hep3B), para así profundizar en los distintos mecanismos moleculares estudiados y, sobre todo, demostrar si los resultados obtenidos en ratones pueden ser extrapolables al hombre.

La administración de DEN indujo daño hepático y CHC, demostrado por un aumento en la expresión de los marcadores séricos de daño hepático, y por las características microscópicas y macroscópicas evaluadas. Además, el desarrollo y la progresión del CHC, a lo largo de los diferentes periodos del estudio, se acompañó de una expresión alterada de los principales mediadores y vías de señalización estudiadas.

La melatonina moduló diferentes vías de señalización alteradas en el CHC, e implicadas en el daño y la progresión tumoral, tales como la proliferación, la diferenciación y la angiogénesis. Además, la melatonina reguló diversas proteínas involucradas en el ciclo celular, la apoptosis, la respuesta autofágica y el estrés de retículo endoplasmático (RE). Los efectos de la melatonina también se asociaron a la regulación de la vía de señalización de la esfingosina quinasa/esfingosina 1-fosfato (SphK/S1P), así como otras vías relacionadas, tales como la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Además, se demostró que la melatonina modula los ritmos circadianos alterados en el modelo animal de CHC inducido por DEN, y en células Hep3B, lo cual podría contribuir a los efectos beneficiosos del indol en la regulación del desarrollo y la progresión tumoral.

Así, en el presente estudio se concluye que los efectos de la melatonina sobre diferentes vías de señalización implicadas en la hepatocarcinogénesis, en el modelo animal de CHC, así como *in vitro* en células Hep3B, junto con sus propiedades beneficiosas ya documentadas en varios tumores, y su falta de toxicidad, demuestran el potencial interés de esta molécula, al menos como adyuvante, en la terapia del CHC. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar la utilidad de esta molécula en la prevención y el tratamiento de pacientes con cáncer.



## *2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

---



## **2.1 Carcinoma hepatocelular (CHC)**

El hígado es un órgano con una amplia gama de funciones vitales como el procesado de nutrientes, la síntesis de proteínas, la producción de bilis, y la detoxificación de sustancias perjudiciales presentes en el organismo (Gumucio y Miller, 1981). Las agresiones al hígado por agentes químicos, quirúrgicos o víricos, desencadenan un proceso fisiopatológico complejo que incluye desde una simple esteatosis hepática hasta una esteatohepatitis, fibrosis hepática, cirrosis y finalmente hepatocarcinoma (Karakus y cols., 2011; Al-Harbi y cols., 2014).

### **2.1.1 Epidemiología**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece la clasificación de los tumores primarios de hígado. El hepatocarcinoma constituye la neoplasia hepática primaria más frecuente (75-85% de los casos), seguido a gran distancia por el colangiocarcinoma, el angiosarcoma y el hepatoblastoma (Bray y cols., 2018). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) posiciona el CHC como el quinto cáncer más común en hombres (550.000 casos; 7,5% del total) y el noveno en mujeres (228.000 casos; 3,4%), y como la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (746.000 muertes estimadas en 2012; 9,1% del total). Existen variaciones en la incidencia de cáncer entre las distintas áreas geográficas, principalmente asociadas a la exposición a diferentes factores de riesgo. Casi el 85% del número total de casos de cáncer hepático ocurre en regiones subdesarrolladas, con una distribución de la incidencia que varía dependiendo del sexo. En hombres se registra una mayor incidencia en el Este y Sur de Asia (31,9 y 22,2 de cada 100.000 individuos); mientras que, en mujeres, el cáncer de hígado es más frecuente en los países de Asia oriental y África occidental (Ferlay y cols., 2015). Aunque las tasas de incidencia y mortalidad son superiores en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados, la incidencia está aumentando en Europa y el Norte de África, y se está viendo reducida en China y Japón en los últimos años (Torre y cols., 2015). En Europa, también se han detectado diferencias en las tasas de mortalidad incrementándose en el Norte de Europa y viéndose reducidas en el Sur. En Estados

Unidos la mortalidad se incrementó en los años 90 y primera década de los 2000; por el contrario, en Japón la mortalidad está disminuyendo (Bertuccio y cols., 2013).

Aunque es difícil calcular los cambios futuros en la epidemiología del CHC, algunos expertos han sugerido que la incidencia global seguirá aumentando en los próximos años, a pesar de las mejoras en el control de los principales factores de riesgo asociados (Venook y cols., 2010).

### **2.1.2 Etiología, factores de riesgo y carcinogénesis**

De forma similar a otros tumores, los factores etiológicos de riesgo del CHC son muy heterogéneos y algunos han demostrado tener una fuerte asociación con el desarrollo de cáncer (El-Serag y cols., 2011).

Las infecciones crónicas causadas por los virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) son el principal factor de riesgo para el desarrollo de CHC (Saeed y cols., 2014). Las tasas de progresión a cirrosis y CHC dependen de la edad de infección, sexo, grado de replicación del virus o coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros factores (Locarnini y cols., 2015), siendo estas tasas reducidas por la prevención y el tratamiento tanto del VHB como del VHC (Singal y El-Serag, 2015). Cuando se analiza la incidencia de CHC en la población mundial, se desvela que la infección crónica por el VHB es responsable de entre un 20% y un 30% de los casos de cáncer de hígado (OMS, 2017a). En relación con el VHC, el 60-80% de la población infectada sufre una enfermedad crónica, y en estos casos el riesgo de cirrosis hepática a los 20 años es del 15-30% (OMS, 2017b). El VHC es responsable del 31% de los casos de CHC detectados en todo el mundo (Pascual y cols., 2016) y constituye la principal causa de CHC en los países occidentales (Forner y cols., 2012). Las principales formas de transmisión viral difieren entre países. Actualmente, se estima que las prácticas de inyección con instrumental contaminado en los centros de salud, la transfusión de sangre y productos sanguíneos sin analizar, o el consumo de drogas inyectables son las vías más comunes de transmisión (OMS, 2017a; 2017b).

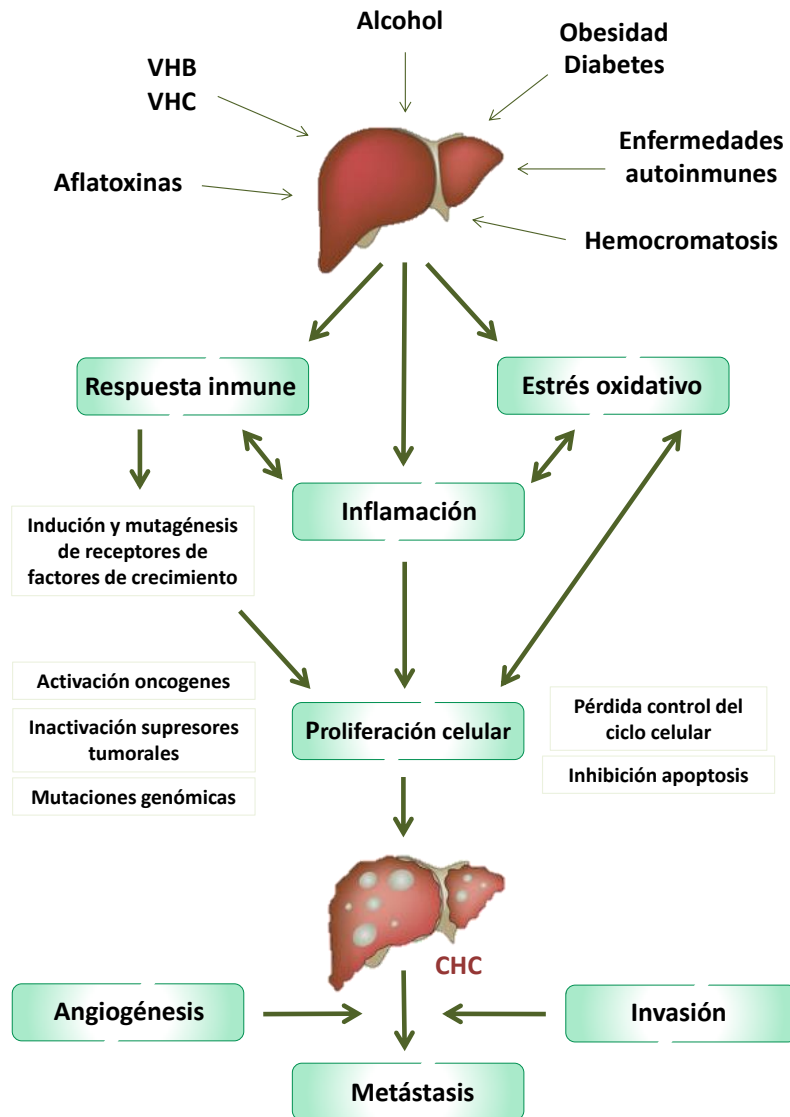
Además de las infecciones por virus, el tabaco, la aflatoxina B1, la enfermedad de hígado graso no alcohólico, la diabetes, la obesidad y la hemocromatosis también se han asociado con la hepatocarcinogénesis (Wild y Hall, 2000). Sin embargo, no solo los factores ambientales son responsables del desarrollo de CHC, también lo son diferentes enfermedades autoinmunes y trastornos metabólicos como la hepatitis autoinmune, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la deficiencia de alfa-1 antitripsina, la enfermedad de Wilson, la enfermedad de Von Gierke y la hemocromatosis (Dragani, 2010) (Figura 1).

Los mecanismos que participan en la iniciación y progresión del CHC no están completamente definidos y varían dependiendo del factor etiológico implicado aunque, en la mayoría de los casos, el CHC se desarrolla a partir de una cirrosis de fondo (Ghoury y cols., 2017). Sin embargo, está ampliamente aceptado que las alteraciones genéticas que se producen en los hepatocitos conducen a la transformación maligna y al establecimiento de CHC (Nakagawa, 2012). El cáncer fue considerado como un proceso autónomo de células, en el que la adquisición de mutaciones en oncogenes y genes supresores conducía a una mayor proliferación y menor muerte celular. Ahora se sabe que los carcinomas son órganos con un complejo microambiente el cual resulta crucial para la supervivencia, crecimiento y proliferación de las células tumorales, así como para la transición epitelio-mesénquimal y la metástasis. El microambiente del tumor define el comportamiento del mismo, no solo por el genotipo y fenotipo de las células tumorales por sí solas, sino también por las interacciones e influencias de las células que las rodean (Yang y cols., 2011a; Leonardi y cols., 2012). Durante el estado preneoplásico, hay varias interacciones entre los diferentes tipos de células tumorales en el estroma (como fibroblastos, macrófagos, leucocitos, células endoteliales, neutrófilos y células dendríticas) y componentes de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina o glicosaminoglicanos) (Schrader e Iredale, 2011). Cada una de estas células produce factores de crecimiento, citocinas, radicales libres y otros sustratos tumorigénicos que contribuyen a la iniciación y progresión del tumor (Wu y cols, 2012a). La carcinogénesis hepática, por tanto, se considera un proceso de

múltiples pasos que se inicia cuando el hígado está expuesto a la acción de compuestos tóxicos o infecciones. En estas condiciones, los hepatocitos y las células estromales responden poniendo en marcha mecanismos de supervivencia para erradicar el daño. Si el estímulo de la lesión persiste, la activación crónica de los mecanismos de compensación conduce a una inflamación mantenida y a la regeneración de los hepatocitos, lo cual se ha relacionado con un mayor riesgo de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que probablemente favorecen el desarrollo del CHC (Nakagawa, 2012). Además de la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis y la cirrosis son características comunes durante la hepatocarcinogénesis y son responsables de inducir las alteraciones genéticas mencionadas, la activación de oncogenes, la inhibición de genes supresores de tumores y la descompensación de diferentes moléculas implicadas en la regulación de estos eventos, como los microARN (miARN) o las proteínas (Aravalli y cols., 2013).

Durante la lesión hepática crónica, la fibrosis es el resultado del depósito de matriz extracelular (MEC), lo que conduce a un intercambio de oxígeno deficiente. Esta hipoxia favorece la secreción de factores proangiogénicos por las células del estroma y se induce la producción del factor inducible por hipoxia (HIF)-1 $\alpha$  (Wu y cols., 2012a). El exceso de producción de MEC y la disminución de su degradación conducen a un entorno fibrótico y estimulan el crecimiento, la supervivencia y la proliferación tumoral (Hernández-Gea y cols., 2013). Los fibroblastos asociados a tumores secretan factores que promueven el crecimiento tumoral y la angiogénesis e interaccionan con las células cancerosas (Wu y cols., 2012a; Hernández-Gea y cols., 2013). Las células inmunes, especialmente los linfocitos T infiltrantes de tumor, son importantes para la respuesta antitumoral; sin embargo, hay un predominio de células T reguladoras circulantes y de células mieloides supresoras que amortiguan la respuesta inmune (Hernández-Gea y cols., 2013). Los macrófagos asociados a tumores liberan quimiocinas y factores de crecimiento que suprimen la inmunidad antitumoral (El-Serag y Rudolph, 2007). Además, los hepatocitos tumorales son insensibles a las señales inhibitorias del crecimiento, evaden la apoptosis, poseen un potencial de replicación ilimitado, una angiogénesis aberrante, y capacidad de

invasión tisular y metástasis, características necesarias para el desarrollo del cáncer (Boyd y Reade, 1988).



**Figura 1.** Factores de riesgo y mecanismos moleculares implicados en la hepatocarcinogénesis (Modificado de Aravalli y cols., 2013).

### 2.1.3 Presentación clínica, diagnóstico y tratamiento

Las características clínicas del CHC pueden ser sutiles e inespecíficas. Los pacientes que desarrollan CHC por lo general no tienen más síntomas que los relacionados con la enfermedad hepática crónica, y la detección basada en la

insuficiencia hepática y/o deterioro físico refleja una etapa avanzada donde el tratamiento ya no es una opción (Llovet y cols., 2016). En pacientes con cirrosis, la descompensación hepática puede manifestarse por la presencia de ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, síndrome hepatorenal, hemorragia por varices gastroesofágicas y encefalopatía hepática (Barone y cols., 2013). Los pacientes que desarrollan descompensación hepática de inicio súbito en el contexto de una cirrosis deben someterse a un estudio de imagen abdominal para descartar el CHC. Es importante destacar que la detección de CHC en pacientes con cirrosis seguida de vigilancia cada 6 meses aumenta la probabilidad de diagnóstico de CHC en etapa temprana con opciones curativas. Por el contrario, el diagnóstico tardío se asocia con un mal pronóstico. Por tanto, los protocolos de detección precoz y vigilancia del CHC deben optimizarse (Gish y cols., 2012; Guy y cols., 2012).

El manejo de los pacientes con CHC se complica por la presencia de enfermedad hepática subyacente. Además, es posible que las diferentes etiologías del CHC y sus efectos sobre el hígado afecten a la respuesta y resultado del tratamiento. El tratamiento de pacientes con CHC, a menudo, requiere una atención multidisciplinaria con la participación de hepatólogos, radiólogos e intervencionistas, cirujanos, patólogos, médicos y oncólogos quirúrgicos (Siddique y cols., 2017).

El diagnóstico del CHC se basa en procedimientos radiológicos y de laboratorio. La ecografía es la principal prueba de diagnóstico empleada para la vigilancia de lesiones hepáticas de pacientes en riesgo. Permite la detección de tumores pequeños en fases tempranas, e incluso puede ser útil en la identificación de anomalías estructurales hepáticas, así como en la detección de un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos hepáticos en etapas avanzadas (Attwa y El-Etreby, 2015). La ecografía con contraste mejora la detección con una alta sensibilidad y especificidad, aunque parece depender del tamaño del tumor y de otros factores que no afectan a otras técnicas como la tomografía axial computarizada (TAC) o la resonancia magnética nuclear (RMN) (Martie y cols., 2011). La TAC se emplea principalmente en la detección y estadificación del CHC, con alta especificidad pero sensibilidad variable (Bellissimo y cols., 2015). La RMN permite el examen del hígado

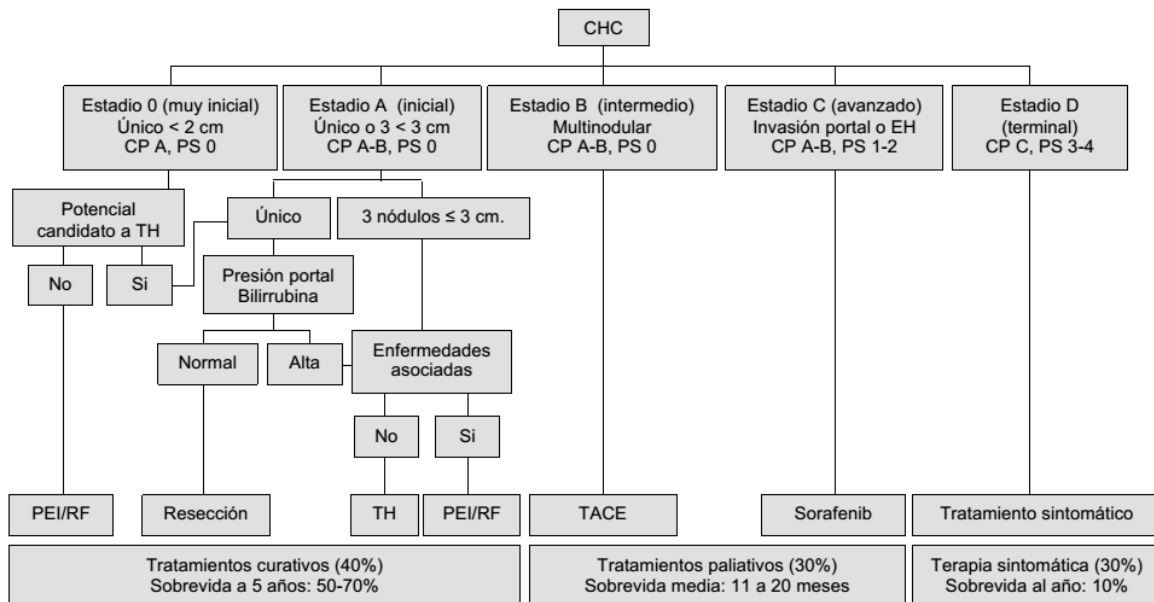


sin contrastes, y muestra una mejor resolución y mayor sensibilidad en la diferenciación de los nódulos tumorales que la TAC o la ecografía (Attwa y El-Etreby, 2015). Aunque la sensibilidad responde al tamaño y grado de diferenciación del tumor (Chou y cols., 2015), la angiografía en combinación con la TAC o la RMN mejora la detección debido a la alta vascularización del CHC. Sin embargo, el uso de esta combinación se restringe al tratamiento mediante quimioembolización, y para el control de hemorragias (Attwa y El-Etreby, 2015).

En la práctica, los biomarcadores séricos habituales para la detección del CHC son la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y alfa-fetoproteína (AFP). El más utilizado es la AFP, pero muestra una baja sensibilidad debido a la alta heterogeneidad del CHC, y una especificidad variable según los valores de corte (Attwa y El-Etreby, 2015). Además, otros biomarcadores como glypican-3, des-gamma-carboxiprotrombina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), cromogranina A, osteopontina, alfa-1-fucosidasa y los complejos antígeno-inmunoglobulina M del carcinoma de células escamosas, solos o en combinaciones, son útiles en la detección temprana del CHC (Bertino y cols., 2014; Kondo y cols., 2015).

La clasificación clínica del CHC es necesaria para predecir el pronóstico y establecer la mejor estrategia para el tratamiento. Puesto que la mayoría de los pacientes ya tienen una enfermedad hepática asociada, la evaluación pronóstica debe incorporar, no solo el grado de desarrollo del tumor, sino también el grado de compromiso de la función hepática (Forner y cols., 2018). Existen diferentes sistemas de estadificación con diferentes pronósticos según las características tumorales, el grado de desarrollo del CHC, las características raciales y las diferencias geográficas de los pacientes (Duseja, 2014). El mejor sistema de estadificación debe tener en cuenta las características tumorales, la función hepática y el estado de salud del paciente, así como el impacto del tratamiento. Entre los 18 sistemas de estadificación disponibles, el sistema de estadificación del grupo *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) es el más utilizado en los países occidentales. Dicho sistema clasifica a los pacientes en cinco grupos utilizando los parámetros relacionados con el tumor y las

características de los pacientes y proporciona recomendaciones para el tratamiento de la enfermedad para cada categoría (Figura 2). Además, es el principal sistema aplicado en ensayos clínicos (Kim y cols., 2012).



**Figura 2.** Estadificación BCLC y protocolo de tratamiento. CHC, carcinoma hepatocelular; CP, Child-Pugh; EH, extrahepática; PEI, inyección percutánea de etanol; PS, capacidad funcional del sujeto (Performance Status); TACE, quimioembolización transarterial; TH, trasplante hepático; RF, radiofrecuencia (Modificado de Forner y cols., 2012).

Otros sistemas de estadificación:

- Sistema TNM (T, tumor primario; N, ganglios linfáticos regionales; M, metástasis distante), el cual solo tiene en cuenta las características del tumor pero no la función hepática.
- Sistema de Okuda, el cual es efectivo en pacientes en etapa avanzada pero no en las primeras fases de la enfermedad.
- Sistema CLIP (*Cancer of Liver Italian Program*), el cual no diferencia entre las etapas más avanzadas.

- Sistema de clasificación de pronóstico Francés, que falla en el pronóstico de pacientes en etapas iniciales.
- Sistema CUPI (*Chinese University Prognosis Index*), el cual es aplicable en el CHC asociado al VHB, pero debe ser validado en otras poblaciones de pacientes.
- Sistema integrado japonés, el cual muestra mejores resultados cuando se combina con biomarcadores de CHC, pero no es adecuado para cohortes de pacientes occidentales.
- Sistema de calificación de Tokio, similar al sistema CLIP pero mejor que el BCLC en pacientes Japoneses (Duseja, 2014; Faria y cols., 2014).

Para el tratamiento del CHC, existen diferentes estrategias cuya aplicación depende del grado de la enfermedad. Los tratamientos curativos incluyen la resección quirúrgica, que es la mejor opción cuando hay un solo nódulo y la funcionalidad del hígado no está dañada. Sin embargo, en pacientes con disfunción hepática y en etapas tempranas de la enfermedad, el trasplante de hígado es la mejor opción. Los tumores irresecables se someten a terapia locorregional. Esta modalidad de terapia induce una necrosis selectiva del tumor y comprende la técnica de ablación, que incluye la ablación por radiofrecuencia, por microondas, la inyección de etanol percutáneo y la crioablación, terapias dirigidas por vía arterial como la embolización o quimioembolización transarterial, y radioterapia de haz externo. Sin embargo, en pacientes con tumores irresecables extensos intrahepáticos y/o con una implicación vascular importante, las terapias locorregionales pueden resultar inapropiadas y debería valorarse la instauración de terapias sistémicas (Benson y cols., 2017).

La quimioterapia convencional no ha demostrado tener buenos resultados en el CHC debido a la resistencia desarrollada a los citotóxicos y a que los datos obtenidos de los ensayos clínicos no son uniformes. Se han probado diferentes fármacos y combinaciones de los mismos, pero el régimen óptimo no se ha

determinado (Obi y cols., 2015). Aunque el Sorafenib es el único tratamiento oral aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el manejo del CHC avanzado (Pascual y cols, 2016), existen otras modalidades de tratamiento como la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales, o el empleo de nanopartículas poliméricas, liposomas, y micelas que portan pequeñas moléculas, miARNs, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (Dutta y Mahato, 2017).

#### **2.1.4 Modelos experimentales para el estudio del CHC**

Existe una necesidad de investigar para mejorar el diagnóstico y los tratamientos del CHC. Sin embargo, dada la complejidad tanto de la enfermedad como de los diversos factores de riesgo, existen ventajas al emplear modelos que reflejan el CHC, así como el entorno en el que se forma.

Históricamente, los experimentos centrados en la fisiología hepática se han llevado a cabo en modelos animales de rata, pero los modelos de ratón ofrecen una mejor opción debido a la similitud con la genética y fisiología humana, y a la menor infraestructura que se requiere para su mantenimiento. Además, la manipulación genética de los ratones permite a los investigadores definir el papel de los diferentes elementos del entorno tumoral en el desarrollo y la progresión del carcinoma hepático. Existen varias estrategias para inducir el CHC en roedores. La administración de agentes genotóxicos como la dietilnitrosamina (DEN), proliferadores de peroxisomas, aflatoxinas, tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) o tioacetamida, o una dieta deficiente en colina y metionina, promueve el crecimiento del tumor al inducir estrés oxidativo y daño en el ADN. En la mayoría de los casos, es necesario repetir la administración del carcinógeno, o administrar un agente promotor que, aunque carece de capacidad genotóxica directa, promueve el desarrollo tumoral después de la iniciación al facilitar la expansión clonal de las células preneoplásicas (De Minicis y cols., 2013). La implantación de células cancerosas en animales hace que, también, los modelos de xenoinjerto sean apropiados para comprender las características del tumor y la respuesta a la administración de un fármaco en un corto período de

tiempo; sin embargo, no reproducen el microambiente tumoral. La patología del CHC humano puede simularse en ratones genéticamente modificados, que ofrecen una gran herramienta para comprender el papel de diferentes oncogenes en las diferentes etapas del desarrollo del tumor, aunque su empleo no está muy extendido debido a los costes y a los problemas de propiedad intelectual (Bakiri y Wagner, 2013).

Por otro lado, se pueden desarrollar estudios *in vitro* utilizando un amplio catálogo de líneas celulares de hepatocarcinoma de roedores y humanas, que difieren en su origen, alteraciones de señalización o capacidad metastásica.

## **2.2 Procesos celulares involucrados en el CHC**

### **2.2.1 Metástasis**

El proceso de diseminación de células tumorales desde su localización original a otros tejidos y órganos donde son capaces de establecer colonias que permiten el crecimiento de nuevos tumores, se denomina metástasis. En el CHC, la metástasis intrahepática es muy frecuente, y entre el 30 y el 50% de los pacientes presentan metástasis extrahepática (Hong y cols., 2003; Terada y Maruo, 2013). La importancia de este proceso para el pronóstico de la enfermedad se manifiesta claramente puesto que el 90% de las muertes asociadas al CHC se deben a la localización secundaria de nuevos tumores (Shen y cols., 2012).

El proceso de metástasis requiere una serie de pasos para producirse con éxito. Las células tumorales han de perder su adhesión, adquirir motilidad, incorporarse a la circulación, ser capaces de invadir nuevos tejidos y colonizar órganos diferentes, todo ello regulado por la acción de diferentes proteínas, citocinas y factores de crecimiento (McCawley y Matrisian, 2001). Un mecanismo indispensable para la metástasis es la angiogénesis, constituyendo esta un importante punto de control en la progresión del cáncer (Folkman, 2000).

### 2.2.2 Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Este evento difiere de la vasculogénesis, que implica la formación de *novo* de células endoteliales a partir de precursores de células del mesodermo. La angiogénesis tiene un papel crítico en el crecimiento y desarrollo, así como en la cicatrización de heridas y en la formación de tejido de granulación; sin embargo, los desequilibrios dentro de este proceso favorecen la inducción de cuadros inflamatorios, isquémicos, infecciosos e inmunitarios, y también se ha demostrado que es un componente básico en la progresión tumoral y metástasis (Carmeliet y Jain, 2011).

Aunque existen muchos factores con un papel en la promoción de la angiogénesis tumoral, la atención principal se ha centrado en los miembros de las familias del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Fernig y Gallagher, 1994; Dvorak y cols., 1999). El VEGF es el factor angiogénico más investigado en el CHC, y dado que en la presente tesis doctoral hacemos referencia al mismo, nos centraremos en él y en su relación con el cáncer.

#### **Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)**

El VEGF es un factor de crecimiento con potente actividad mitogénica. Esta característica se describió, en primer lugar, en las células endoteliales derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos, por lo que se denominó "factor de crecimiento endotelial vascular"; sin embargo, también ejerce una actividad mitogénica apreciable para otros tipos de células (Ferrara y Davis-Smyth, 1997). Por el momento, se han descrito dos receptores homólogos para VEGF: el receptor VEGF-1 (VEGFR-1) y el receptor VEGF-2 (VEGFR-2); ambos juegan un papel crítico durante la formación de vasos sanguíneos (Liao y Johnson, 2007). El VEGF induce la expresión de varias proteínas íntimamente ligadas a la angiogénesis, invasión celular y remodelación tisular, como las metaloproteinasas y las colagenasas, que aumentan la permeabilidad microvascular, inducen la pérdida de proteínas plasmáticas y la

posterior formación de vasos. Además, se ha demostrado que el VEGF estimula la tasa de transporte de hexosa, que puede tener relevancia para las demandas de energía aumentadas durante la proliferación o inflamación de las células endoteliales (Pekala y cols., 1990). Además, el VEGF tiene efectos reguladores sobre ciertas células sanguíneas, promoviendo la quimiotaxis de monocitos, induciendo la formación de colonias de células progenitoras de granulocitos-macrófagos, y teniendo un efecto inhibitorio sobre la maduración de células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, que apoyan la hipótesis de que el VEGF favorece que el tumor escape a la inducción de una respuesta inmune y, por tanto, facilita el crecimiento del mismo (Gabrilovich y cols., 1996).

### **Angiogénesis, VEGF y CHC**

Siendo uno de los tumores sólidos más vascularizados, el patrón de crecimiento rápido del CHC requiere una cantidad considerable de nutrientes y oxígeno para la supervivencia y expansión de las células tumorales, por lo que la angiogénesis desempeña un papel importante en el desarrollo, progresión y metástasis del CHC. Por lo tanto, la arterialización y la capilarización sinusoidal son los cambios vasculares más frecuentes asociados a la progresión de los nódulos displásicos y al desarrollo del CHC (Poon y cols., 2003a).

Los tumores de pequeño tamaño muestran un estado de neoangiogénesis y proliferación más elevado que el CHC avanzado. Sin embargo, los niveles más altos de VEGF aparecen en pacientes con CHC metastásico (Park y cols., 2000). Los niveles séricos del VEGF en pacientes con CHC se correlacionan, de manera significativa, con los niveles de ARNm y la expresión proteica de las células tumorales, lo que apoyaría el uso del VEGF sérico como marcador pronóstico (Poon y cols., 2003b; Semela y Dufour, 2004).

Existen evidencias en estudios preclínicos que sugieren que la terapia antiangiogénica inhibe el crecimiento del CHC. Un ejemplo de terapia son los inhibidores de tirosina quinasa, dirigidos hacia los receptores del VEGF, los cuales suprimen el crecimiento de las células tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*, y

previenen eficazmente la revascularización de tejidos tumorales después de la ligadura de la arteria hepática (Liu y cols., 2005). Además, el uso de fármacos que inhiben directamente la proliferación de las células endoteliales podría constituir otro enfoque de la terapia antiangiogénica (Xia y cols., 1997). También se han evaluado agentes que pueden prevenir la degradación de la MEC y la membrana basal, pasos esenciales en la angiogénesis (Qin y cols., 1999). La terapia génica basada en la liberación de factores antiangiogénicos naturales, como la angiostatina y la endostatina, también logra efectos antiangiogénicos en modelos animales de xenoinjerto de CHC humano (Ishikawa y cols., 2003).

### **2.2.3 Hipoxia**

Para sobrevivir a un estado de hipoxemia, es decir, a una disminución anormal de la presión parcial de oxígeno en la sangre arterial, los eucariotas superiores han desarrollado mecanismos coordinados, tanto a nivel transcripcional como translacional. De este modo, la transcripción de genes que controlan la glucólisis, el transporte de glucosa, la supervivencia y muerte celular, la angiogénesis, y la eritropoyesis, se activan a través del HIF para restaurar la homeostasis del oxígeno (Pages y Pouyssegur, 2005). En vista de esto, y en base a las teorías de Folkman, es razonable considerar la hipoxia como un regulador fisiológico primario del cambio angiogénico. En resumen, la hiperproliferación de células tumorales aumenta el metabolismo y el posterior consumo de oxígeno, altera el pH local, y favorece el estrés oxidativo; junto con una disminución en la concentración de oxígeno debido al aumento de las distancias de difusión dentro de la masa tumoral en expansión, conduciendo así a un microambiente hipóxico (North y cols., 2005).

#### **Factor inducible por hipoxia (HIF)**

Las proteínas HIF, en concreto HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$  y HIF1 $\beta$ , son  $\alpha/\beta$ -heterodímeros con dominio hélice-bucle hélice básico, que pertenecen a una familia de factores de transcripción. A diferencia de la subunidad HIF1 $\alpha$  regulada por el oxígeno, HIF1 $\beta$  se expresa constitutivamente pero no responde al oxígeno. HIF1 $\alpha$  es la subunidad expresada de forma más ubicua y funciona como el principal regulador



de la homeostasis del oxígeno en muchos tipos de células. HIF2 $\alpha$  se expresa predominantemente en células endoteliales, con funciones no bien conocidas; y HIF3 $\alpha$ , también conocido como iPAS, está presente principalmente en la córnea, cerebelo y cerebro, y regula negativamente a HIF1 $\alpha$  (Liao y Johnson, 2007).

HIF1 $\alpha$  está controlado a diversos niveles moleculares, incluidos la expresión de ARNm, la estabilidad de la proteína y la actividad transcripcional. En condiciones normóxicas, HIF1 $\alpha$  media la hidroxilación de dos residuos de prolina, y la degradación proteosómica. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia escapa a la degradación, lo que permite la heterodimerización con HIF1 $\beta$  y la posterior unión a elementos de respuesta hipóxica (HRE) (Liao y Johnson, 2007). Su actividad también está regulada por activadores e inhibidores; a este respecto, la inhibición del factor HIF1 previene la unión de HIF1 $\alpha$  a los coactivadores transcripcionales p300/CBP, una vez que HIF1 $\alpha$  se hidroxila. Contrariamente, el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), también activado en respuesta a la hipoxia y comúnmente regulado en tumores sólidos, funciona como un activador de HIF1 capaz de aumentar su estabilidad y actividad transcripcional (Shin y cols., 2011). Además, la regulación de HIF1 $\alpha$  también ocurre a nivel de ARNm, a través de la vía de transducción de señales fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (AKT) (Grunstein y cols., 2000).

### **Hipoxia, HIF y CHC**

La implicación del HIF en el crecimiento tumoral está bien documentada mediante el empleo de modelos *in vivo* e *in vitro*. En muestras de CHC humano, el nivel proteico de HIF2 $\alpha$  está significativamente elevado y se asocia a un peor pronóstico (Bangoura y cols., 2007; Dai y cols., 2009; Yang y cols., 2014).

La baja disponibilidad de oxígeno en el CHC parece inducir la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo energético para estimular directamente el crecimiento de las células neoplásicas. Además, se propone que HIF1 $\alpha$  es capaz de bloquear la apoptosis o muerte celular programada en el CHC (Baek y cols., 2000).

Como ya hemos mencionado, la proliferación descontrolada y la apoptosis insuficiente conducen a la formación de una masa tumoral que, sin embargo, verá restringido su crecimiento en ausencia de oxígeno y nutrientes. De acuerdo con esto, la angiogénesis es condición indispensable para el crecimiento sostenido del tumor, su dispersión y posterior establecimiento en otros tejidos (Folkman, 1972). Por tratarse de un tumor sólido, el CHC se caracteriza por su alta vascularización, factor empleado en su diagnóstico como sinónimo de agresividad tumoral. Además, este tipo de tumores hepáticos suelen presentar elevados niveles de los factores VEGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y HIF1, entre otros (Poon y cols., 2003b, Semela y Dufour, 2004).

### **2.3 Mecanismos moleculares implicados en el CHC**

Un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en el CHC, se torna crucial para identificar las posibles dianas terapéuticas y definir terapias alternativas o que potencien los tratamientos convencionales. Puesto que no existe una única vía de señalización responsable del desarrollo y la progresión del CHC, el estudio de las principales vías alteradas en el mismo, constituiría un importante avance para el diseño de nuevos fármacos.

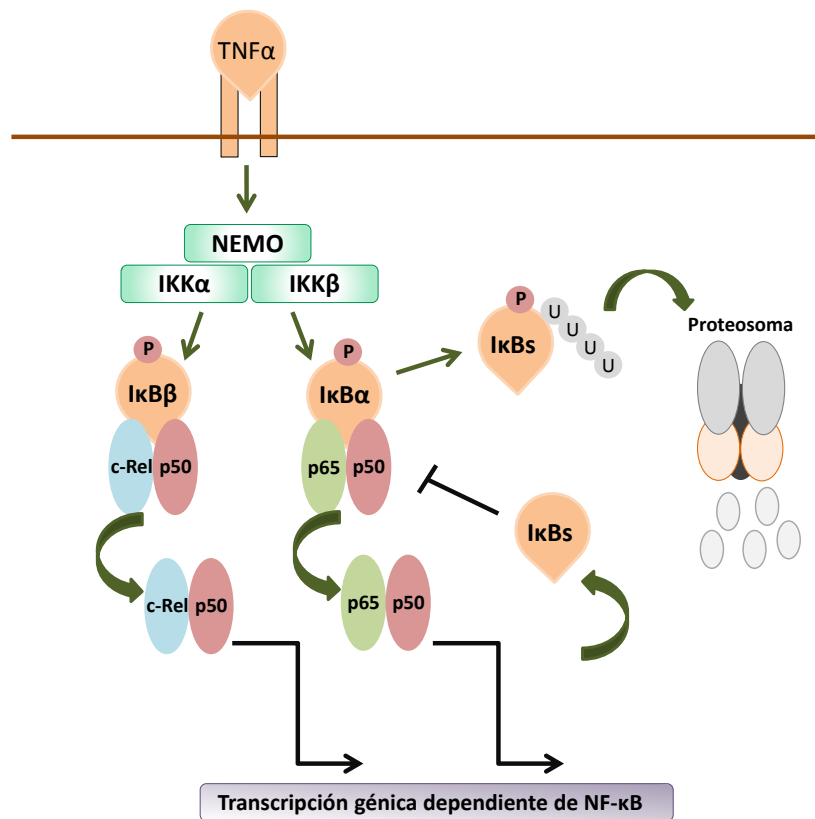
#### **2.3.1 Vías de señalización asociadas a daño hepático**

##### **Vía del NF- $\kappa$ B**

La vía de señalización del factor de transcripción nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) se ha propuesto para actuar como un enlace entre la inflamación y el cáncer. Por un lado, NF- $\kappa$ B ejerce acciones anticancerígenas que modulan la respuesta inmune pero, por otro lado, favorece la proliferación e invasión de células tumorales (Guttridge y cols., 1999; Wu y cols., 2016), inhibe la apoptosis (Perkins, 1997), y regula positivamente los procesos de angiogénesis y metástasis (Huber y cols., 2004; Xie y cols., 2010).

La familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros que se dimerizan en respuesta a estímulos múltiples, tales como los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), de la interleucina (IL)-1, receptores tipo Toll (TLR) y genotóxicos metabólicos. Los dímeros formados presentan distinta afinidad por diferentes secuencias de unión al ADN, promoviendo la transcripción de diferentes genes (Wong y cols., 2011). En condiciones basales, estas moléculas se unen a inhibidores específicos de kappa B ( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) que evitan su translocación nuclear. La degradación de estos inhibidores por la acción del proteosoma se desencadena por las  $\text{I}\kappa\text{B}$  quinasas (IKK) en un mecanismo que puede ser dependiente o independiente de la proteína adaptadora NEMO (vías canónicas y no canónicas, respectivamente).

En la presente tesis nos centraremos en la vía canónica, en la cual la activación del receptor de TNF- $\alpha$  produce una cascada de eventos de señalización. En primer lugar, se activa el inhibidor del complejo IKK (compuesto por  $\text{IKK}\alpha$ ,  $\text{IKK}\beta$  y las proteínas adaptadoras NEMO). Posteriormente, se fosforilan  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ó  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$  desencadenando su ubiquitinización y se dirigen hacia los  $\text{I}\kappa\text{B}$ s para su procesamiento por el proteosoma, y la liberación de dímeros de NF- $\kappa$ B, generalmente p65:p50 ó c-Rel:p50. La liberación de los dímeros de la subunidad  $\alpha$  ó  $\beta$ , impulsa la transcripción génica dependiente de NF- $\kappa$ B. Sin embargo, se han encontrado varios mecanismos en el control de la activación de NF- $\kappa$ B (Mitchell y cols., 2016). Así, un incremento en la actividad de NF- $\kappa$ B aumenta la producción del inhibidor  $\text{I}\kappa\text{B}$ , regulando su propia actividad mediante un ciclo de retroalimentación negativa (Wong y cols., 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B.

### Vía de Ras/MAPKs

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), desempeñan un papel fundamental en el control de la supervivencia y proliferación celular y, por tanto, su desregulación está implicada en la transformación y progresión tumoral (Delire y Stärkel, 2015).

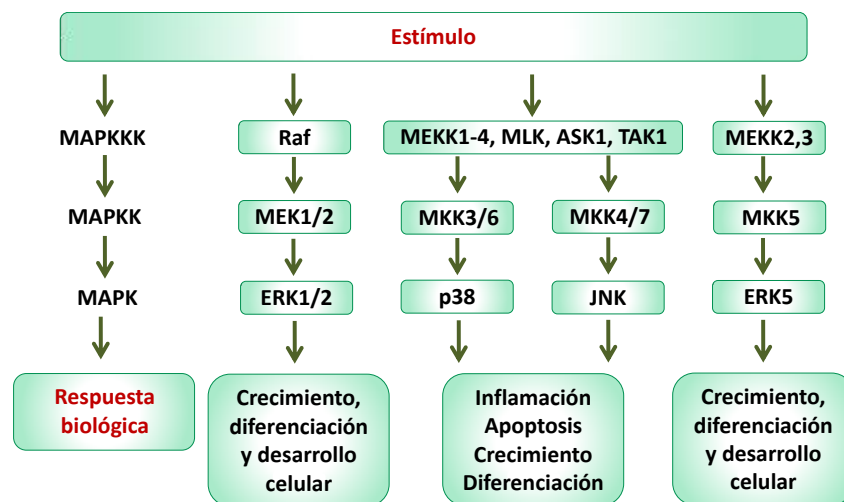
La vía de Ras/MAPKs se inicia a raíz de la fosforilación de los receptores tirosina quinasa y la posterior activación de las proteínas adaptadoras, y funciona como un mecanismo de transducción intracelular de señales altamente conservado a lo largo de la evolución. Hasta la fecha han sido descritas cuatro cascadas principales dentro de las MAPK, denominadas con el nombre de su enzima clave, la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), concretamente ERK1 y ERK2, la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK)1-3, la p38 MAPK y la ERK5 (Huang y cols., 2010) (Figura 4). Gracias a la activación de estas cascadas de señalización, distintos estímulos externos se

transmiten al interior de la célula para controlar procesos fisiológicos, en muchos casos opuestos entre sí, como la proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, desarrollo o respuesta al estrés (Wagner y Nebreda, 2009). Dada su importancia, la desregulación de estas MAPKs ha sido relacionada con diversas patologías como el cáncer y la diabetes, habiéndose descrito su contribución a la hepatocarcinogénesis (Min y cols., 2011).

Dentro de las quinasas reguladas por señales extracelulares, ERK1 fue la primera MAPK caracterizada en mamíferos, originariamente descrita por su respuesta a factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el EGF, el factor de crecimiento nervioso (NGF), o la insulina. Su activación está asociada a receptores tirosín quinasa y receptores acoplados a proteínas G. Esta ruta se relaciona frecuentemente con la proliferación celular; y se sabe, por ejemplo, que ERK1/2 es inducido por agentes mitogénicos, y su activación parece ser necesaria para la progresión de la fase G1 a S durante el ciclo celular (Bacus y cols., 2001). Debido a la gran variedad de eventos celulares en los que participa ERK, y considerando que algunos de estos aparecen con frecuencia alterados en el desarrollo del cáncer, no es sorprendente su importancia en la carcinogénesis (Lee y cols., 2006). El VHB y el VHC son los principales factores de riesgo de enfermedades hepáticas humanas, incluida la hepatitis crónica, la cirrosis y el CHC, y la activación de la vía ERK parece ser importante en la patogénesis y la carcinogénesis hepática asociada a estas infecciones víricas (Chin y cols., 2007). Además, se ha indicado que las formas activas de esta proteína aparecen significativamente aumentadas en el CHC (Lee y cols., 2006). Sin embargo, existe cierta controversia en cuanto al papel de ERK en la carcinogénesis, habiendo estudios que la relacionan con la activación del gen supresor de tumores p53 y la proteína pro-apoptótica del gen del linfoma de células B2 (Bcl-2) en respuesta a quimioterapia (Chua y cols., 2006; Bien y cols., 2007).

Por último, destacaremos la ruta de la quinasa p38 también conocida como SAPK2, que presenta un 50% de homología con ERK2 (Cuenda y Rousseau, 2007). Se han identificado cuatro isoformas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  con distintos patrones de expresión. Identificada primero por su papel en la regulación de la producción de

citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Huang y cols., 2010), p38 MAPK también es inhibidora esencial de la proliferación celular, aunque varios mecanismos moleculares dependen en gran medida del tipo de célula (Keshet y Seger, 2010). El papel supresor de p38 en la proliferación parece estar al menos parcialmente mediado por su control sobre la transición del ciclo celular (Wong y cols., 2009). Además, se ha descrito su implicación en otros procesos regulados por quinasas como la supervivencia celular y la inducción de apoptosis (Huang y cols., 2010). Con respecto al papel de p38 en el desarrollo del cáncer, la evidencia directa usando modelos de ratones sugiere que estas quinasas ejercen una regulación negativa del desarrollo tumoral (Ventura y cols., 2007). De hecho, varios estudios indican que p38 participa en varios mecanismos durante la carcinogénesis hepática (Min y cols., 2011).



**Figura 4.** Cascada de fosforilación de la vía Ras/MAPKs. Las MAPKs se activan a través de una cascada de fosforilación en la que la MAPK se activa mediante una MAPK quinasa de doble especificidad (MAPKK), activada a su vez por una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), a partir de un estímulo inicial. La activación del receptor de uno de los módulos puede implicar la participación de pequeñas GTPasas, como Ras y Rac. La MAPK fosforila muchos sustratos, incluidos los factores de transcripción (Modificado de: Huang y cols., 2010).

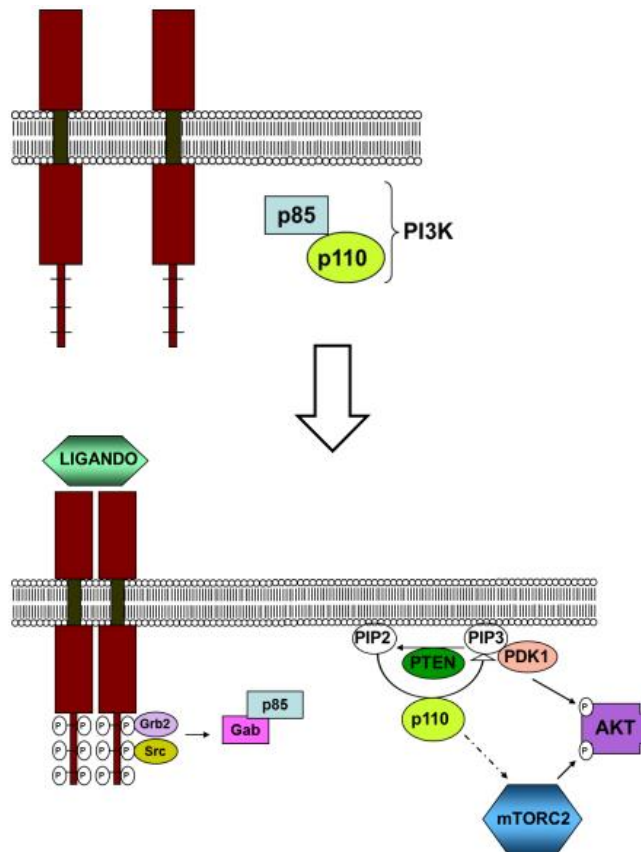
### Vía PI3K/AKT/mTOR

Al igual que la vía de las MAPKs, esta ruta de señalización se inicia tras la fosforilación de los receptores tirosina quinasa y la activación de sus sustratos

adaptadores. La señalización de la vía PI3K/AKT/diana de la rapamicina en células de mamífero (mTOR) responde a factores de crecimiento, reservas energéticas e hipoxia (Courtney y cols., 2010).

La vía se inicia con las proteínas Grb2 y Src que activan a las proteínas adaptadoras Gab1/Gab2 (proteínas de unión asociadas a Grb1 y 2). Una vez activadas, pueden unirse y secuestrar a p85, subunidad reguladora de PI3K encargada de la inhibición y bloqueo de la actividad de la subunidad catalítica p110. Al quedar secuestrada p85, p110 es liberada y ejerce su capacidad enzimática. La actividad enzimática consiste en la transferencia de grupos fosfato al glucolípido de membrana fosfatidil-inositol difosfato (PIP<sub>2</sub>), transformándose a fosfatidil-inositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Además de PI3K, existen otras enzimas que mantienen la correcta regulación de la concentración de PIP<sub>3</sub> a nivel celular. La principal es la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), que cataliza la reacción inversa, es decir, el paso de PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>. Por último, PIP<sub>3</sub> activa la proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1), que fosforila el residuo localizado en la posición 308, activando así AKT (Courtney y cols., 2010).

PI3K también es capaz de activar el complejo mTORC2, el cual promueve la supervivencia celular, la organización del citoesqueleto de actina, y responde exclusivamente a la estimulación de factores de crecimiento (Guertin y Sabatini, 2009). Este complejo, formado por varias proteínas entre las que se encuentra mTOR, también puede activar la proteína AKT mediante la fosforilación de un residuo de serina localizado en la posición 473. Sin embargo, la actividad de AKT no es máxima hasta que ambos residuos son fosforilados (Alessi y Cohen, 1998) (Figura 5).



**Figura 5.** Activación de la subunidad catalítica de PI3K (p110) y fosforilación de AKT.

La proteína AKT es una serina/treonina quinasa capaz de actuar sobre una gran cantidad de sustratos y de regular de manera directa varias funciones celulares. Se le atribuyen funciones reguladoras del metabolismo, motilidad, supervivencia y diferenciación celular (Fayard y cols., 2005).

La vía PI3K/AKT/mTOR, además, juega un papel significativo en la regulación de la supervivencia de las células tumorales en diferentes tipos de cáncer, incluido el CHC. La fosforilación de AKT se ha identificado como un factor de riesgo para la recurrencia temprana de la enfermedad, y se ha asociado a un mal pronóstico en el CHC (Sumarin y cols., 2016).

En células tumorales, la vía PI3K favorece la iniciación, crecimiento y proliferación tumoral. También regula la proliferación de células endoteliales e



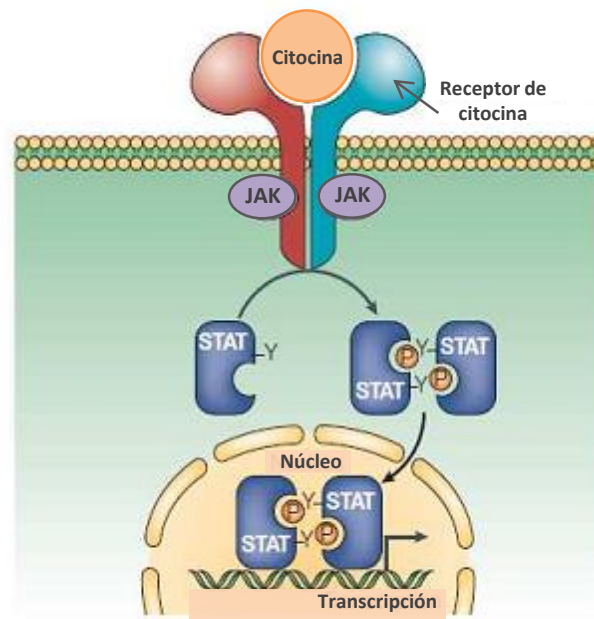
infiltración de células inmunitarias, favoreciendo el crecimiento tumoral, intravasación e invasión (Yuan y Cantley, 2008).

### **Vía JAK/STAT**

La ruta de transducción de la señalización de la quinasa Janus 2 (JAK2)/STAT3 es un importante canal de transducción de citocinas implicados en la regulación de genes responsables de funciones biológicas tales como citopoyesis, diferenciación, desarrollo embrionario e inmunidad (Leaman y cols., 1996). En humanos, de los siete miembros de la familia STAT (STAT1-4, STAT5A, STAT5B y STAT6), en general, STAT3 y STAT5A/B promueven la oncogénesis, mientras que la activación de STAT1 ejerce efectos opuestos (Shuai y Liu, 2003).

STAT3 es un factor de transcripción citoplasmático que juega papeles cruciales en funciones celulares tales como la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación. Así, un aumento en la expresión de STAT3 contribuye a la progresión del CHC (Won y cols., 2015), y el bloqueo de la activación de STAT3 ha demostrado reducir significativamente el crecimiento del CHC *in vivo* e *in vitro* (Wang y cols., 2011; Carbajo-Pescador y cols., 2013a).

STAT requiere de una fosforilación previa para iniciar su función biológica. Esta función es llevada a cabo por diversas citocinas, tales como IL-6, IL-13, PDGF o EGF (Blaskovich y cols., 2003). Las citocinas se unen a sus receptores e inducen su dimerización para formar lugares de unión para JAK en el citoplasma. Estos lugares de unión activan a JAK mediante la fosforilación de la tirosina y esta a su vez fosforila a STAT activando, así, la proteína. Una vez activadas, sufren una dimerización y se translocan al núcleo donde se unen específicamente al ADN para la transcripción génica (Shuai y cols., 2003) (Figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática de la activación de JAK-STAT y translocación al núcleo.

En muchos cánceres en los que es característica la activación de JAK/STAT, no se conoce el mecanismo subyacente a la activación inapropiada de la vía, puesto que las células cancerosas emplean una amplia gama de estrategias en dicha activación. Sin embargo, definir estos mecanismos no indica si la activación de la vía contribuye significativamente a la oncogénesis. Mutaciones en STAT que conducen a una mayor transcripción, aunque en general son poco frecuentes, se han descrito en cáncer (Koskela y cols., 2012). Estos incrementos en la expresión de STAT conducen a una mayor supervivencia de las células tumorales y promueven el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto (Haddad y cols., 2013). Unido a esto, una reducida expresión de reguladores negativos puede causar una mayor activación de la vía en diferentes tipos de cáncer (He y cols., 2003; Brantley y cols., 2008).

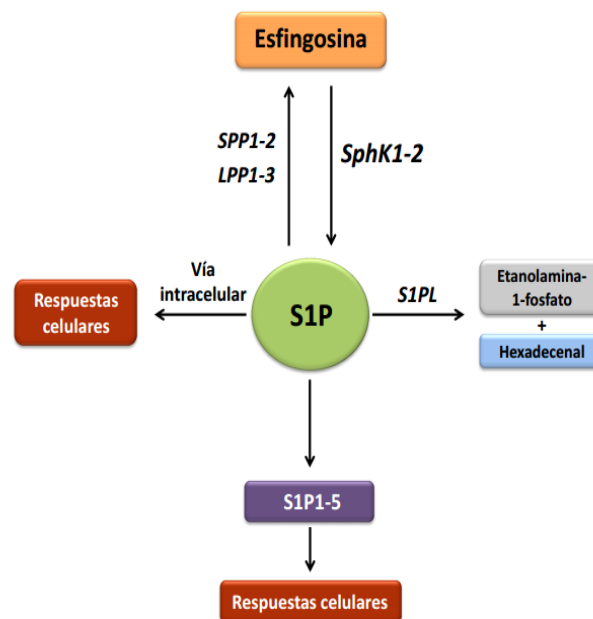
### 2.3.2 Vía de los esfingolípidos

En 1884, los estudios de Thudichum sobre la estructura cerebral revelaron la presencia de componentes lipídicos con una estructura compleja, los esfingolípidos, inspirados en el enigma de la esfinge griega debido a la naturaleza misteriosa de estos compuestos (Thudichum, 1962).

Los esfingolípidos son un grupo heterogéneo de moléculas anfipáticas formadas por una base carbonada consistente en un aminoalcohol con una cadena lateral de ácido graso unido mediante un enlace amino. Esta estructura básica, llamada ceramida, constituye el esqueleto que comparten todos los esfingolípidos. Las diferencias entre unos y otros se basan en la presencia de diferentes grupos que forman su región hidrofílica. Además de su clásica función como componentes estructurales, actúan también como mensajeros secundarios en la señalización intracelular modulando diferentes procesos biológicos. Entre estos esfingolípidos, la cascada ceramida-esfingosina 1-fosfato (S1P) ha atraído considerable atención debido a que estas moléculas están implicadas en numerosos procesos patológicos que incluyen la esclerosis múltiple, el asma, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal o el cáncer (Pyne y Pyne, 2010; Edmonds y cols., 2011; Spiegel y Milstien, 2011; Watters y cols., 2011).

La S1P es sintetizada a partir del sustrato esfingosina por la esfingosina quinasa (SphK)1, principalmente localizada en el citosol, y la SphK2, presente en diversos orgánulos dependiendo del tipo de célula (Maceyka y cols., 2012). La SphK1 es la isoforma predominante de la enzima y cataliza la formación de S1P, la cual ejerce una variedad de funciones que incluye la regulación de importantes procesos celulares (Hait y cols., 2009). Los niveles de S1P están estrechamente controlados por los niveles de esfingosina, SphK y las enzimas que degradan S1P, que incluyen la S1P liasa (S1PL), dos fosfatasa específicas de S1P (SPP1-2) y tres fosfatasa de fosfolípidos (LPP1-3) (Maceyka y cols., 2012) (Figura 7). La S1P participa en una serie de vías de señalización iniciadas por citocinas, factores de crecimiento, hormonas, y sus receptores, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), PDGF, EGF, VEGF, IGF-1, TLRs, TNF- $\alpha$ , o el receptor 1 activado por proteasas (PAR-1). La S1P, además, funciona como un mensajero extracelular e intracelular (Zhang y cols., 2013a), que ejerce diferentes funciones biológicas dependiendo de dónde se genera y la SphK implicada (Schwalm y cols., 2013). La comprensión de la amplia gama de acciones de la S1P se ha visto facilitada por la identificación de una familia de receptores de S1P (S1P1-5), junto con el descubrimiento reciente de dianas

intracelulares (Spiegel y Milstien, 2000; Xia y Wadham, 2011; Adada y cols., 2015, Pyne y cols., 2016). La mayoría de las acciones de la S1P están mediadas por receptores específicos, S1P1-5. Entre estos, el S1P1, el S1P2 y el S1P3 se expresan en numerosos tejidos, incluido el hígado, mientras que la expresión de S1P4 se limita al tejido hematopoyético y linfoide, y la expresión de S1P5 al sistema nervioso central (Sánchez y Hla, 2004). La activación de estos receptores conduce a una serie de respuestas celulares como el aumento de formación de MEC, de proliferación, la estimulación de uniones adherentes, la inhibición de la angiogénesis y la apoptosis, o el aumento de inmunidad y tráfico de linfocitos (Spiegel y Milstien, 2003; Kee y cols., 2005; Brunati y cols., 2008).



**Figura 7.** Vía de señalización de la S1P. Enzimas que participan en la síntesis, el transporte y la degradación de S1P.

Las SphKs se activan mediante numerosos estímulos, que incluyen citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión intercelular (Rivera y cols., 2008). Ahora se considera que la S1P tiene un importante papel en la red de citocinas, y se sabe que un número creciente de citocinas y otros agonistas pro o antiinflamatorios actúan, al menos en parte, a través de la vía de la S1P (Xia y Wadham, 2011). Más allá de la transactivación de los receptores de S1P junto a la

estimulación por citocinas y factores de crecimiento, la unión de S1P a sus receptores también transactiva a los receptores del factor de crecimiento de la tirosina quinasa; esta comunicación funcional tiene un importante papel en procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación o la motilidad (Donati y cols., 2013). Dado que los receptores de S1P se acoplan a múltiples subunidades  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas y se expresan diferencialmente en distintos tipos de células, se activan diferentes dianas, como las GTPasas, Rac y Rho, y las proteínas quinasas ERK, AKT y JNK, lo que da lugar a respuestas biológicas diversas que, a veces, son opuestas o se superponen (Gräler, 2010).

Hasta ahora, gran parte de la investigación se ha enfocado en la señalización de la S1P a través de sus receptores; sin embargo, resultados de diferentes estudios sugieren la presencia de dianas intracelulares directas. Por tanto, aunque la S1P es generalmente un importante mediador antiapoptótico (Hait y cols., 2006; Xu y cols., 2016), también se ha demostrado que desencadena señales apoptóticas de miofibroblastos humanos mediante un efecto intracelular, y no mediante una activación de sus receptores de membrana (Davaille y cols., 2002). Además, se ha demostrado que la activación del NF- $\kappa$ B, por parte de la S1P, es independiente de los receptores de S1P (Takabe y cols., 2010; Alvarez y cols., 2010), y que S1P bloquea las funciones de su precursora, la ceramida, a través de un mecanismo intracelular (Maceyka y cols., 2012).

Se ha demostrado la participación de la vía de señalización de la S1P en una amplia variedad de mecanismos patogénicos. Entre otras funciones, parece que la S1P modula la función endotelial y las respuestas endoteliales a un daño. Datos recientes sugieren que los receptores de S1P pueden ser objetivos potenciales para el tratamiento, no solo de los trastornos del endotelio arterial, sino también, de la disfunción microvascular por lesión isquémica o inflamatoria (Sánchez, 2016). Los moduladores de los receptores de S1P constituyen un enfoque nuevo y prometedor para el tratamiento de una gran variedad de trastornos inflamatorios, como las enfermedades inflamatorias intestinales (Crespo y cols., 2017; Nielsen y cols., 2017). La modulación del eje S1P también puede ser útil para el tratamiento de la resistencia

a la insulina y la progresión de la diabetes tipo 2 (Fayyaz y Kleuser, 2014; Ng y cols., 2017). La SphK1 tiene un papel importante en la esteatosis hepatocelular, ya que la eliminación de la enzima reduce la esteatosis inducida por la dieta en ratones obesos (Chen y cols., 2016). También se ha demostrado que la producción de S1P y la expresión del receptor S1P1 se elevan en la hepatitis fulminante de origen viral (Crespo y cols., 2016).

### **Esfingolípidos y cáncer**

La vía de señalización SphK/S1P participa en numerosos procesos que favorecen el desarrollo de cáncer, incluida la supervivencia celular, la proliferación y la migración celular, la angiogénesis y la respuesta inmune, así como la resistencia a la quimioterapia (Xie y cols., 2017). Así, la sobreexpresión de SphK1 en pacientes con cáncer se asocia a un aumento en la proliferación y migración celular (Li y cols., 2016), contribuyendo a la transformación celular, angiogénesis, diseminación metastásica y resistencia al tratamiento (Evangelisti y cols., 2016; Hatoum y cols., 2017) y, en consecuencia, resultando en bajos índices de supervivencia (Long y cols., 2010a; Watson y cols., 2010). Además, la neutralización de S1P reduce la hipoxia, modifica la arquitectura vascular y sensibiliza al organismo a los agentes quimioterápicos (Ader y cols., 2015).

Hasta la fecha, se han desarrollado varios tipos de moduladores de la vía de señalización SphK/S1P para el tratamiento del cáncer (Edmonds y cols., 2011; Bigaud y cols., 2014; Delgado y Martínez-Castro, 2016; Arish y cols., 2017). Sin embargo, un mejor entendimiento del papel de los esfingolípidos en la regulación de la comunicación entre los tumores y su microambiente, es necesario para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que inhiban el crecimiento, la proliferación y/o la metástasis tumoral (Ogretmen, 2018).

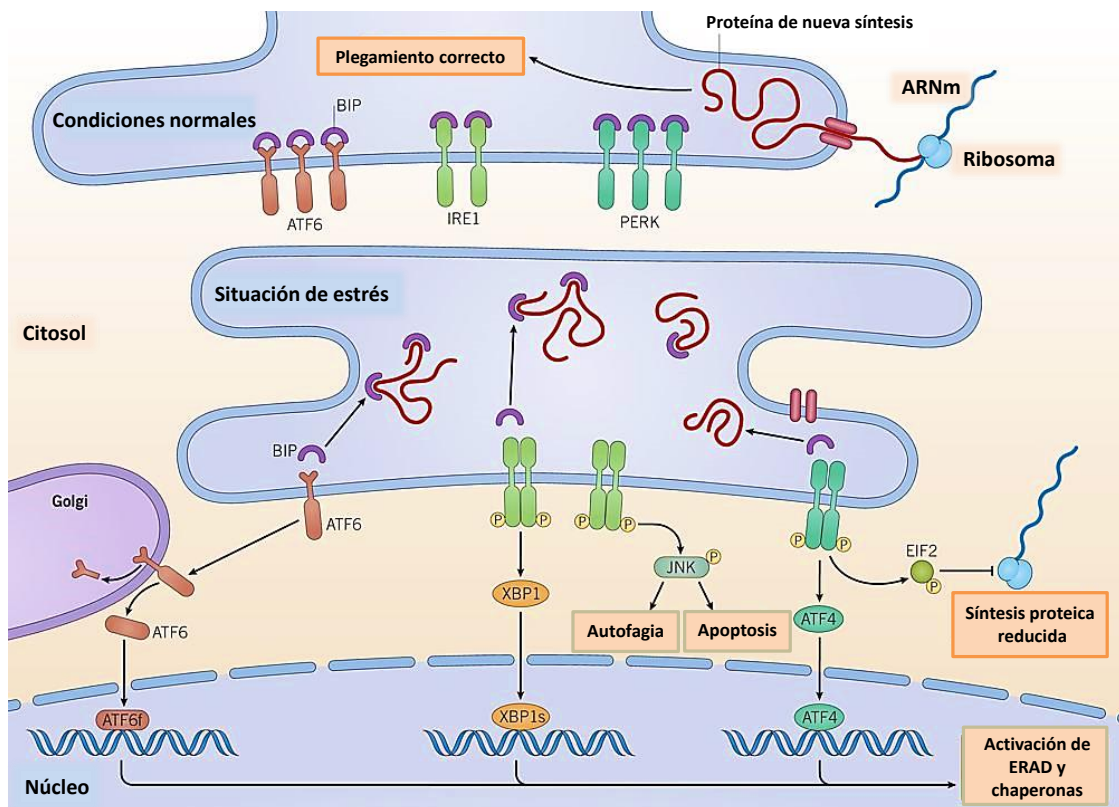
### **2.3.3 Otros mecanismos: estrés del retículo endoplasmático (RE), autofagia y apoptosis**

El uso de modelos animales ha permitido profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el daño hepático (Saito y cols., 2010). El problema es que en la mayoría de los estudios diseñados para conocer las vías de señalización involucradas se utilizan, o modelos *in vivo* de hepatectomía, o modelos *in vitro*, en los que falta la interacción dinámica entre el daño hepático y la reparación celular. Esto depende del equilibrio entre los factores estimuladores, liberados como parte de la respuesta regenerativa, y las sustancias inhibitoras (Rutherford y Chung, 2008).

#### **Estrés del RE: respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)**

El RE es un importante orgánulo celular implicado en la maduración de proteínas, la síntesis de fosfolípidos, el mantenimiento de la homeostasis del calcio y el metabolismo de diferentes drogas. La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE altera su funcionalidad, de manera que existe una respuesta para intentar reducir el depósito de las proteínas dañadas, la llamada UPR (del inglés, *unfolded protein response*) (Janssens y cols., 2014). En mamíferos, esta respuesta es iniciada por la activación de tres sensores de daño localizados en la membrana del RE: la proteína quinasa de retículo endoplásmico activada por estrés (PERK), el factor activador de la transcripción 6 (ATF6), y la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1). La activación de cada una de estas rutas provoca la detención de la síntesis proteica, la producción de chaperonas encargadas del plegamiento proteico, y la activación de una respuesta de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD) o de la apoptosis cuando no es posible resolver el daño causante de los defectos biomoleculares (Janssens y cols., 2014).

PERK, ATF6 e IRE1, en condiciones normales, están unidas a la proteína de unión a inmunoglobulinas (BIP), también conocida como proteína regulada por glucosa (GRP)78, encargada de mantenerlas en su estado inactivo. Sin embargo, en células sometidas a estrés del RE, las proteínas desnaturalizadas interactúan con BIP/GRP78 provocando su disociación y desencadenando la cascada de señalización de respuesta al estrés (Gorman y cols., 2012) (Figura 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la UPR. El proceso de modificación postraduccional y plegamiento de proteínas se ve alterado durante el estrés del RE y da como resultado la acumulación de proteínas mal plegadas, que en última instancia pueden causar la muerte celular. Para aliviar el estrés del RE y restaurar la homeostasis, la célula activa una serie de vías de señalización, denominadas UPR, que corrigen el mal plegamiento o median en la degradación de proteínas incorrectamente plegadas (Modificado de Todd y cols., 2008).

La asociación entre alteraciones en esta respuesta de adaptación celular y el desarrollo de diferentes patologías explica la importancia del estrés del RE en la fisiología celular (Park y Ozcan, 2013; Sano y Reed, 2013). Así, en cáncer se ha visto



que la UPR está implicada en procesos de carcinogénesis, supervivencia celular y angiogénesis, con diferente función según el contexto celular. Además, se han encontrado numerosas mutaciones en diferentes proteínas de la UPR en varios tipos de tumores, incluyendo el CHC (Greenman y cols., 2007; Kan y cols., 2010; Pereira y cols., 2010; Senovilla y cols., 2012; Leung-Hagesteijn y cols., 2013; Nakagawa y cols., 2014; Wu y cols., 2014).

Aunque de forma clásica la respuesta al estrés del RE se ha asociado a un mecanismo de muerte celular programada denominado apoptosis, en los últimos años se ha visto que también está estrechamente relacionada con un proceso degradativo encargado de la eliminación de componentes celulares dañados, la autofagia. Cuando el daño que inicia todo el proceso se mantiene y otros orgánulos comienzan a verse afectados, la autofagia se inicia en un último esfuerzo de la célula para protegerse. A pesar de la complicada relación existente entre el estrés del RE y la autofagia, cada vez son más numerosos los hallazgos que confirman la interconexión de ambos procesos. Así, por ejemplo, las vías de PERK e IRE1 son capaces de inducir la expresión de diferentes genes autofágicos y de promover la supervivencia celular (Tallóczy y cols., 2002; Ogata y cols., 2006; Kouroku y cols., 2007; B'chir y cols., 2013); una liberación de calcio desde el RE también activa la autofagia mediante la estimulación de diferentes vías, como la de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), o mediante la inhibición de mTOR (Zalckvar y cols., 2009; Madaro y cols., 2013; Shiloh y cols., 2014).

La relación del estrés del RE con la apoptosis ha sido estudiada con mayor profundidad, observándose una clara activación de la muerte celular programada como consecuencia de la activación de varias de las vías que promueven la UPR (McCullough y cols., 2001; Scorrano y Korsmeyer, 2003; Obeng y Boise, 2005; Szegezdi y cols., 2006; Puthalakath y cols., 2007).

Además, diferentes factores de estrés (temperaturas elevadas, hipoxia, estrés oxidativo, infecciones víricas, etc.), activan otro grupo de genes conocidos como genes de choque térmico (HS) o genes de estrés. Sus productos proteínicos, las

proteínas HS (HSP) desempeñan múltiples funciones protectoras en la célula, actuando principalmente para evitar la agregación de proteínas parcialmente desnaturalizadas, para permitir su replegamiento, y para estimular la degradación de proteínas dañadas irreversiblemente. Las proteínas que interactúan de forma no específica con diversas proteínas parcialmente desnaturalizadas, para evitar su agregación y facilitar la restauración de sus estructuras nativas, se conocen como chaperonas moleculares (Garbuz, 2017). Así en la presente tesis doctoral nos centramos en dos de estas proteínas, HSP70 y HSP90.

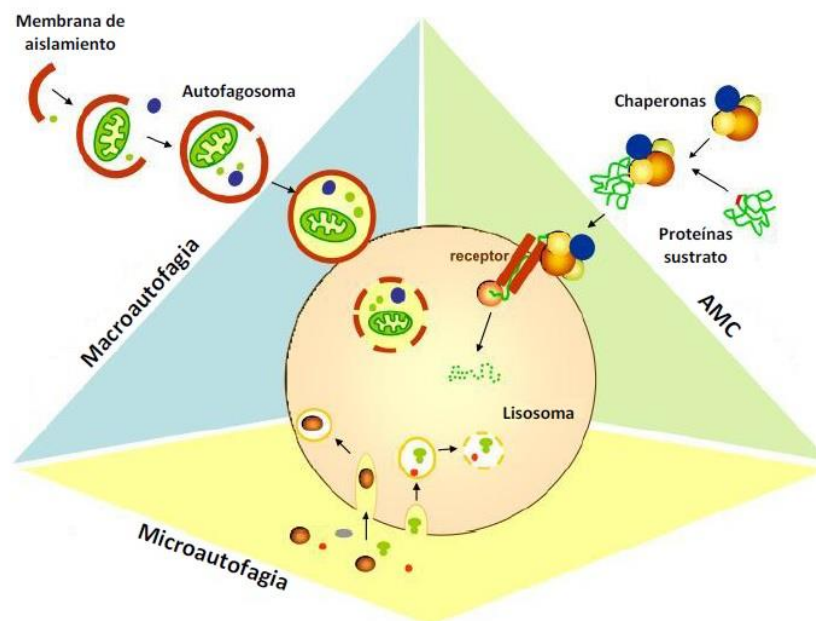
### **Autofagia**

Las células han desarrollado varios mecanismos para mantenerse en equilibrio dinámico con su entorno. La respuesta al estrés metabólico y terapéutico, y la eliminación de moléculas tóxicas requieren que las células activen la maquinaria autofágica. La autofagia es un mecanismo estrictamente regulado y altamente conservado en células eucariotas, que se encuentra en estado activo en condiciones basales para asegurar la renovación adecuada de los componentes celulares, y se sobreestimula cuando las condiciones del entorno son desfavorables para las células (Mizushima, 2007).

La autofagia es un proceso metabólico de degradación encargado de la eliminación de componentes celulares dañados, incluyendo proteínas, orgánulos y diferentes biomoléculas. Este mecanismo se caracteriza por la incorporación del material celular en una estructura de doble membrana, denominada fagóforo, que se elonga para, finalmente, cerrarse sobre sí misma y formar una vesícula llamada autofagosoma capaz de fusionarse con los lisosomas, constituyendo así el autofagolisosoma en cuyo interior se produce la degradación del contenido por acción de hidrolasas lisosomales (Tanida, 2011; Cui y cols., 2013). Este proceso, denominado macroautofagia, implica la participación del autofagosoma que actúa como portador de la carga citoplasmática. Sin embargo, la entrega de la carga a los lisosomas puede ser mediada por chaperonas que son reconocidas por el receptor lisosomal de membrana asociado a la proteína de membrana lisosomal (LAMP),

provocando su desplegamiento y degradación; o bien puede ser directamente engullida por el lisosoma (microautofagia) (Bejarano y Cuervo, 2010). Tras el catabolismo de los componentes dañados o nocivos en el lisosoma, los productos resultantes se liberan de nuevo al citoplasma para que puedan ser reutilizados en procesos de biosíntesis y generación energética (Parzych y Klionsky, 2014) (Figura 9).

Además, la autofagia también se clasifica, en función de la selectividad de la carga, en mitofagia (eliminación de mitocondrias dañadas), agregofagia (agregados de proteínas poliubiquitinizadas), lipofagia (lípidos), nucleofagia (núcleo), entre otros (Khaminets y cols., 2016).



**Figura 9.** Diferentes tipos de autofagia (Cuervo, 2010). AMC, autofagia mediada por chaperonas.

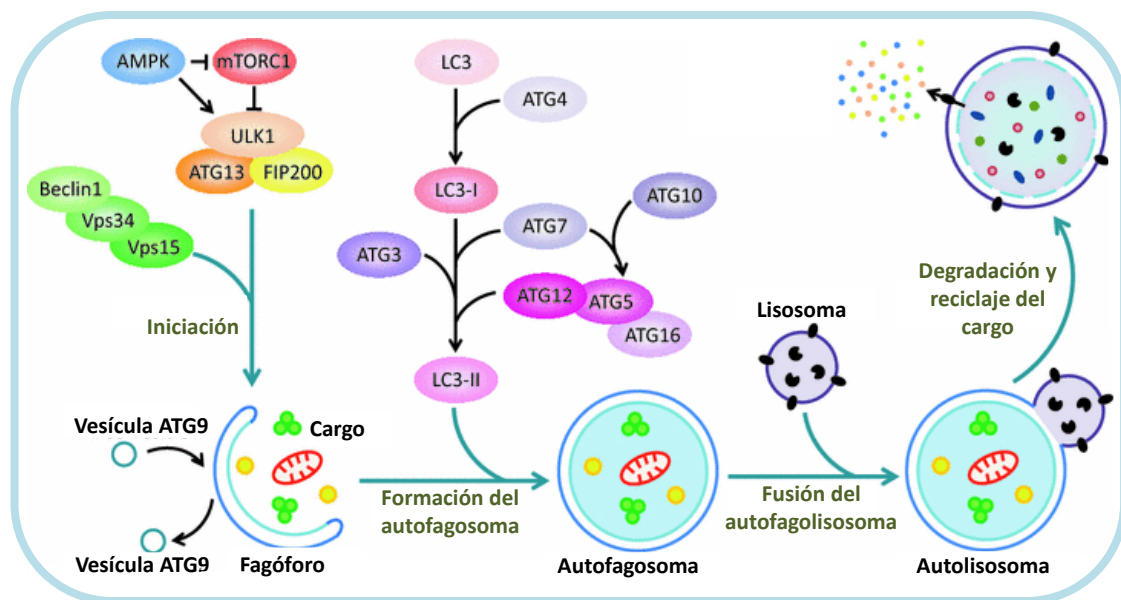
La autofagia constituye, por tanto, un mecanismo protector frente a la muerte celular en condiciones de estrés y presenta un importante papel en la defensa frente a enfermedades inflamatorias, degenerativas, infecciosas y neoplásicas (Cui y cols., 2013; Parzych y Klionsky, 2014; Czarny y cols., 2015). No obstante, la autofagia en el desarrollo del cáncer tiene carácter dual. Por una parte, puede actuar como supresor

tumoral evitando la proliferación tumoral durante el estrés oncogénico, pero también, al ser un mecanismo de protección celular, puede actuar promoviendo la supervivencia de las células tumorales. De hecho, algunos tipos de células cancerosas inducen la autofagia como mecanismo de adaptación al microambiente desfavorable del tumor, caracterizado por la privación de nutrientes, la hipoxia y el estrés metabólico. En este caso, además, favorece la metástasis y la resistencia a fármacos (Eskelinen, 2011).

### Maquinaria autofágica

La formación y maduración del autofagosoma es un proceso complejo que requiere la participación de un gran número de proteínas. El proceso comienza con la acción del complejo ULK1 (Quinasa 1 tipo Unc-51), integrado por ULK1, FIP200 y el Atg (gen relacionado con la autofagia) 13 el cual, en condiciones basales, se encuentra inhibido por el complejo mTORC1. Cuando la célula carece de suficientes sustratos energéticos, mTORC1 es inactivado, favoreciendo la estabilización de ULK1 en la membrana que será el origen del autofagosoma. Sin embargo, el complejo ULK1 no es suficiente para iniciar el proceso, puesto que precisa del complejo Beclina1-PI3K. Una vez que ambos grupos proteicos se hallan estabilizados en el fagóforo, la membrana comienza a expandirse. En este paso de la formación del autofagosoma es necesaria la acción de los Atg que regulan la adición de fosfatidiletanolamina a la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3). La LC3 se sintetiza inicialmente de forma no procesada como pro-LC3, la cual rápidamente es escindida por la acción del Atg4, generándose la forma activa LC3-I en el citosol. Posteriormente, al LC3-I se incorporan lípidos por la acción del Atg7 y del Atg3 que catalizan su unión a los residuos de fosfatidiletanolamina presentes abundantemente en la membrana del fagóforo. La importancia de LC3 en la autofagia reside en que es fundamental para el cierre de la vesícula posterior a la captación de la carga, dando así, origen al autofagosoma. Además, en la incorporación de los sustratos a la futura vesícula intervienen diferentes proteínas adaptadoras. Así por ejemplo, la degradación de mitocondrias está mediada por la correlación de la proteína de interacción con Bcl2 (BNIP3) o Parkin, con LC3 (Springer y Macleod, 2016). La

degradación de proteínas citosólicas es mediada por la proteína p62/sequestrosoma 1 (p62/SQSTM1), la cual tiene capacidad para capturar proteínas ubiquitinadas y fijarlas a LC3 en el autofagosoma permitiendo, así, una autofagia selectiva de ubiquitinados solubles y agregados proteicos (Abounit y cols., 2012). Una vez que la membrana se ha expandido y cerrado sobre sí misma rodeando al material celular, el autofagosoma formado es transportado hasta los lisosomas (Jager, 2004; Liang y cols., 2008). Los productos generados por acción de las proteasas lisosomales serán liberados hacia el citosol, donde podrán reutilizarse para el mantenimiento celular (Figura 10).



**Figura 10.** Circuito molecular y vías de señalización que regulan la autofagia (Modificado de Cui y cols., 2016).

### Regulación de la autofagia

La activación de la autofagia se produce en respuesta a diferentes factores. Los estímulos más potentes que ponen en marcha la maquinaria autofágica están relacionados con el estatus energético de la célula. Así, la falta de nutrientes, una baja relación entre los niveles de ATP y AMP, y elevados niveles de insulina mantienen reprimido el complejo mTORC1, permitiendo así la acción de ULK1. Además, el estrés oxidativo, un déficit en la disponibilidad de oxígeno, o la presencia de agentes

patógenos pueden también activar el proceso de autofagia mediante la modulación de diferentes vías de señalización (Mizushima, 2007; Fernández y cols., 2015; Tan y cols., 2016).

### Implicaciones fisiológicas y patológicas de la autofagia

La autofagia se ha considerado un mecanismo necesario en la función correcta de varios sistemas y mecanismos fisiológicos. Durante el desarrollo, en mamíferos, la autofagia se activa gradualmente en el ovocito fertilizado (Tsukamoto y cols., 2008) y es necesaria después del nacimiento para la provisión de nutrientes al neonato (Mizushima y cols., 2004). La autofagia también participa en la maduración de los eritrocitos promoviendo la degradación mitocondrial (Heynen y cols., 1985), y está involucrada en el metabolismo de los lípidos (Zamani y cols., 2017). Además, diferentes procesos activados en la respuesta inmune requieren de su activación. En este sentido, la autofagia contribuye al procesamiento del antígeno para la presentación del mismo al complejo mayor de histocompatibilidad (Münz, 2016), es necesaria para la degradación de patógenos durante la activación de la inmunidad innata (Gomes y Dikic, 2014), y parece estar estrechamente relacionada con la autoinmunidad (Dai y Hu, 2016). Sin embargo, la autofagia también parece estimular la infiltración de células inmunes en tumores promoviendo así la progresión de la enfermedad (Michaud y cols., 2011). Todo esto pone de manifiesto la complejidad de la vía en la respuesta inmune frente a tumores (Zhong y cols., 2016).

El papel de la autofagia en la formación del tumor está respaldado por estudios *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar, la autofagia actúa como un mecanismo supresor de tumores mediante la prevención del estrés oxidativo y la promoción de la estabilidad genómica (Liu y cols., 2013). En segundo lugar, la autofagia podría actuar como un mecanismo de supervivencia para proteger las células cancerosas de los agentes quimioterápicos en el tratamiento del cáncer (Wu y cols., 2012b). Se sugiere que la prevalencia de una u otra función es altamente dependiente del grado de desarrollo de la enfermedad, estando presente el papel protector de la autofagia frente al proceso tumoral solo en estadios tempranos. La sobreactivación de la

autofagia en etapas avanzadas se correlaciona positivamente con la malignidad y la capacidad de metástasis del tumor, así como la resistencia a la terapia (Mathew y cols., 2007; Lazova y cols., 2012; Li y cols., 2013; Mowers y cols., 2017).

Los primeros estudios sobre autofagia en animales *knockout* de diferentes proteínas autofágicas le atribuyeron una función de supresión tumoral (Qu y cols., 2003; Takamura y cols., 2011). Sin embargo, la autofagia también puede favorecer la promoción del tumor mediante la adaptación celular a la hipoxia o la inanición (Bellot y cols., 2009; Wong y cols., 2013) y el desarrollo del cáncer mediado por oncogenes (Guo y cols., 2011). Se demostró que se requiere una autofagia basal elevada para el crecimiento de células tumorales (Yang y cols., 2011b), lo que sugiere que la modulación de la autofagia podría ser importante para minimizar el crecimiento de cánceres agresivos. En relación al microambiente tumoral, la autofagia está presente en los fibroblastos asociados al cáncer, donde se encarga de la degradación de la proteína antitumoral caveolina-1 (Di Vizio y cols., 2009), y de la liberación de citocinas pro-migratorias (Lock y cols., 2014).

### Autofagia y CHC

La necesidad de la autofagia en diferentes procesos fisiológicos se pone de manifiesto por la aparición de patologías ante una sobreactivación o una represión de dicho mecanismo (Takamura y cols., 2011). La autofagia en el hígado es necesaria para mantener la integridad y funcionalidad del mismo. Tanto es así, que se ha visto una descompensación en este mecanismo en esteatosis hepática, en el daño producido por consumo crónico de alcohol y diferentes toxinas, en isquemia y reperfusión, y en el CHC. En el caso que nos ocupa, el cáncer de hígado, la autofagia está asociada a los diferentes agentes causantes de la enfermedad. Así, las infecciones por VHB y VHC o el alcohol estimulan el flujo autofágico que contribuye al desarrollo de la enfermedad (Czaja y cols., 2013).

Diferentes estudios *in vivo* han mostrado que el defecto de proteínas necesarias para la autofagia, como Beclina-1, ATG5 o ATG7 promueven el desarrollo del CHC; sin embargo, parece ser un mecanismo necesario para suplir la alta

demanda energética de las células tumorales (Qu y cols., 2003; Takamura y cols., 2011). Estudios *in vitro* demuestran el efecto procarcinogénico de la autofagia sobre la hepatocarcinogénesis al inducir la expresión de factores que estimulan la invasión celular y la metástasis (Li y cols., 2013) o al proteger las células de cáncer de hígado (Song y cols., 2011).

Si bien es cierto que se ha avanzado en el conocimiento del papel que juega la autofagia en el CHC, se hace necesario profundizar en los mecanismos que definen la importancia de este mecanismo en el establecimiento y progresión de la enfermedad.

### **Apoptosis**

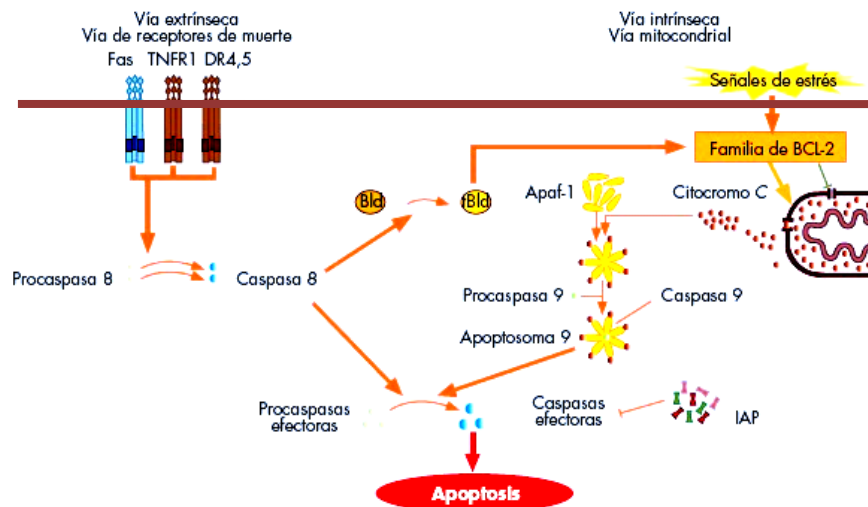
La apoptosis o muerte celular programada es una vía de pasos múltiples descrita por primera vez por Kerr y sus colegas en 1972 (Kerr y cols, 1972). En los últimos años, la apoptosis se ha convertido en un tema de creciente atención; de hecho, el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002 fue otorgado a Sydney Brenner, John E. Sulston y H. Robert Horvitz por sus descubrimientos relacionados con la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada (Jaryal, 2003).

Este proceso controlado tiene lugar tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, siendo inherente a cada célula del cuerpo. Dado que típicamente no induce la muerte celular adyacente, la inflamación o el daño tisular, existen varios mecanismos de control del crecimiento que coordinan la proliferación celular y la homeostasis tisular asociada a la apoptosis durante el desarrollo y el envejecimiento. Aunque varias afecciones pueden desencadenar apoptosis, la respuesta puede modularse según el tipo y el nivel de estímulos que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis.

En mamíferos, este proceso altamente coordinado consta de dos vías principales, una vía extrínseca o citoplasmática y una vía intrínseca o mitocondrial, e implica una activación dependiente de caspasas, un grupo de cisteína proteasas que vinculan los estímulos iniciales con la muerte celular final (Elmore, 2007).



En la vía extrínseca están implicados receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia del TNF. Además de participar en el proceso de apoptosis, participan en la activación de distintas vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular, respuesta inflamatoria, y diferenciación celular (Ashkenazi y Dixit, 1999). La mayoría de estas proteínas son potentes inductores de la vía de supervivencia celular mediada por NF- $\kappa$ B, mientras que otros miembros de la superfamilia del TNF pueden inducir la vía extrínseca de la apoptosis mediante su unión a los llamados receptores de muerte, como el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1), o Fas/CD95 (Wallach y cols., 1999). La unión específica de los ligandos (FasL/CD95L, TRAIL, TNF- $\alpha$ ) a sus receptores correspondientes provoca una señal proapoptótica inmediata. Se produce el reclutamiento de una molécula adaptadora, dominio de muerte asociado a Fas (FADD), y de la caspasa 8 en un complejo de señalización inductor de muerte, donde la caspasa 8 es activada por dimerización y escisión autoproteolítica, y posteriormente activa a otras caspasas efectoras que desencadenan la apoptosis. La vía intrínseca se activa en respuesta a un estrés celular como daño en el ADN, estrés del RE o privación del factor de crecimiento, e implica la permeabilización de la membrana externa mitocondrial principal. Por lo tanto, todo el contenido intermembrana de las mitocondrias se libera al citosol, incluido el citocromo c. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se une al factor 1 activador de proteasas apoptóticas (APAF-1) y forma un complejo llamado apoptosoma. Este último funciona reclutando monómeros de caspasa 9 para su activación. Las caspasas 8 y 9 de la vía extrínseca e intrínseca, respectivamente, son las llamadas caspasas de iniciación, y son responsables de la escisión y la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 (Green y Llambi, 2015) (Figura 11).



**Figura 11.** Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

En muchos tipos celulares, incluyendo a las células hepáticas, sin embargo, sólo pequeñas cantidades de caspasas iniciadoras son activadas en el complejo de señalización inductor de muerte, lo que resulta insuficiente para la muerte celular. Es por ello que en estas células la vía extrínseca debe ser amplificada por la vía intrínseca mitocondrial a través de la interacción de la caspasa 8 con Bid, una proteína proapoptótica de la familia de proteínas del gen Bcl-2, que subsecuentemente inicia junto con Bak y Bax (otros miembros de la familia Bcl-2), la liberación de mediadores proapoptóticos mitocondriales (Schwerk y Schulze-Osthoff, 2005). No obstante, la muerte apoptótica de hepatocitos se retrasa, pero no se inhibe en ratones deficientes en Bak/Bax, lo que indica que los hepatocitos pueden sufrir muerte celular en ausencia de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Hikita y cols., 2011).

#### Implicaciones fisiológicas y patológicas de la apoptosis

La apoptosis, como componente principal de la salud y la enfermedad, tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis corporal (Renehan y cols., 2001). En ciertas situaciones fisiológicas, como la eliminación de células inflamatorias o la evolución del tejido de granulación a tejido cicatricial, se necesita un aumento de

apoptosis (Greenhalgh, 1998); también se requiere para la eliminación de células inmunitarias autoagresivas durante la maduración en los órganos linfoides centrales (médula ósea y timo) o en los tejidos periféricos (Osborne, 1996). La desregulación de la apoptosis se ha asociado con diferentes patologías, incluidas defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración o cáncer (Elmore, 2007).

Las células cancerosas tienen la capacidad de eludir eficazmente la apoptosis (Fernald y Kurokawa, 2013). Esto se debe principalmente al hecho de que el equilibrio homeostático entre la muerte y la proliferación celular está sesgado, y como tal, las anomalías genéticas se multiplican a medida que estas células sobreviven (Sjöström y Bergh, 2001).

Una de las aberraciones genéticas más comunes asociadas con el cáncer es la pérdida o inactivación del supresor tumoral p53, ya que este desempeña un papel instrumental en las señales reguladoras celulares, específicamente aquellas involucradas en la proliferación celular, la reparación del ADN y la angiogénesis (Haupt y cols., 2003). En condiciones celulares normales, p53 permanece inactivo (Ashcroft y cols., 1999). La activación de p53 se produce cuando se estabiliza a través de interacciones proteína-proteína y de varias modificaciones postraduccionales. Una vez activado, p53 responde al estrés intracelular como la hipoxia, el agotamiento de nutrientes y el daño del ADN (Horn y Vousden., 2007), induciendo apoptosis o detención del ciclo celular (en las fases G1 y/o G2) (Vousden y Lane, 2007). De esta forma, p53 impide directamente el crecimiento celular descontrolado y el desarrollo tumoral (Bremer y Helfrich., 2006). La pérdida o disfunción de la señalización de p53 no solo está asociada con el inicio del proceso de formación del tumor, sino también con un mal pronóstico (Whibley y cols., 2009). Alternativamente, las células neoplásicas muestran una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas (como Bcl-2) mientras que las proapoptóticas (como Bax) están reguladas negativamente; además, parecen ser capaces de sintetizar receptores de muerte afuncionales, y de secretar altos niveles de receptores solubles para secuestrar el ligando Fas, evitando así la apoptosis (Elmore, 2007). Esta capacidad de las células cancerosas para evadir la apoptosis las hace no solo dependientes de estas aberraciones para su supervivencia

sino también para su resistencia a ciertos fármacos quimioterápicos (Bremer y Helfrich, 2006).

### Apoptosis y CHC

El desarrollo y la progresión de tumores hepáticos como el CHC, se ha asociado con una apoptosis insuficiente (Lee y cols., 2001; Che y cols., 2012; Hu y cols., 2015). Por tanto, las evidencias sugieren una apoptosis aberrante durante la hepatocarcinogénesis, especialmente en etapas tempranas y durante la promoción del tumor (Guicciardi y Gores, 2005). Además, varios estudios *in vitro* e *in vivo* analizan la contribución del bloqueo de vías relacionadas con la apoptosis, con el desarrollo y la progresión del CHC (Mauriz y Gonzalez-Gallego, 2008). A nivel molecular, se ha descrito una correlación inversa entre la expresión de Fas y la diferenciación tumoral (Strand y cols., 1996). Además, la expresión anormal de inhibidores de la apoptosis como la survivina, está directamente correlacionada con recurrencia tumoral y mal pronóstico (Ye y cols., 2007).

Por la implicación que tienen los mecanismos moleculares expuestos, en la supervivencia y muerte celular, así como por la compleja regulación de los mismos y su intrincada interconexión, se hace realmente interesante el estudio de todos ellos en el proceso carcinogénico así como en la respuesta de los tumores a los tratamientos terapéuticos.

## **2.4 Ritmos circadianos**

Los ritmos biológicos existen en todos los organismos vivos y podemos considerar que todos los procesos y funciones biológicas están organizados en dos niveles: en el espacio, como una anatomía física, y en el tiempo, como una estructura temporal biológica (Smolensky y Peppas, 2007; Sewlall y cols., 2010).

El entorno externo está en constante cambio y aunque algunos de estos cambios son únicos, muchos eventos se manifiestan como variaciones periódicas o

rítmicas a lo largo del tiempo. Si la variable que cambia es biológica y endógena, la oscilación observada se puede referir objetivamente como un ritmo biológico. Como regla, los ritmos se clasifican en tres grupos principales: circadiano (20-28 horas), ultradiano (<20 horas) e infradiano (> 28 horas) (Sewlall y cols., 2010).

La mayoría de organismos han desarrollado mecanismos endógenos de control que les permiten no solo adaptarse sino también anticipar estos eventos cíclicos. Casi todos los organismos, desde los eucariotas complejos, incluidos los diferentes tipos celulares en mamíferos, hasta los procariontes, especialmente cianobacterias, poseen un reloj circadiano endógeno con una periodicidad cercana a las 24 horas (Kondo e Ishiura, 2000). Este reloj es responsable de la sincronización de las señales ambientales que generan los ritmos circadianos y las oscilaciones periféricas diarias en los tejidos (Fu y Lee 2003), y está compuesto por bucles de retroalimentación transcripcionales intracelulares que miden estos patrones, regulando así nuestra actividad metabólica, hormonal y conductual diaria (Reppert y Weaver, 2002).

Aunque los ritmos circadianos internos en los mamíferos se conocen desde hace siglos (Clairambault, 2010), la naturaleza molecular de estas oscilaciones se han descrito recientemente (Hastings y cols., 2003). Estos ritmos son generados por un reloj biológico central o “maestro”, localizado en una estructura hipotalámica denominada núcleo supraquiasmático (NSQ) en el sistema nervioso central, y por relojes localizados en células de diversos tejidos, conocidos como osciladores periféricos (Reppert y Weaver, 2002; Schibler y cols., 2003).

En los últimos años se han identificado los mecanismos que controlan rítmicamente otros procesos moleculares, fisiológicos, bioquímicos y conductuales, incluidos el metabolismo y la detoxificación de fármacos, el ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la angiogénesis (Takahashi y cols., 2008; Kang y Sancar, 2009; Innominato y cols., 2010; Jouffe y cols., 2013).

Los relojes circadianos también juegan un papel en varios aspectos que se relacionan con el metabolismo (Lévi y cols., 2007a; Nakahata y cols., 2009; Cho y cols., 2012; Guerrero-Vargas y cols., 2017), y se encuentran estrechamente unidos al

ciclo celular (Matsuo y cols., 2003; Gréchez-Cassiau y cols., 2008; Bieler y cols., 2014; Matsu-Ura y cols., 2016; El-Athman y cols., 2017). En mamíferos, dentro de los tejidos, el metabolismo de los nutrientes y la energía se organiza temporalmente para sincronizar el almacenamiento y la utilización de la energía con los ciclos diarios de luz/oscuridad. Las hormonas circulantes y los metabolitos muestran distintos ritmos diurnos a medida que alcanzan su punto máximo y disminuyen a lo largo del día. Se ha descrito que la expresión de varios genes metabólicos se limita a tipos de tejidos específicos, lo que indica que estas rutas metabólicas no solo son específicas de tejido sino que también están limitadas a períodos específicos durante el día (Ma y cols., 2012). Esto sugiere que tanto el metabolismo de los nutrientes como el de la energía están estrechamente relacionados con las señales de sincronización en los diferentes tejidos. Además, como resultado del ciclo continuo de este ritmo circadiano intrínseco, se pueden predecir aspectos rítmicos tanto de la proliferación celular como del metabolismo (Mormont y Levi, 2003).

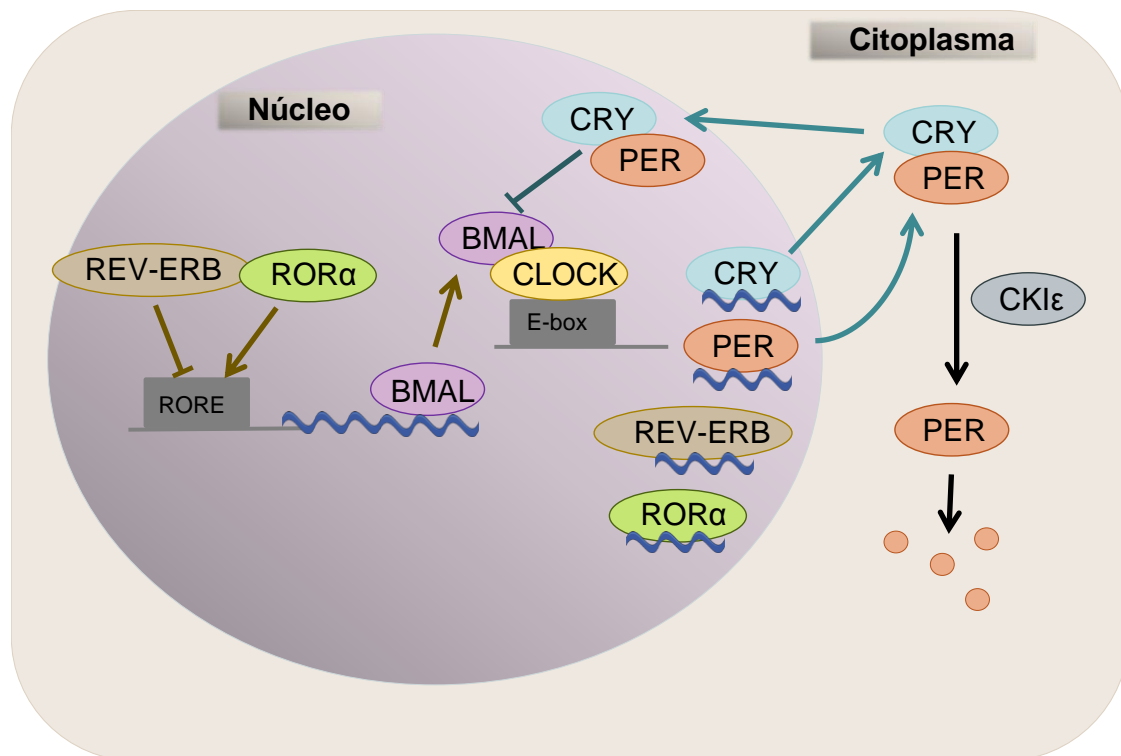
De acuerdo con las estrechas conexiones existentes entre el reloj circadiano, el metabolismo y el ciclo celular, múltiples estudios han descrito que la alteración sistémica del sistema circadiano puede promover el cáncer. En los humanos, las perturbaciones en el patrón sueño-vigilia y en los ritmos circadianos, se han asociado con el cáncer de mama, colon y pulmón (Schernhammer y cols., 2001; 2003; 2013; Wegrzyn y cols., 2017). En ratones, la alteración ambiental del sistema circadiano (por ejemplo, el *jet lag* severo y crónico) aumenta el riesgo de cáncer de mama y CHC (Van Dycke y cols., 2015; Kettner y cols., 2016). Además, se ha demostrado, en un modelo murino de adenocarcinoma de pulmón humano, que tanto la disrupción ambiental como la genética del sistema circadiano promueven el crecimiento tumoral y disminuyen la supervivencia (Papagiannakopoulos y cols., 2016).

#### **2.4.1 Genes reloj y mecanismo molecular del reloj circadiano**

Estudios de mutagénesis en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), llevados a cabo por los galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2017: J.C. Hall, M. Rosbash y M.W. Young, permitieron identificar moscas mutantes

con alteraciones en el ritmo circadiano. La caracterización y análisis de estas mutantes permitió descubrir un pequeño número de genes involucrados en generar y mantener el ritmo circadiano en estos insectos. A este grupo de genes se les denominó genes reloj o “clock genes”. Posteriormente, se clonaron los genes homólogos en los mamíferos y se identificaron nuevos genes reloj a partir de hámsteres o ratones mutantes.

El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos, involucra la interacción de señales positivas y negativas que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj (Partch y cols., 2014). Así, la expresión de estos genes se regula por medio de dos asas de activación/represión transcripcionales. El asa de señales positivas está controlada por el receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo (Bmal1), junto con Clock (del inglés, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), o Npas2 (del inglés, *Neuronal PAS domain-containing protein 2*). Estos forman heterodímeros (BMAL1/CLOCK o BMAL1/NPAS2) que activan la transcripción de los genes del periodo (Per1, Per2 y Per3) y los genes del criptocromo (Cry1 y Cry2). El asa de señales negativas está controlada por las proteínas CRY y PER que son transportadas al citoplasma, y forman los complejos PER/CRY que, posteriormente, se translocan al núcleo y se asocian con el heterodímero BMAL1/CLOCK, inhibiendo y reduciendo la activación transcripcional de BMAL1 y CLOCK, y suprimiendo su propia transcripción génica. Los complejos PER/CRY son posteriormente fosforilados por la caseína quinasa 1 epsilon (CK1ε), lo que conduce a la degradación de PER y CRY. Otro asa de retroalimentación negativa está representada por los receptores nucleares REV-ERBα y β, también conocidos como NR1D1 y NR1D2 (receptor nuclear subfamilia 1, grupo D, miembros 1 y 2) y por el receptor nuclear de ácido retinoico alfa (RORα), que se translocan al núcleo para reprimir y promover la expresión de BMAL1, respectivamente (Kochan y Kovalchuk, 2015) (Figura 12).



**Figura 12.** Mecanismo molecular del reloj circadiano.

Por otro lado, es de interés la histona deacetilasa sirtuina 1 (SIRT1) por su implicación en la regulación del reloj circadiano, y también en múltiples procesos de enfermedad que incluyen el cáncer (Maiese y cols., 2017). SIRT1 y PER2 constituyen un circuito de regulación negativo recíproco desempeñando así un importante papel en la modulación de la ritmicidad circadiana hepática (Asher y cols., 2008; Wang y cols., 2016).

#### 2.4.2 Genes reloj y cáncer

Estudios clínicos y experimentales en animales han revelado que una serie de genes, proteínas y enzimas en el hígado están controlados, en gran medida, por ritmos circadianos (Zhou y cols., 2016). Se ha demostrado que la alteración de estos ritmos conduce a un mayor riesgo de cáncer, y que los genes "reloj" influyen en los mecanismos relacionados con la tumorigénesis como la proliferación celular (Wang y cols., 2015), la apoptosis (Hua y cols., 2006) y el control del ciclo celular (Sun y cols.,



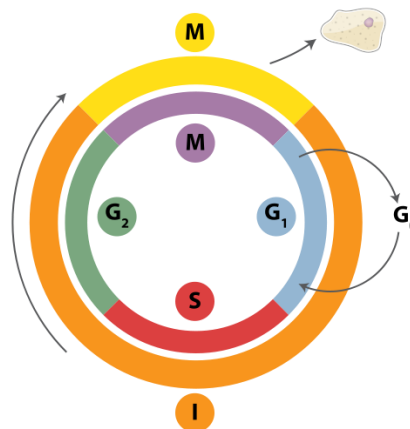
2010), lo que conduce a la aparición y progresión de muchos tipos de cáncer, incluido el CHC (Kelleher y cols., 2014).

En el cáncer, la cronoterapia ha adquirido un creciente interés desde el punto de vista médico, ya que propone un mejor entendimiento y manipulación de la fisiología de la enfermedad, utilizando las variaciones circadianas como parte del tratamiento (Innominato y cols., 2014).

En vista del hecho de que el cáncer es un proceso en el que se produce un crecimiento incontrolado de células neoplásicas, junto con la diseminación de las mismas, los mecanismos subyacentes que explican el cáncer como un trastorno circadiano implican la comunicación, principalmente, entre el reloj circadiano y el ciclo celular, y los procesos de reparación del ADN (Lévi y cols., 2007a).

### **2.4.3 Reloj circadiano y ciclo celular**

El reloj circadiano comparte varias similitudes conceptuales y moleculares con el ciclo celular. Ambos están constituidos por bucles autorreguladores interconectados, y se basan en fases secuenciales de transcripción, traducción, modificación postraduccional y degradación (Sahar y Sassone-corsi, 2009). Para dividirse, las células experimentan una secuencia de eventos moleculares y bioquímicos que controlan el ciclo de división celular a través de cuatro fases secuenciales distintas llamadas Gap 1 (G1), S (para la síntesis del ADN), G2 y M (para la mitosis). Las tres primeras se denominan interfase, en G1 existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, en fase S se produce la replicación o síntesis del ADN, y en fase G2 la célula comprueba que la replicación del ADN está completa y se prepara para la división celular. La fase final denominada M implica la separación de los cromosomas (mitosis), seguida de la división celular (Figura 13). Dos clases clave de moléculas reguladoras, ciclinas y quinasas dependientes de ciclina, determinan el progreso de las células a lo largo del ciclo celular (Lévi y cols., 2007a; Sukumaran y cols., 2010).



**Figura 13.** Representación esquemática del ciclo celular.

En algunas células, el ciclo celular parece estar sincronizado con el tiempo circadiano que conduce, directamente, a la puesta en marcha del ciclo celular o, indirectamente, a través de variaciones circadianas en los niveles del factor de crecimiento, a la entrada de las células en la fase G<sub>1</sub>, lo que explica por qué la división celular opera en una escala de tiempo de 24 horas (Lowrey y Takahashi, 2004; Goldbeter y Gérard, 2012). El entorno celular dependiente del tiempo, como los niveles hormonales, y pueden afectar no solo al ciclo celular, sino también a la función inmune y humoral (Sephton y Spiegel., 2003).

Interconectados con el ciclo celular también están, la reparación del ADN, la apoptosis y la necrosis, los cuales limitan la inestabilidad genómica y evitan que las mutaciones genéticas se acumulen y, eventualmente, provoquen una transformación tumoral (Lévi y cols., 2007b). Se ha demostrado que muchas de las ciclinas, genes supresores de tumores y oncogenes que participan en procesos de regulación como la síntesis de ADN, mitosis y reparación del ADN muestran una ritmicidad circadiana en su expresión y están bajo el control de los genes del reloj central (Kondratov y Antoch, 2007; Sukumaran y cols., 2010). Los genes del ciclo celular afectados por el reloj circadiano incluyen los genes relacionados con los puntos de control del ciclo celular como las ciclinas D, B, E y A, el protooncogén c-Myc, la quinasa antimitótica Wee, el gen supresor tumoral p53 (que regula la apoptosis y detiene el ciclo celular

en la fase G1 activando la transcripción de p21, desempeñando un papel crítico en el punto de control G1-S, p21 (que evita la progresión del ciclo celular de la fase S a G2) y caspasas, entre otros. Algunos de ellos, como el factor de transcripción Wee1 quinasa y c-Myc, se han identificado como dianas de transcripción del complejo CLOCK-BMAL1 (Kondratov y Antoch, 2007). Además de controlar la expresión de los genes del ciclo celular y los genes supresores de tumores a nivel transcripcional y postranscripcional, los genes circadianos centrales también participan directamente en la modulación de las vías de señalización intracelulares de la proliferación celular (Fu y Lee, 2003). Así, un desequilibrio en los genes circadianos favorece la proliferación e inestabilidad genómica, la disminución de la apoptosis, y la aceleración de la progresión tumoral (Rana y Mahmood, 2010).

Diversos estudios demuestran que las mutaciones en los genes circadianos centrales o las alteraciones en su expresión, afectan mecanismos moleculares específicos predisponiendo a la carcinogénesis (Wood y cols., 2008; Innominato y cols., 2010; Savvidis y Koutsilieris, 2012).

## **2.5 La melatonina**

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina altamente conservada y derivada de la serotonina. Es la principal hormona secretada por la glándula pineal, aislada por primera vez por el dermatólogo Aaron Lerner y colaboradores. Estos autores revelaron que la hormona era capaz de inducir la agregación de la melanina en los melanocitos de la piel de rana, aumentando su transparencia (Lerner y cols., 1958). De hecho, el nombre que propusieron surge de la combinación de la palabra griega "melas" (negro) tomada de "melanina", y "tonina" tomada de serotonina.

Después de los experimentos fallidos de Lerner para usar extractos de glándula pineal para el tratamiento del vitíligo, varios estudios señalaron la importante implicación de la melatonina en el cerebro y la fisiología de las gónadas,

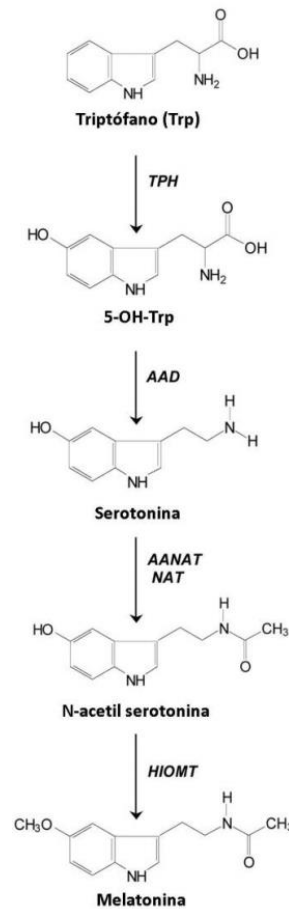
estableciendo un posible papel de esta molécula en la regulación de diferentes sistemas neuroendocrinos y presentando la idea de que la melatonina actúa como una hormona. Los estudios realizados para descifrar las propiedades de la melatonina revelaron que la iluminación afecta su síntesis a través de la captura de luz por los ojos y su conducción hacia la glándula pineal a través de las vías neuronales, y establecieron los primeros conocimientos sobre la síntesis y metabolismo de la melatonina (Wurtman y Axelrod, 1965). Estos descubrimientos revelaron que la melatonina ejerce un conjunto heterogéneo de actividades más allá de su papel regulador neuroendocrino-reproductivo modulado por el fotoperíodo.

### **2.5.1 Síntesis, metabolismo y regulación**

La melatonina presenta una ritmicidad circadiana y precisa de oscuridad para su producción y liberación (Jiménez-Jorge y cols., 2005). Como se mencionó anteriormente, la síntesis de melatonina tiene lugar, principalmente, en la glándula pineal pero su producción no es exclusiva de este órgano. La retina, el tracto gastrointestinal, la médula ósea, la glándula lagrimal extraorbital y la glándula de Harder también tienen capacidad de sintetizar melatonina. Sin embargo, la síntesis de melatonina extrapineal no está regulada por la luz, y su liberación a sangre parece no ser significativa.

La producción máxima de melatonina ocurre durante la noche. La luz es detectada por la melanopsina, un fotopigmento presente en las células ganglionares de la retina, y se transfiere al NSQ a través del tracto retinohipotalámico del nervio óptico. El sistema nervioso central y periférico conduce la señal a los pinealocitos, que son las células especializadas de la glándula pineal (Zawilska y cols., 2009). La melatonina surge del aminoácido esencial L-triptófano en un subconjunto de reacciones (Figura 14). El L-triptófano se convierte en serotonina a través de una hidroxilación y descarboxilación controlada por las enzimas triptófano hidroxilasa (TPH) y aminoácido aromático descarboxilasa (ADD). A continuación, se produce la acetilación de la serotonina por la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT). Esta actividad aumenta de un 30 a un 70% durante la noche, presentando un

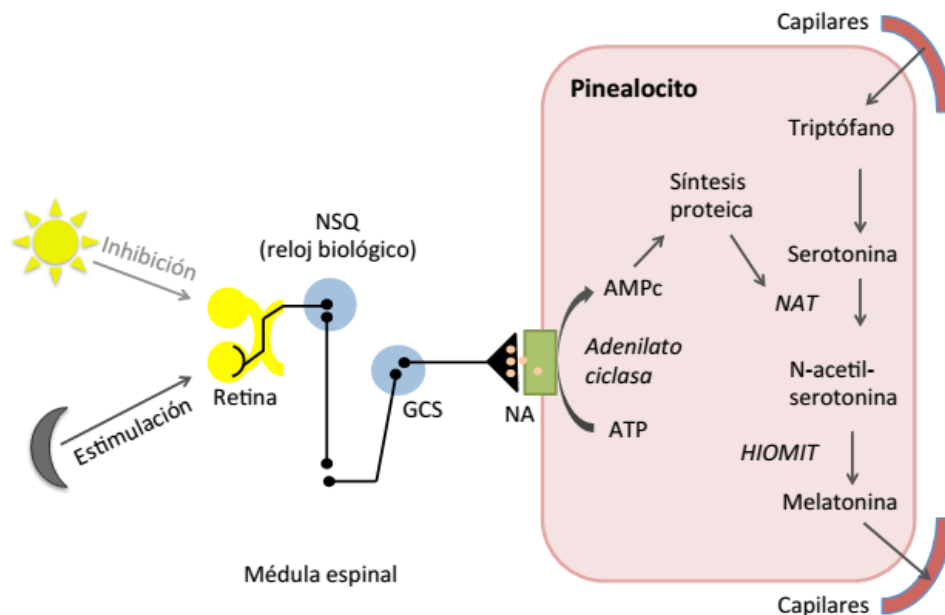
marcado ritmo circadiano y obteniéndose como producto la N-acetil-5-hidroxitriptamina o N-acetil serotonina (Klein y cols., 1997). Finalmente, se produce la conversión de la N-acetil serotonina en N-acetil-5-metoxitriptamina, melatonina, mediante la acción de la enzima hidroxindol O-metiltransferasa (HIOMT) (Karasek y Winczyk, 2006).



**Figura 14.** Biosíntesis de la melatonina. TPH, triptófano hidroxilasa; AAD, aminoácido aromático descarboxilasa; AA-NAT, arilalquilamina N-acetil-transferasa; HIOMT, hidroxindol O-metiltransferasa.

La actividad de la AA-NAT determina el ritmo pineal de producción hormonal y puede regularse mediante su expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (Hardeland, 2008). La expresión de la enzima se puede regular por una vía nerviosa controlada por el NSQ del hipotálamo, el llamado reloj biológico. Esta vía comienza en la retina y continúa a través de los axones de las células ganglionares

(Lewy y cols., 1980). El estímulo lumínico durante el día mantiene hiperpolarizados a los fotorreceptores, lo que impide la liberación al final de la vía nerviosa de noradrenalina. En ausencia de luz, los fotorreceptores generan potenciales de acción que son conducidos por esta vía neuronal hasta los terminales simpáticos que liberan noradrenalina, que se une a receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  del pinealocito (Reiter, 1991). Dicha unión desencadena una reacción bioquímica intracelular que se traduce en un incremento de la expresión y actividad de la AA-NAT, con la consecuente elevación de las concentraciones de N-acetil serotonina y melatonina (Hardeland y cols., 1993) (Figura 15).



**Figura 15.** Estimulación o inhibición de la síntesis de melatonina.

La metabolización de la melatonina se produce en el hígado y el riñón. Después de su hidroxilación por acción de CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, la 6-hydroxymelatonina se conjuga con sulfato (90%) o glucurónido (10%), y solo un 5% de la melatonina se excreta sin metabolizar. La degradación de la melatonina también ocurre en el cerebro y la retina, pero las vías en estos órganos difieren de la metabolización de la melatonina producida en la glándula pineal e implican la desacetilación de la indoleamina (Zawilska y cols., 2009). En otras células, la

formación del compuesto hidroxilado depende de radicales libres (Singh y Jadhav, 2014).

La producción de melatonina es variable a lo largo del día, pero es constante día a día. En adultos humanos, la amplitud del ritmo difiere entre los sujetos disminuyendo con la edad y el grado de percepción de la luz. Además, los niveles de melatonina y los ritmos de secreción se alteran en condiciones patológicas (Zawilska y cols., 2009).

### **2.5.2 Funciones**

Quizás la primera y una de las funciones mejor establecidas de la melatonina es su capacidad para regular los ritmos circadianos y las respuestas estacionales. Sin embargo, varios trabajos de investigación sugieren que la melatonina tiene un importante papel en otras muchas funciones fisiológicas y bioquímicas (Pandi-Perumal y cols., 2013).

Tras su implicación en el control de los ritmos circadianos y la regulación de la reproducción, la propiedad más famosa de la melatonina es su capacidad antioxidante puesto que secuestra las especies reactivas de oxígeno (EROS) y potencia la actividad del sistema antioxidante celular (Reiter y cols., 1997), característica con gran impacto en el desarrollo de diferentes enfermedades (Reiter y cols., 2016). La melatonina, además, modula el sistema inmunitario controlando la respuesta inmune innata y adaptativa, posee propiedades antiinflamatorias (Calvo y cols., 2013), mantiene ciertas funciones del sistema cardiovascular (Domínguez-Rodríguez y cols., 2010) y controla los daños que genera el estrés oxidativo en la diabetes (Zephy y Ahmad, 2015).

En lo que respecta al hígado, un amplio número de estudios han demostrado el papel protector de la melatonina en diferentes situaciones fisiopatológicas, como en el caso del daño por isquemia y reperfusión hepática (Kim y Lee, 2008; Ambriz-Tututi y cols., 2009; Pandi-Perumal y cols., 2013), por ligadura del conducto biliar (Tahan y cols., 2010), o el daño por estrés oxidativo inducido (Mauriz y cols., 2007).

También se ha atribuido a la melatonina un papel relacionado con la supresión de la activación de las células hepáticas estrelladas en modelos *in vitro* (Gu y cols., 2006; Shajary y cols., 2015). Además, se ha demostrado que la administración de melatonina a roedores previene la fibrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (Ogeturk y cols., 2008; Hong y cols., 2009; Liedke y cols., 2013; Crespo y cols., 2015; González-Fernández y cols., 2017), mejora la hepatitis no alcohólica inducida por una dieta deficiente en metionina y colina (Tahan y cols., 2009) e impide la hepatotoxicidad inducida por diferentes fármacos (Kurus y cols., 2009). La melatonina también protege contra el daño hepático inducido por agentes químicos como la tioacetamida (Cruz y cols., 2005; Túnez y cols., 2007), o DEN (Tahan y cols., 2004; Sánchez y cols., 2017).

Diferentes estudios epidemiológicos, en trabajadores nocturnos y básicos llevados a cabo con animales, han sugerido la existencia de una relación entre la ausencia de melatonina y el desarrollo de diferentes procesos tumorales (Haus y Smolensky, 2013). Desde entonces, se han realizado innumerables investigaciones sobre el posible papel oncostático de la melatonina, desde estudios *in vitro* hasta clínicos, mostrando la capacidad citotóxica de la melatonina frente a diferentes tipos tumorales, su importancia en la mejora de la calidad de vida del paciente oncológico, así como en la potenciación del efecto antitumoral de varios agentes quimioterápicos (Aldeghi y cols., 1994; Lissoni, 2007; Prieto-Domínguez y cols., 2016). Aunque los mecanismos por los que la melatonina ejerce esta función oncostática son numerosos, la compleja interrelación de todos ellos no se ha descifrado por completo. En el CHC, la melatonina ejerce funciones anti-proliferativas, pro-apoptóticas y antiangiogénicas (Martín-Renedo y cols., 2008; Carbajo-Pescador y cols., 2013a; 2013b).

### **2.5.3 Mecanismos de acción**

Algunas de las funciones de la melatonina parecen depender de sus propiedades antioxidantes. No obstante, se han descrito dentro de los mecanismos de acción de la melatonina en mamíferos, interacciones con proteínas intracelulares



como la calmodulina o la unión a receptores específicos, (Ekmekcioglu, 2006). En humanos, las acciones ejercidas por la melatonina pueden lograrse sin mediación de receptores debido a su naturaleza anfipática, una propiedad que le permite cruzar cualquier barrera biológica, o bien ser mediadas por receptores de membrana, receptores nucleares, o receptores citosólicos (Dubocovich y cols., 2010). En este sentido, los compuestos agonistas y antagonistas de los receptores de la melatonina resultan ser claves para definir los múltiples mecanismos mediante los cuales esta indolamina modula los procesos fisiológicos y patológicos.

Mediante agonistas marcados se han identificado receptores de membrana de la melatonina (MT), concretamente, MT1 y MT2. El MT1 presenta mayor afinidad por la melatonina y es el receptor predominante. El sistema nervioso concentra una gran cantidad de estos, pero también se expresan en hígado, corazón, riñón, células inmunes e intestino (Zawilska y cols., 2009), así como en líneas celulares de cáncer humano de diferente origen (Chan y cols, 2002, Imbesi y cols., 2008; Ramracheya y cols., 2008). Estos receptores de membrana están acoplados a proteínas G. La unión de la melatonina a los MTs estimula la acción de la proteína G a la que están ligados e inhiben la adenilato ciclasa, reduciendo los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y activando la producción de fosfolipasa C y diacilglicerol, que actúan como segundos mensajeros dentro de la célula. El MT2 está asociado con la activación de vías similares de segundos mensajeros, y parece estar altamente relacionado con la inhibición de guanósín monofosfato cíclico (cGMP) en lugar de cAMP (Emet y cols., 2016). Algunos autores proponen la existencia de un tercer receptor de membrana, MT3, una flavoproteína citosólica también conocida como NQO2, perteneciente a una familia de quinonas reductasas, y que parece estar implicada en los efectos antioxidantes de la melatonina (Volkova y cols., 2012).

Además, teniendo en cuenta sus características lipofílicas, la melatonina puede atravesar directamente las membranas celulares e interactuar con receptores nucleares retinoides (ROR/RZR) que parecen mediar en las acciones inmunomoduladoras de la melatonina (Emet y cols., 2016), aunque existe cierta controversia sobre el papel que juegan estos receptores en los mecanismos de acción

del indol. Algunos estudios sugieren que, una vez unida la melatonina, los ROR/RZR podrían actuar como factores de transcripción de genes implicados en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Steinhilber y cols., 1995).

Los receptores citosólicos se ha identificado como un equivalente a la quinona reductasa 2; sin embargo, presentan una afinidad por la melatonina menor que los receptores de membrana (Volkova y cols., 2012).

Las acciones de la melatonina independientes de receptor están relacionadas con su actividad antioxidante. La melatonina es efectiva eliminando las EROS en la mitocondria, y la presencia de la enzima limitante en la síntesis de melatonina en las mitocondrias y cloroplastos destaca la importancia de esta hormona en la fisiología de las mitocondrias, aunque no se ha demostrado una vía de síntesis mitocondrial (Tan y cols., 2013).

#### **2.5.4 Melatonina y cáncer**

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en trabajadores nocturnos revelan un aumento en la frecuencia de desarrollo de cáncer en estas personas. Y, aunque las evidencias no son lo suficientemente fuertes, la IARC concluyó en 2007 que las actividades que promueven la alteración circadiana pueden actuar como carcinógenos (Grupo de trabajo de la IARC sobre la evaluación de riesgos carcinogénicos para los humanos, 2010).

Además, experimentos en modelos animales en los que se suprime la producción de melatonina han demostrado una correlación positiva con el crecimiento tumoral, así como una relación entre la desregulación de varios genes del reloj circadiano que controlan la proliferación celular y el ciclo celular con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Haus y Smolensky, 2013).

La melatonina ha mostrado efectos oncostáticos sobre el CHC, con propiedades antiproliferativas, proapoptóticas y antiangiogénicas en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 (Martín-Renedo y cols., 2008; Carbajo-Pescador y

cols., 2009; 2011; 2013a; 2013b). Algunos de estos efectos también han sido validados en modelos animales de CHC (Moreira y cols., 2015).

Además de la aplicación directa de la melatonina como agente oncostático, se ha demostrado una capacidad de potenciar los efectos tóxicos de la quimioterapia *in vitro* (Glenister y cols., 2013; Bennukul y cols., 2014), así como del fármaco antineoplásico Sorafenib (Prieto-Domínguez y cols., 2017), mejorando la citotoxicidad y reduciendo los efectos secundarios (Lissoni, 2007). Estos datos señalan que la melatonina es una alternativa interesante para la quimioterapia convencional, así como un agente coadyuvante para tratamientos comunes respaldando, así, su uso en estudios preclínicos.

Los estudios clínicos en los que se administra melatonina a pacientes con cáncer son limitados. Pacientes con diferentes tipos de tumores, incluyendo el CHC, y diferentes grados de enfermedad han sido incluidos en estos ensayos. Los resultados obtenidos indican que la melatonina aumenta la tasa de supervivencia y el alivio de los signos y síntomas de la enfermedad, reduciendo los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia convencionales mejorando, así, la calidad de vida de los pacientes (Ghielmini y cols., 1999; Lissoni y cols., 2003; Sánchez-Barceló y cols., 2012; Rondanelli y cols., 2013).

A pesar de todos estos datos, se requieren estudios adicionales para confirmar el uso de la melatonina en pacientes con cáncer; además, se deberían investigar diferentes dosis, tiempos de administración y combinaciones con otros agentes anticancerosos en modelos animales apropiados, así como los diferentes mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del CHC y que pueden servir de diana para la hormona melatonina.



### ***3 OBJETIVOS***

---



El principal objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de la melatonina en un modelo animal de CHC desarrollado en ratones tras la administración del carcinógeno DEN, así como en la línea celular de hepatocarcinoma humano Hep3B, centrando la investigación en diversas vías de señalización que se relacionan con el desarrollo y la progresión tumorales.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos concretos:

- Determinar las alteraciones moleculares y el daño hepático que se producen tras la administración del carcinógeno DEN comprobando, así, la idoneidad del modelo animal experimental de CHC elegido para nuestro estudio.
- Evaluar los efectos de la administración de la melatonina sobre el daño hepático inducido por DEN en el modelo animal de CHC, así como sobre diferentes proteínas supresoras de tumores y reguladoras del ciclo celular, la proliferación, la angiogénesis, la apoptosis, la respuesta autofágica y el estrés de retículo endoplasmático, en los distintos periodos experimentales.
- Valorar los efectos de la melatonina sobre las alteraciones inducidas por el carcinógeno en el eje de señalización de la SphK/S1P, así como en otras vías relacionadas, tales como la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAPKs, que han demostrado ser cruciales y estar alteradas en el CHC.
- Evaluar el papel de la melatonina en la regulación del ritmo circadiano y de los genes reloj implicados en su control, tanto en el modelo animal como en células de la línea de hepatocarcinoma humano Hep3B, y establecer si dicho efecto modula, a su vez, otras vías de señalización implicadas en el desarrollo y la progresión del CHC.





## ***4 MATERIAL Y MÉTODOS***

---



#### 4.1 Material

Para el presente estudio se han utilizado los siguientes medios instrumentales:

- Autoclave: Raypa, modelo Sterilmatic.
- Balanzas de precisión: Mettler Toledo, modelo AB104-S; Mettler Toledo, modelo PB1501-S.
- Baños termostáticos: Selecta, modelo 135925; Selecta, modelo CE95; Selecta, modelo Unitronic 32.
- Centrífugas: Beckman, modelo XL-10k, rotor 70:1 Ti; Eppendorf, modelo 5451C; Sorvall, modelo RC-5B.
- Cubeta electroforesis vertical: Bio-Rad, modelo Mini-PROTEAN Tetra Cell.
- Espectrofotómetro: NanoDrop 1000, Thermo Scientific.
- Fuente de alimentación: Bio-Rad, modelo 200/2.
- Lector Multi-Modal de Microplacas: Synergy HT, BioTek.
- Material quirúrgico: bisturís (hoja 24), pinzas, tijeras, agujas, jeringuillas, cánulas, guantes estériles, etc.
- Material de laboratorio de carácter general: pipetas y micropipetas automáticas, agitadores de tubo, gradillas, frigoríficos, arcones congeladores de -80°C, ordenadores, etc.
- Microscopios ópticos: Nikon OPTIPHOT-2®; Nikon Eclipse E 400®; Nikon Provis AX 70®.
- Microscopio electrónico de transmisión: JEOL LTD.
- Microscopio de fluorescencia: Nikon Eclipse Ti®.
- Microtomo de rotación: Leitz 1512.

- pHmetros: Mettler Toledo, modelo SevenMulti™.
- Sistema de transferencia de proteínas: Bio-Rad, modelo Trans-Blot®.
- Homogeneizador de ultrasonidos compacto de tipo sonda: Hielscher-Ultrasound Technology, modelo UP50H.
- Termociclador: Applied Biosystems, modelo Step One Plus Sequence Detection System.
- Ultramicrotomo automático: Reichert Ultracut E.

## 4.2 Soluciones

Las principales soluciones y productos utilizados en la realización de este estudio, y que no se describen con detalle en los apartados correspondientes, han sido los siguientes:

- Solución salina fisiológica (SSF): NaCl 154 mM.
- DEN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.): se disuelve en SSF. La concentración final administrada es de 35 mg/kg peso vivo.
- Melatonina (Sigma-Aldrich): se disuelve en etanol absoluto y se hacen posteriores diluciones en SSF hasta alcanzar una concentración de etanol del 2,5%.
- SR9009 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania): se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) (0,05%) hasta una concentración final de 10 µM.

## 4.3 Animales

Para el estudio *in vivo*, se han utilizado 140 ratones macho de la cepa ICR (Harlan, Barcelona) de 5 semanas de edad, mantenidos en el animalario de la

Universidad de León, de acuerdo a la normativa vigente recogida en el RD 53/2013 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, en la Directiva Europea 2010/63/UE y en las pautas recogidas en la normativa GLP (*Good Laboratory Practises*). Los animales han sido mantenidos en unas condiciones constantes de temperatura y humedad y ciclo luz/oscuridad de 12 horas, con una semana de periodo de aclimatación tras su llegada. El alimento y el agua se han administrado *ad libitum*.

#### **4.4 Líneas celulares**

Se emplearon células Hep3B de una línea celular establecida de CHC humano procedentes de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, Va, EE.UU.). Las células fueron cultivadas en monocapa y mantenidas en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), glutamina (4 mM) y piruvato (100 µg/mL). Las células se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%), con una concentración de aire del 95% y de CO<sub>2</sub> del 5%.

#### **4.5 Diseño experimental**

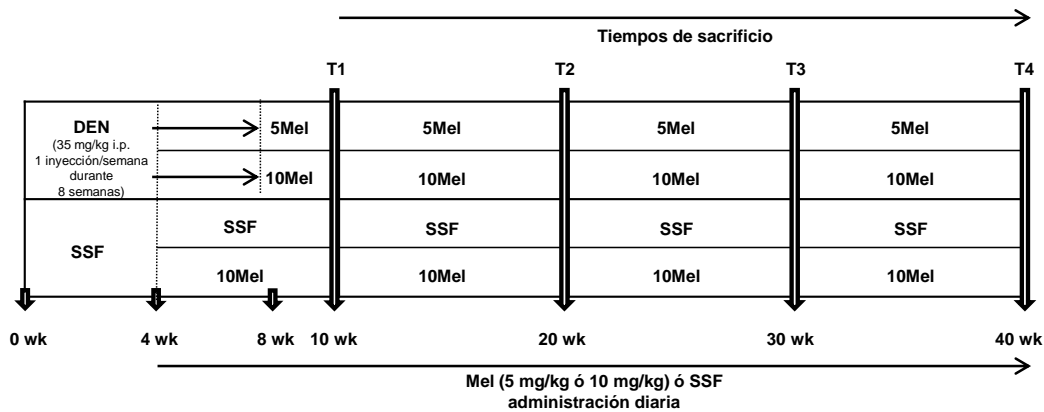
##### **Modelo animal de CHC**

A las 6 semanas de edad de los animales se procedió a la inducción del CHC mediante la administración vía intraperitoneal (i.p.) una vez a la semana de DEN (35 mg/Kg peso vivo) diluido en SSF durante 8 semanas. La melatonina (Mel) se administró a los ratones a los que se les había inducido el CHC por vía i.p. Se diferenciaron dos grupos: uno a los que se les administró Mel a dosis de 5 mg/Kg al 2,5% en etanol, y otro a dosis de 10 mg/Kg al 2,5% en etanol, diariamente durante todo el experimento (40 semanas) desde la semana 4 del estudio (Figura 16). En los

diferentes grupos experimentales se realizaron sacrificios a las 10, 20, 30 y 40 semanas del comienzo de la inducción del CHC. Se anestesió a los animales mediante la administración de una mezcla de clorhidrato de xilazina al 2% (50 mg/kg de peso corporal) y clorhidrato de ketamina (100 mg/kg peso corporal) i.p. y posterior extracción de sangre de la cavidad cardiaca. Finalmente, tras la tricotomía manual de la región abdominal, se realizó una laparotomía ventral media, exposición y extracción del hígado.

Los animales se incluyeron aleatoriamente en 16 grupos experimentales (n=8 ratones):

- Grupos Control 10 semanas (wk), Control 20wk, Control 30wk y Control 40wk. Animales control sometidos a inyección i.p. con el vehículo en el que se administraba la melatonina (0,3 mL al 2,5% de etanol en SSF) y sacrificados a las 10, 20, 30 y 40 semanas del comienzo del estudio.
- Grupos DEN 10wk, DEN 20wk, DEN 30wk, DEN 40wk. Animales sometidos a la inducción del CHC con DEN y sacrificados en las semanas 10, 20, 30 y 40, respectivamente.
- Grupos DEN+5Mel 10wk, DEN+5Mel 20wk, DEN+5Mel 30wk, DEN+5Mel 40wk. Animales sometidos a la inducción del CHC con DEN, y que recibieron diariamente, a partir de la 4ª semana, 5 mg/Kg de Mel i.p. hasta su sacrificio en las semanas 10, 20, 30 y 40, respectivamente.
- Grupos DEN+10Mel 10wk, DEN+10Mel 20wk, DEN+10Mel 30wk, DEN+10Mel 40wk. Animales sometidos a la inducción del CHC con DEN, y que recibieron diariamente, a partir de la 4ª semana, 10 mg/Kg de Mel i.p. hasta su sacrificio en las semanas 10, 20, 30 y 40, respectivamente.



**Figura 16.** Diseño y grupos experimentales. Tiempos de sacrificio en semanas (post-exposición a DEN): T1- 10 wk (semanas); T2- 20 wk; T3- 30 wk; T4- 40 wk. Los grupos control recibieron SSF y etanol al 2,5%, y fueron sometidos a eutanasia en los mismos tiempos que los grupos expuestos a DEN. Los grupos control+Mel recibieron melatonina a una dosis de 10 mg/kg diluida en etanol al 2,5% y SSF.

### Modelo *in vitro* de células de hepatocarcinoma humano (Hep3B)

Las células Hep3B fueron cultivadas en cultivo monocapa. Después de 24 horas de cultivo en medio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de SFB, y un 1% de penicilina/estreptomicina, el medio fue reemplazado por medio nuevo con un 2% de SFB. Las células control fueron incubadas con DMSO (Merck KGaA) al 0,05%; las células control+Mel fueron incubadas con melatonina (1.000  $\mu\text{M}$ ) diluida en DMSO al 0,05%. Para el estudio del papel del receptor nuclear REV-ERB $\alpha$ , se empleó el agonista SR9009 (Merk KGaA). A las células se les administró el ligando SR9009 (10  $\mu\text{M}$ ) disuelto en 0,01% de DMSO, y fueron tratadas con melatonina (500 ó 1.000  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Para los estudios de silenciamiento de BMAL1 se emplearon ARNs pequeño de interferencia (ARNip) comerciales frente a BMAL1 y frente a una secuencia no específica (Control negativo). Ambos ARNip se utilizaron a una concentración final de 25 nmol/L. Tras la transfección, las células fueron tratadas con melatonina (500 ó 1.000  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas.

## **4.6 Métodos analíticos**

### **4.6.1 Análisis bioquímicos**

Las actividades de las transaminasas ALT y AST, en muestras de plasma obtenidas en el momento del sacrificio de los ratones, se determinaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León (LTI).

### **4.6.2 Ensayo de proliferación celular**

La evaluación de la capacidad de proliferación de las células Hep3B se realizó mediante el empleo del kit *CyQUANT Cell Proliferation Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 7.500 células/pocillo en medio de cultivo con suero al 10%. Se mantuvieron a 37°C hasta que alcanzaron un 75% de confluencia y se procedió a realizar los diferentes tratamientos con suero al 2%. La intensidad de fluorescencia fue medida a una longitud de onda de 530 nm empleando el lector de placas *Synergy™ HT Multi-Mode* (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

### **4.6.3 Silenciamiento con ARN de interferencia (ARNip)**

Con objeto de confirmar la implicación de BMAL1 en los efectos antiproliferativos de la melatonina en células Hep3B, disminuimos su expresión génica transfectando las células con los ARNs de interferencia BMAL1-ARNip sc-38165 y el control negativo CN-ARNip sc-36869 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE.UU.) empleando Lipofectamine® RNAiMAX *Reagent* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas el medio fue reemplazado por DMEM (Sigma-Aldrich) completo, y las células fueron tratadas con melatonina (500 ó 1.000 µM) durante 24 horas.

### **4.6.4 Estudio histológico**

El examen histológico se realizó a partir de una porción de hígado extraído y fijado mediante inmersión en formalina al 10% durante 24 horas. Los bloques fueron deshidratados en una secuencia de soluciones alcohólicas en concentraciones



crecientes. Previa a su inclusión en parafina, los bloques son introducidos en un baño de xilol sustituyendo, así, la solución alcohólica. Tras la inclusión en parafina, posterior secado, y enfriamiento, se realizan los cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de sección. Posterior a la colocación de estos cortes histológicos en portaobjetos, se procede a la eliminación de la parafina mediante xilol, y a su rehidratación pasando por una serie de gradaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución de  $\text{H}_2\text{O}$  al 100%. Una vez rehidratadas, las preparaciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina, deshidratadas de nuevo, e introducidas en xilol para hacer miscible el tejido con el medio de montaje. Finalmente, tras la adición del medio de montaje y la colocación del cubreobjetos, se procedió a la evaluación histológica de los distintos grupos experimentales.

#### **4.6.5 Estudio inmunohistoquímico**

Para los estudios de expresión inmunohistoquímica se realizaron cortes de tejido hepático de 4  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se desparafinaron e hidrataron mediante un gradiente descendente de etanol. Las muestras se introdujeron en una olla a presión con solución de citrato 25 mM pH 6,0 durante 10 minutos. A continuación, fueron transferidas a un recipiente con agua desionizada hirviendo, y se dejaron enfriar durante 20 minutos. Las secciones de tejido hepático fueron tratadas con peroxidasa (Sternberger y cols., 1970) con el fin de inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos específicos frente a Ki67 (Menarini Diagnostics; Berkshire, Reino Unido), BMAL1 y REV-ERB $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific).

Para detectar la expresión de los diferentes marcadores, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (Biotinylated Anti-Rabbit IgG; Vector Laboratoires, Burlingame, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 45 minutos de amplificación con avidina-biotina (ABC Standard; Vector Laboratoires), las muestras se incubaron con el sustrato 3',3'-diaminobencidina al 0,1% (DAB/Ni Substrate; Vector Laboratoires) a temperatura ambiente durante 10 minutos. En la primera fase de la reacción, la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno forman un

complejo que interacciona con la DAB, quedando esta última en estado oxidado. Las moléculas de DAB, una vez oxidadas, presentan unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro resistentes a los solventes de los lípidos, permitiendo obtener preparaciones histológicas permanentes. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina durante 10 segundos y montadas. La especificidad de la técnica fue evaluada mediante controles séricos negativos en los que se omitió la incubación con el suero inmune primario sustituyéndose por suero preinmune.

Las muestras fueron analizadas por el *software WinRoof* versión 6.3 con diez campos histológicos no consecutivos elegidos al azar. Los resultados fueron expresados en porcentaje de células teñidas en cada campo.

#### **4.6.6 Obtención de homogeneizado total**

En el tejido hepático se realizó la homogeneización de 25 mg de tejido en 1 mL de tampón Tris-HCl (Tris 10 mM, Sacarosa 0,25 M y EDTA 1 mM; pH 7,4) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), mediante el empleo de homogeneizadores de vidrio y vástagos autoclavados con el fin de disgregar la MEC y las membranas celulares.

Al finalizar los diferentes periodos de tratamiento de la línea celular Hep3B, las células son lavadas con un tampón fosfato salino (PBS) frío (4°C), y homogeneizadas en tampón Tris-HCl (50 µL por pocillo de 35 mm) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas, empleando un homogeneizador de ultrasonidos (Hielscher-Ultrasound Technology, Teltow, Alemania). Con el mismo se aplicaron 2 pulsos de 20 segundos y un 60% de amplitud a cada muestra.

Los homogeneizados obtenidos se pasaron a tubos eppendorf y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Por último, se centrifugaron las muestras a 13.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. Se realizaron alícuotas del sobrenadante en tubos eppendorf que se almacenaron hasta su uso a -80°C.

#### 4.6.7 Obtención de las fracciones citosólica y nuclear

Para la obtención de la fracción citosólica las muestras se homogeneizan tal y como se describe en el apartado anterior, con una posterior centrifugación a 12.000 g durante media hora y a 4°C. El sobrenadante que resulta de dicha centrifugación es recolectado y almacenado a -80°C hasta la realización de las determinaciones analíticas.

La extracción nuclear se llevó a cabo en muestras de hígado mediante lisis celular y posteriores centrifugaciones.

- Reactivo A: HEPES-KOH 0,01 M pH 7,9, glicerol 250 g/L, NaCl 0,420 M, MgCl<sub>2</sub> 0,0015 M, 2 x 10<sup>-4</sup> M EDTA, DTT 5 x 10<sup>-4</sup> M, 2 x 10<sup>-4</sup> M PMSF.
- Reactivo B: NaCl HEPES-KOH 0,02 M pH 7,9, glicerol 250 g/L, NaCl 0,042 M, PMSF 15 x 10<sup>-4</sup> M.
- Nonidet: octilfenoxipolietoxietanol.

Para la obtención de los extractos nucleares se homogeneizaron 100 mg de tejido hepático en 5 x 10<sup>-4</sup>L del reactivo A y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (Roche Diagnostics GmbH) utilizando homogeneizadores de vidrio y vástagos autoclavados con el fin de disgregar la matriz extracelular y las membranas celulares. Tras 15-60 minutos de incubación en hielo, los homogeneizados obtenidos fueron centrifugados a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 2,5 x 10<sup>-4</sup> L del reactivo B, se homogeneizó y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Los restos celulares se eliminaron mediante una centrifugación a 14.000 g durante 15 minutos a 4°C y, posteriormente, se recogió la fracción del sobrenadante con las proteínas de unión al ADN de cada muestra y se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su análisis.

#### 4.6.8 Concentración de proteína

Se utilizó la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). El método Bradford se basa en la unión cuantitativa de un tinte, *Coomassie Brilliant Blue*, a una proteína desconocida y en comparar esta unión a diferentes cantidades de una proteína estándar, albumina sérica bovina (BSA). El Coomassie Brilliant Blue es un

pigmento de tipo trifenilmetano amónico, que se une de forma no covalente a los restos de lisina de las proteínas.

Reactivos:

- Solución de BSA patrón (0,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich).
- H<sub>2</sub>O milliQ.
- *Coomassie Brilliant Blue solution Bradford* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Se preparó la curva patrón y las muestras problema por triplicado en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y se leyó la absorbancia a 595 nm. La concentración se expresa en mg de proteína/mL en el lector de microplacas.

#### 4.6.9 Western blot

La determinación de la expresión proteica de las distintas proteínas analizadas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970). Los reactivos empleados fueron los siguientes:

- Tampón Tris/HCl 0,1 M; pH 6,8.
- $\beta$ -mercaptoetanol 0,075%.
- Solución de ebullición: H<sub>2</sub>O; Tris/HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pirrolina 0,5%.
- Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 0,2 M; dodecilsulfato sódico (SDS) 3,5 mM; pH 8,8.
- Tampón de transferencia: Tris 25 mM; glicina 0,2 M y metanol 20%.
- PBS: NaCl 0,14 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mM; KCl 2,7 mM.
- PBS-Tween: 0,05%.
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 1-5% de leche en polvo desnatada en PBS-Tween.

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron diluciones de la proteína de las diferentes muestras hasta obtener una concentración final de entre 30-50  $\mu\text{g}$ . Posteriormente se añadieron la solución de ebullición y el  $\beta$ -mercaptoetanol, y se incubó 2 minutos a 100°C. A continuación se realizó una electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida (Sigma-Aldrich) en tampón de electroforesis.

Para la realización de los distintos geles de separación (7, 9, 12 y 15%) se prepararon las mezclas que se detallan en la Tabla 1.

Reactivo (2 geles)	7%	9%	12%	15%
Acrilamida/Bisacrilamida (mL)	2,45	3,15	4,20	6,25
Tris/HCl pH 8,8 1,5 M (mL)	3,5	3,5	3,5	3
SDS 10% ( $\mu\text{L}$ )	140	140	140	125
APS 10% ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	62,5
TEMED 1% ( $\mu\text{L}$ )	7	7	7	6,25
Agua (mL)	7,85	7,15	6,10	2,90

**Tabla 1.** Composición de los diferentes geles de separación. TEMED, tetrametiletilendiamina; APS, persulfato amónico.

Una vez se llenaron los cristales con las mezclas anteriores correspondientes, se añadió cuidadosamente isobutanol para evitar la formación de burbujas. Tras la polimerización del gel, se procedió a la eliminación del isobutanol, lavado con agua, y secado con papel *Whatman*. Posteriormente se preparó el gel de concentración según las especificaciones de la Tabla 2.

Reactivo (2 geles)	
Acrilamida/Bisacrilamida (mL)	1
Tris/HCl pH 6,8 0,5 M (mL)	2,5
SDS 10% (μL)	100
PSA 10% (μL)	200
TEMED 1% (μL)	10
Agua (mL)	6,3

**Tabla 2.** Composición del gel de concentración.

Una vez preparada la mezcla de todos los componentes, se distribuyó entre los cristales, y se introdujeron los peines con el número de pocillos seleccionado, según el número de muestras a cargar, con cuidado, evitando la formación de burbujas. Ya polimerizado, se retiraron los peines y se cargaron las muestras añadiendo 10 μl de solución de ebullición.

### Transferencia

Las proteínas ya separadas se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) para permitir su exposición a los anticuerpos. Para realizar la transferencia se utilizó un sistema semiseco a 13 V durante 20 minutos (Trans-Blot®; Bio-Rad). Después se bloquearon las membranas en solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C.

### Incubación con el anticuerpo primario

Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con cada uno de los siguientes anticuerpos específicos: anti-BMAL1, CLOCK (Thermo Fisher Scientific), PCNA, SGPL1, S1P1, S1P2, SphK1, SphK2, PI3K p85, PI3K p110, mTOR, p-mTOR, HSP70, HSP90, GRP78, REV-ERBα, REV-ERBβ (Abcam, Cambridge, Reino Unido), VEGF, VEGFR-2, Ciclina D1, Ciclina E, CDK4, CDK6, p21, c-Myc, S1P3, ERK1/2, p-ERK1/2, NF-κB p50, NF-κB p65, STAT3, p-STAT3, RORα, Beclina-1, LAMP-2, PARP1/2, Bax (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU), AKT, p-AKT, p38 MAPK, p-p38 MAPK, p53, Bcl-2, Caspasa 3 activa, p-Atg13, LC3I/II, p62/SQTM1 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU) con diluciones entre 1:200 y 1:2.000. Con el fin de demostrar que todas las muestras contenían la misma cantidad de proteína se emplearon los anticuerpos policlonales de conejo anti- $\beta$ -Actina, (1:20.000; Sigma-Aldrich) y anti-Lamina B1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology).

Transcurrido este periodo, se lavaron las membranas tres veces durante 10 minutos en PBS-Tween. Posteriormente, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) anti conejo o ratón (de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado) en una dilución 1:5.000 (Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, se volvieron a lavar 3 veces en PBS-Tween.

#### Revelado

La detección de la proteína se realizó mediante quimioluminiscencia (Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 minuto. Posteriormente, se introdujeron en un cassette junto con una película fotográfica (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) durante aproximadamente 5 minutos. Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando un *software* comercial (Scion Image J Software 1.46a, Bethesda, MD, EE.UU.).

#### **4.6.10 Microscopía electrónica de transmisión**

Para el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) las muestras de tejido hepático fueron seccionadas en piezas de  $1 \text{ mm}^3$  para optimizar la penetración del fijador. En este caso las secciones de hígado fueron sumergidas en una variante del fijador Karnovsky [2% glutaraldehído + 4% formalina tamponada (0,1 mol/L tampón fosfato)] durante toda la noche y posteriormente en tetraóxido de osmio al 2% durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas sumergiéndolas en diferentes soluciones de alcohol de concentración

creciente. El bloque de tejido fue infiltrado y embebido en una resina epoxi a 60°C durante 72 horas. Las secciones ultrafinas (70 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo automático (Reichert Ultracut E, Viena, Austria) usando una cuchilla de diamante y se recopilaron en una rejilla de cobre preparada con membrana de soporte. Con el fin de conferir contraste a los cortes obtenidos, se emplearon soluciones de sales de metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo), las cuales contienen iones de alto número atómico, capaces de desviar el haz de electrones incidente sobre la muestra y con cierta afinidad por componentes específicos de la misma. La observación de las secciones hepáticas se realizó con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL LTD, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 80 kV.

#### **4.6.11 Extracción, purificación y cuantificación del ARN**

Para la extracción de ARN total se utilizó el reactivo Trizol (Life Technologies, Madrid, España), solución monofásica formada por una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina. Este reactivo es capaz de provocar la ruptura celular y disolver todos los componentes celulares a la vez que mantiene la integridad del ARN.

Reactivos:

- Trizol®LS.
- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich).
- Etanol al 75% en agua con DEPC (dietilpirocarbonato).
- Agua libre de ARNasas (Ambion, Paisley, Reino Unido).

La extracción de ARN se llevó a cabo en diferentes pasos:

El tejido se homogeneizó añadiendo 750 µL de Trizol® por cada 25 mg de tejido hepático. En el caso de las muestras celulares, tras retirar el medio de cultivo y lavar con PBS frío (4°C), se añadió 1 mL del reactivo Trizol® por cada placa de 35 mm, y se procedió al lisado celular en la propia placa mediante pipeteo.



A continuación, se incuban las muestras homogeneizadas, durante 5 minutos a 15-30°C para la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. Seguidamente, se añadieron 200 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente durante unos 15 segundos, dejándose incubar nuevamente durante 5 minutos a 25°C. Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12.000 g, obteniéndose así tres fases: una fase inferior orgánica de color rosa que contiene proteínas, ADN y fenol; una fase intermedia con fenol y cloroformo; y una fase superior acuosa incolora en la que se encuentra el ARN en suspensión. A la fase acuosa obtenida se le añadieron 0,5 mL de alcohol isopropílico y se mezcló por inversión. A continuación se incubó durante 10 minutos a 25°C y se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 12.000 g. El ARN precipitado en forma de pellet se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Para ello se agitó en vórtex y se centrifugó nuevamente a 4°C durante 5 minutos a 7.500 g. El pellet de ARN se dejó secar durante 30 minutos, dejando así que se evaporasen los restos de Trizol<sup>®</sup>, cloroformo, isopropanol y etanol. A continuación, al ARN se resuspendió en agua libre de RNasas. Finalmente, se incubó a 55°C durante 10 minutos y se almacenó a -80°C.

La pureza del ARN se estimó espectrofotométricamente mediante las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza} = A_{260}/A_{280}$$

Para la cuantificación del ARN total se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.6.12 Tratamiento del ARN con ADN-asas

Se utilizó el kit comercial *RQ1 RNase-free DNase* (Promega, Madison, WI, EE.UU.) con el fin de degradar las cadenas de ADN simples y dobles, en presencia de Mg<sup>2+</sup>, y así poder disponer de oligonucleótidos con extremos 3'-OH libres.

Los reactivos utilizados fueron:

- Tampón RQ1 ADNasa 10x: Tris HCl 400 mM, pH 8; MgSO<sub>4</sub> 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM.
- ADNasa libre de ARNasa RQ1.
- ADNasa RQ1 *Stop Solution* 20 mM ácido etilén glicol tetraacético (EGTA), pH 8.
- El tratamiento de ADNasas se llevó a cabo al mezclar los siguientes volúmenes:
  - ARN (2 µg).
  - Enzima ADNasa libre de ARNasa (1 U/µg ARN).
  - Tampón RQ1 ADNasa 10x.

La mezcla de reacción se completó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 50 µL. A continuación, se incubó a 37°C durante 30 minutos, tras los cuales se añadieron 2 µL de ADNasa RQ1 *Stop Solution* para parar la reacción. Seguidamente, se incubó de nuevo a 65°C durante 10 minutos para activar así las ADNasas.

#### **4.6.13 Reacción de la transcriptasa inversa**

Se utilizó el sistema *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), basado en la capacidad de la transcriptasa reversa para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de una secuencia molde de ARN. Para ello, se utilizaron cantidades idénticas de ARN total de cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales, realizándose en paralelo un control negativo.

Reactivos:

- Tampón RT-PCR 10x: Tris HCl 100 mM; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; pH 8,3.
- Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 25x.
- Iniciadores (mezcla de nucleósidos) 10x.
- Transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/mL).
- Inhibidor de ARNasas (1 U/mL).
- Agua tratada con DEPC.

Con el fin de desnaturalizar las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el anillamiento de los iniciadores, se incubaron 10 µg de ARN a 25°C durante 10 minutos seguido de una posterior incubación a 37°C durante 2 horas. A continuación, se añadieron los siguientes reactivos:

- 10 µL de tampón RT-PCR.
- 4 µL de mezcla de dNTP.
- 10 µL de iniciadores.
- 2 µL de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe.
- 1 µL de inhibidor de ARNasas.

La mezcla de reacción se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 50 µL, manteniéndose a temperatura ambiente durante 10 minutos e incubándose posteriormente a 37°C durante 2 horas.

El ADNc obtenido se congeló a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### **4.6.14 Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real (RT-qPCR)**

La PCR se realizó según el procedimiento basado en el proceso natural de replicación del ADN con amplificación cíclica (Mullis y Faloona, 1987; Saiki y cols., 1989). Partiendo de una molécula de ADN diana es posible amplificar una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores diseñados a tal efecto.

El método consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y elongación, efectuados de forma sucesiva en unas condiciones controladas de temperatura y de tiempo. En el presente estudio, para la estimación de la concentración de ARNm, se empleó la metodología de la RT-qPCR mediante *SYBR Green* y *Taqman*:

##### **a) *SYBR Green***

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20 µL:

- 0,4  $\mu$ L de iniciadores 15  $\mu$ M (sentido y antisentido)
- 2  $\mu$ L de ADNc
- 10  $\mu$ L de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Rox) 2x (Roche Diagnostics GmbH)
- 7,2  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Ambion)

Los oligonucleótidos utilizados en la RT-qPCR como iniciadores en la amplificación de fragmentos correspondientes a cada gen se especifican en la Tabla 3. Como gen constitutivo, para normalizar los resultados, se utilizó el gen  $\beta$ -Actina.

	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<b>Genes ratón</b>		
<b>SphK1</b>	ACTGATACTCACCGAACGGAA	CCATCACCGGACATGACTGC
<b>SphK2</b>	ATGGAACCAGTAGAATGCCCT	TCCGTTCCGGTGAGTATCAGTTTA
<b>S1p1</b>	ATGGTGTCCACTAGCATCCC	CGATGTTCAACTTGCCTGTGTAG
<b>S1p2</b>	ATGGGCGGCTTATACTCAGAG	GCGCAGCACAAGATGATGAT
<b>S1p3</b>	ACTCTCCGGGAACATTACGAT	CAAGACGATGAAGCTACAGGTG
<b>Sgpl1</b>	ACCAGACCCTTTCCACATTT	ACTGCCACATGTGCAGGAT
<b>Clock</b>	TTAGTGACTGCTCCTGTAGCTTGTG	CACCACCTGACCCATAAGCAT
<b>Bmal1 (Arntl)</b>	GATCGAAAAAGCTTCTGCACAA	GGGTGGCCAGCTTTTCAA
<b>Npas2</b>	GCTGATGTTGGAGGCATTAGATG	CATAGATGATGCTGCCGTCTGT
<b>Per1</b>	GCCAGGTGTCGTGATTAATAGTC	GGGCTTTTGAGGTCTGGATAAA
<b>Per2</b>	CACGCTGGCAACCTTGAAGT	TGGTAGTACTCCTCATTAGCCTTAC
<b>Per3</b>	AGCCTCCCGGCCTTGA	GATTGGCTTGGCTTCTTCTGA
<b>Cry1</b>	TCGCCGGCTCTTCCAA	TCAAGACACTGAAGCAAAAATCG
<b>CK1ε (Csnk1e)</b>	GGCAGGGCCTCAAAGCA	CTTCTCGCTAATCCGCTCGTA
<b>Rev-erba (Nr1d1)</b>	CCCAACGACAACAACCTTTTG	CCCTGGCGTAGACCATTTCAG
<b>Rev-erbβ (Nr1d2)</b>	TGATGCCAACGGCAATCC	CTGTGCGGTCACTCTTCAGAAC
<b>Rora (Rora)</b>	GCGGTTGACCTCGGCATAT	ACGCTGGACTCTGCTGTTACC
<b>MT1 (Mtnr1a)</b>	CATTTCTAATGGGCTTGAGTGTCA	CATAGCGATCCCCGTGATG
<b>Sirt1</b>	CGGCTACCGAGGTCCATATACT	TCGAGGATCGGTGCCAAT
<b>Hif-1α (Hif1a)</b>	GCGGGCACCGATTTCG	TTCAGAACTCATCTTTTCTTCT
<b>Hif-2α (Hif2a)</b>	CCATGAGGAGATCCGTGAGAA	CGGTGGACACGTCTTTGCT
<b>β-Actina (Actb)</b>	AATCGTGCGTGACATCAAAGAG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTCT
<b>Genes humano</b>		
<b>REV-ERBα (NR1D1)</b>	TTGAGTCAAGGTCCAGTTTGAATG	GGAGTCCAGGGTCGTCATGT
<b>REV-ERBβ (NR1D2)</b>	TTGTGGTAGGAGTTCTGTTGAATGA	CCCGAAGTCTCCAATTACCAGAT
<b>BMAL1 (ARNTL)</b>	AGCTGCCTCGTCGCAATT	CCGTTCACTGGTTGTGGAAC
<b>CLOCK</b>	AAATATGCAAGGCCAAGTTGTTT	TGTGCCAATGTGTCCAGTATTCA
<b>β-Actina (ACTB)</b>	GGAATTCGAGCAAGAGATGG	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

**Tabla 3.** Secuencias específicas de los iniciadores utilizados para la RT-qPCR por Syber Green.

b) *Taqman*.

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ :

- 1  $\mu\text{L}$  de sonda primer del gen específico (Applied Biosystems).
- 1  $\mu\text{L}$  de sonda primer del gen control (Applied Biosystems).
- 2  $\mu\text{L}$  de ADNc.
- 10  $\mu\text{L}$  de *Fast Start Universal Master Mix* (Roche).
- 6  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (Ambion).

Los iniciadores en la amplificación se especifican en la Tabla 4. Como gen constitutivo, para normalizar los resultados, se utilizó el gen GAPDH que codifica para la gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa.

Genes	Sondas <i>primer</i>	
<b>VEGF</b>	NM_001025250.3	Mm00437306_m1
<b>CD105</b>	NM_001146348.1	Mm00468256_m1
<b>IL-6</b>	NM_031168.1	Mm00446190_m1
<b>HGF</b>	NM_001289458.1	Mm01135184_m1
<b>c-Met</b>	NM_008591.2	Mm01156972_m1
<b>PDGF-<math>\beta</math></b>	NM_011057.3	Mm00440677_m1
<b>PDGFR-<math>\beta</math></b>	NM_001146268.1	Mm00435553_m1
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	NM_007393.1	Mm00607939_s1

**Tabla 4.** Sondas específicas utilizadas para la RT-qPCR por *Taqman*.

Cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fueron sometidas a la transcripción reversa. Dicha muestra no dió lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador *Step One Plus Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

#### **4.6.15 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La concentración de S1P fue cuantificada mediante una prueba ELISA usando un kit comercial (Echelon Biosciences, UT, USA). La evaluación cuantitativa de S1P se realizó empleando duplicados de muestras de homogeneizados de hígado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los niveles son expresados en pmol/ $\mu$ g de proteína.

#### **4.6.16 Tratamiento estadístico**

Los resultados se expresan como medias y error estándar de la media (EEM) y se comparan mediante el análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido del test de comparación múltiple de Bonferroni cuando el análisis de varianza indica que existe una diferencia significativa. Se exige una  $p < 0,05$  para conceder significación estadística a los resultados. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS para *Windows*, versión 22.0 (SPSS Federal Systems, Chicago, EE.UU.).

## ***5 RESULTADOS***

---



A pesar de la importancia de los resultados obtenidos en numerosos estudios *in vitro* sobre los efectos de la melatonina en el CHC, no existen estudios *in vivo* concluyentes, y los obtenidos anteriormente se han centrado principalmente en la descripción del efecto antioxidante de la hormona, pero no en el análisis sobre los mecanismos moleculares implicados en la progresión tumoral (Rahman y cols., 2003; Subramanian y cols., 2007; Balamurugan y Karthikeyan, 2012; Jayakumar y cols., 2012; Hadem y cols., 2014). Por ello, decidimos centrar la presente Tesis Doctoral en evaluar los mecanismos moleculares que pudieran estar implicados en el efecto antitumoral de la melatonina en un modelo animal de CHC inducido en ratones por administración del carcinógeno DEN, centrando la investigación en diversas vías de señalización que se relacionan con el desarrollo y progresión tumorales.

## **5.1 Efecto de la administración de melatonina sobre el daño hepático en el modelo animal de CHC inducido por DEN**

La tasa de mortalidad en los animales a los que se administró DEN fue del 6,9%. Se analizaron las actividades plasmáticas de transaminasas y se realizaron estudios histológicos para determinar el daño hepático.

### **5.1.1 Efecto de la melatonina sobre marcadores séricos de daño hepático**

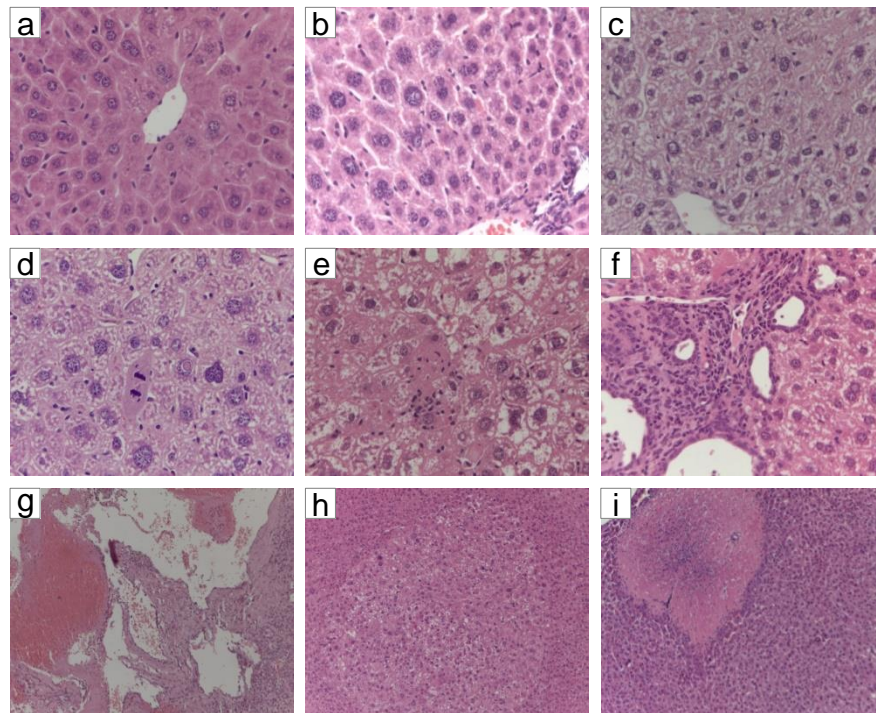
La función hepática se valoró determinando en sangre las actividades plasmáticas de las enzimas AST y ALT. En los grupos de ratones tratados con DEN se observó un aumento significativo de los niveles de las transaminasas en suero (Tabla 5); el tratamiento con ambas dosis de melatonina redujo dicho incremento de modo significativo, tanto a las 30 como a las 40 semanas del estudio, siendo los cambios más marcados en el último periodo. La disminución observada tras la administración de melatonina nos indica un claro efecto protector del indol sobre el daño hepático producido por el hepatocarcinógeno. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de DEN respecto a controles ni en los de DEN tratados con melatonina respecto a los no tratados, a las 10 y 20 semanas.

		10wk	20wk	30wk	40wk
ALT (UI/L)	Control	25.6 ± 0.7	25.5 ± 0.4	29.1 ± 5.1	27.3 ± 10.6
	Control+Mel	22.3 ± 1.9	24.1 ± 1.5	23.9 ± 6.8	25.5 ± 4.9
	DEN	28 ± 2.5	30 ± 4.1	54 ± 9.0 <sup>a</sup>	78 ± 21.0 <sup>a</sup>
	DEN+5Mel	26 ± 2.1	27 ± 7.0	39 ± 1.5 <sup>ab</sup>	50 ± 12.0 <sup>ab</sup>
	DEN+10Mel	25 ± 3.4	25 ± 3.1	31 ± 1.9 <sup>abc</sup>	41 ± 1.6 <sup>ab</sup>
AST (UI/L)	Control	57.8 ± 5.9	55.8 ± 6.3	59.8 ± 8.9	61.8 ± 5.9
	Control+Mel	52.5 ± 9.6	51.5 ± 6.6	54.5 ± 8.5	59.5 ± 10.6
	DEN	59 ± 1.8	61 ± 6.2	134 ± 19.0 <sup>a</sup>	171 ± 22.0 <sup>a</sup>
	DEN+5Mel	56 ± 2.0	59 ± 4.3	111 ± 14.0 <sup>ab</sup>	153 ± 14.0 <sup>ab</sup>
	DEN+10Mel	54 ± 2.2	54 ± 3.5	92 ± 4.6 <sup>abc</sup>	86 ± 8.6 <sup>abc</sup>

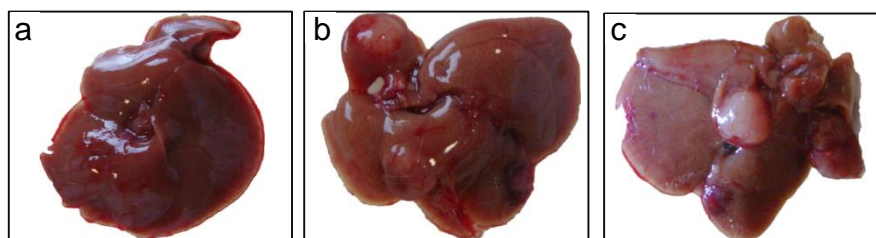
**Tabla 5.** Concentraciones hepáticas de ALT y AST en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio. Valores medios ±S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo.

### 5.1.2 Efecto de la melatonina sobre las características macroscópicas y microscópicas hepáticas

Los estudios histológicos hepáticos mostraron, a las 10 y 20 semanas de la administración del hepatotóxico DEN, una degeneración hidrópica de bajo grado; sin embargo, la arquitectura hepática normal no se vió alterada hasta las 30 semanas del experimento. En este periodo, se observaron en los tejidos hepáticos áreas displásicas y, a menudo, crecimiento invasivo con apariencia multifocal. Se identificaron focos de necrosis coagulativa, degeneración hidrópica, cambios nucleares con condensación de la cromatina y cuerpos de inclusión; además, en alguna muestra se observó peliosis hepática. Por último, a las 40 semanas aparecen focos de displasia y, en el 37,5% de los animales inyectados con DEN nódulos compatibles con CHC (Figura 17; Tabla 6). Macroscópicamente no se identificaron cambios en los hígados de los grupos Control y Control+Mel (Figura 18; Tabla 6).



**Figura 17.** Imágenes representativas de la histopatología hepática (tinción H&E) en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio. (a) Control: histología hepática normal, 200x; (b) DEN, 10wk: hígado con bajo grado de degeneración hidrópica, 200x; (c) DEN, 20wk: degeneración hidrópica, 200x; (d) DEN, 30wk: degeneración hidrópica, figura mitótica, cambios nucleares con cromatina condensada y difusa, núcleos pleomórficos y cuerpos de inclusión, 200x; (e) DEN, 30wk: foco de necrosis coagulativa, degeneración hidrópica, cambios nucleares con cromatina condensada y difusa, núcleos pleomórficos y cuerpos de inclusión, 200x; (f) DEN, 30wk: cuerpos de inclusión, degeneración hidrópica y núcleos pleomórficos, 200x; (g) DEN, 30wk: peliosis hepática, 40x; (h) DEN, 40wk: focos displásicos, 100x; (i) DEN, 40wk: carcinoma hepatocelular, 100x.



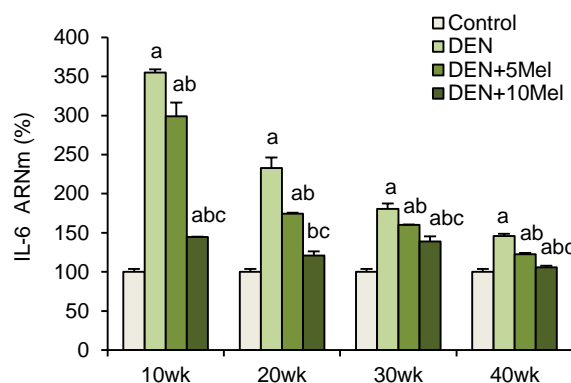
**Figura 18.** Imágenes representativas de los hígados a las 40 semanas. (a) hígado grupo control; (b, c) hígados grupos DEN con nódulos compatibles con carcinoma hepatocelular.

		Cambios histopatológicos (no. de animales afectados)						Lesiones proliferativas (no. de lesiones identificadas)				
		Necrosis	Degeneración hidrópica	Mitosis	Anisocariosis	Pleomorfismo	Células multinucleadas	Cuerpos de inclusión	Displasia difusa	Focos de hiperplasia	Adenoma hepatocelular	Carcinoma hepatocelular
30wk	<b>DEN</b>	3/8	8/8	3/8	6/8	7/8	7/8	6/8	2	3	0	0
	<b>5Mel</b>	3/8	6/8	2/8	5/8	5/8	4/8	3/8	1	1	0	0
	<b>10Mel</b>	2/8	5/8	1/8	3/8	3/8	1/8	2/8	0	0	0	0
40wk	<b>DEN</b>	4/8	2/8	5/8	8/8	8/8	8/8	8/8	1	0	4	3
	<b>5Mel</b>	3/8	2/8	4/8	6/8	5/8	4/8	6/8	5	1	2	0
	<b>10Mel</b>	3/8	1/8	2/8	3/8	3/8	2/8	5/8	1	2	1	0

**Tabla 6.** Efecto de la administración de melatonina sobre los cambios histológicos hepáticos tras la administración de DEN a las 30 y 40 semanas (wk) del estudio.

## 5.2 Efecto de la administración de melatonina sobre diferentes mecanismos y vías de señalización en el modelo animal de CHC inducido por DEN

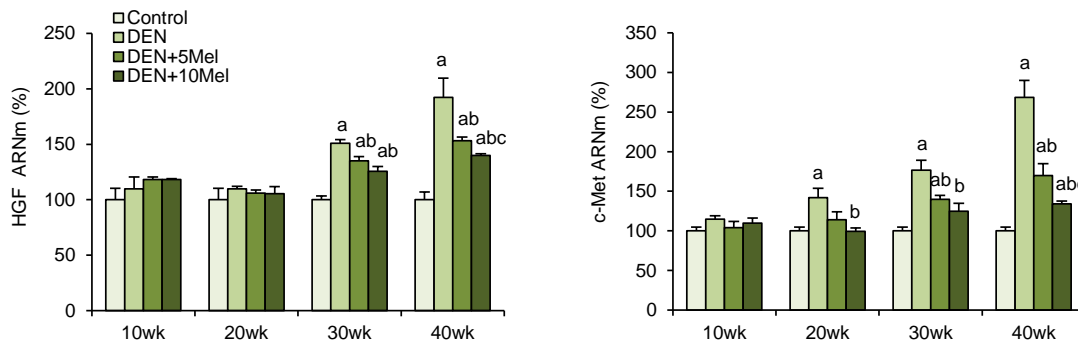
La inflamación constituye uno de los mecanismos más importantes implicados en la fisiopatología del CHC. Cuando el sistema de detoxificación hepática falla, los metabolitos intermediarios se acumulan en el hígado, lo que induce la activación de diferentes tipos de células hepáticas que pueden liberar citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Además, los hepatocitos que experimentan necrosis también liberan citocinas que estimulan las células inflamatorias en el inicio de la respuesta inflamatoria. En este sentido la interleucina-6 (IL-6), entre otras, se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollo y progresión del CHC (Hsia y cols., 2007; Leonardi y cols., 2012). Nuestros resultados revelaron un aumento muy significativo de los niveles de IL-6, sobre todo en los estadios tempranos del estudio (10 y 20 semanas). La administración de melatonina redujo estos niveles, logrando una mejor respuesta con la dosis mayor (Figura 19).



**Figura 19.** Expresión relativa de ARNm de IL-6 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

En la fisiopatología del CHC también influye el microambiente hepático que comprende, no solo las células tumorales, sino también las células del estroma y sus proteínas secretadas, desempeñando un papel clave en el proceso carcinogénico. Los fibroblastos producen diferentes factores de crecimiento como el EGF, HGF, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), y otras moléculas que contribuyen al estado inflamatorio y la estimulación de los macrófagos, que también secretan citocinas, quimiocinas y diferentes factores que contribuyen al mantenimiento del entorno inflamatorio, la progresión del tumor, la formación de nuevos vasos y la metástasis (Heindryckx y Gerwins, 2015).

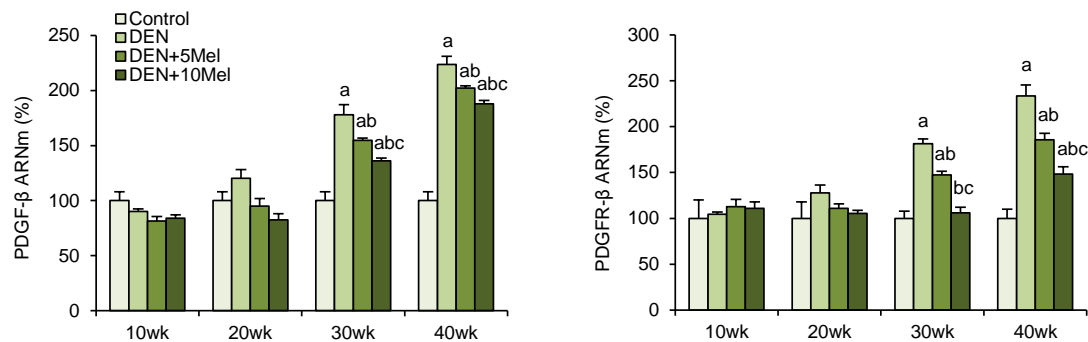
Con el fin de determinar los efectos de DEN y el tratamiento con melatonina sobre diferentes factores de crecimiento en el modelo animal, se determinaron mediante RT-qPCR, el factor de crecimiento HGF y su receptor, c-Met. La administración de DEN produjo un incremento significativo de los niveles del factor y su receptor en los últimos periodos del estudio. Estos aumentos fueron significativamente menores en los grupos tratados con melatonina (Figura 20).



**Figura 20.** Expresión relativa de ARNm de HGF y c-Met analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de PDGF- $\beta$  y su receptor, PDGFR- $\beta$  con objeto de determinar el efecto de la melatonina sobre la progresión del CHC

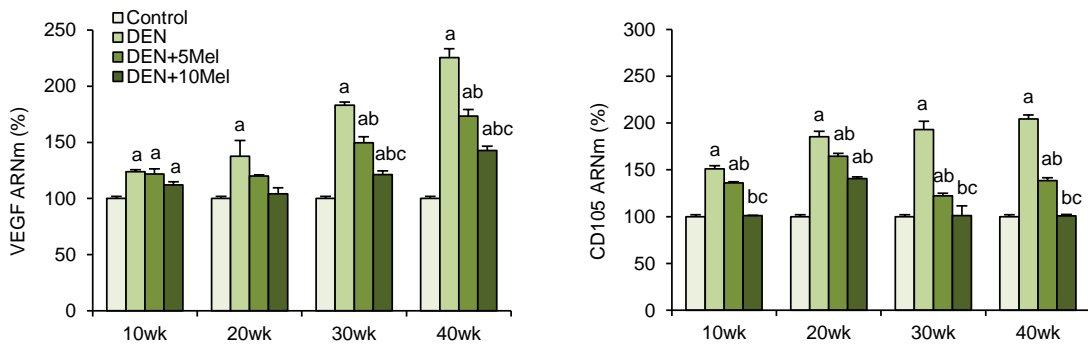
inducido por el hepatotóxico DEN. Los resultados revelaron un claro efecto beneficioso de la melatonina al disminuir significativamente los niveles de ambas proteínas, anormalmente elevados tras la administración de DEN, a las 30 y 40 semanas del experimento (Figura 21).



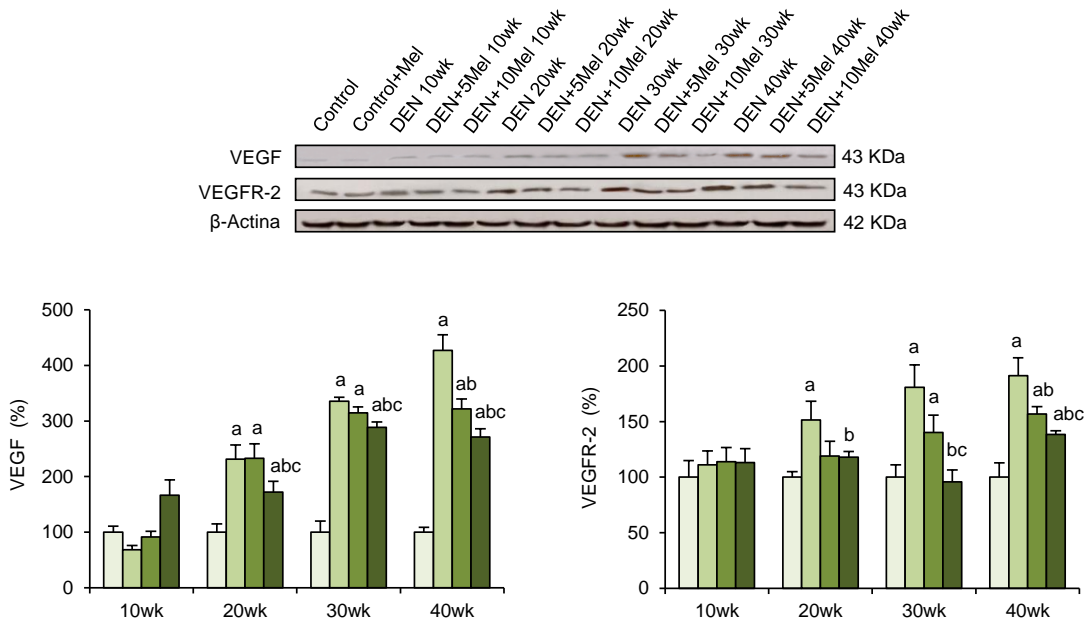
**Figura 21.** Expresión relativa de ARNm de PDGF-β y PDGFR-β analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a β-Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Uno de los mecanismos indispensables para la progresión de un tumor es la angiogénesis (Folkman, 2000). Aunque existen muchos factores con un papel en la promoción de la angiogénesis tumoral, la atención principal de nuestro estudio se centró en el VEGF y uno de sus receptores homólogos, VEGFR-2. Además se evaluó el marcador CD105 (endoglina) por su creciente interés como marcador de angiogénesis para el diagnóstico y progresión tumorales (Nassiri y cols., 2011).

La administración del carcinógeno indujo un incremento significativo, tanto a nivel génico como proteico, en la expresión de los marcadores de respuesta angiogénica que fue más marcado en los últimos periodos del estudio. Este aumento se redujo tras el tratamiento con melatonina observándose un mayor efecto con la dosis mayor (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Expresión relativa de ARNm de VEGF y CD105 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 23.** Expresión proteica de VEGF y VEGFR-2. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



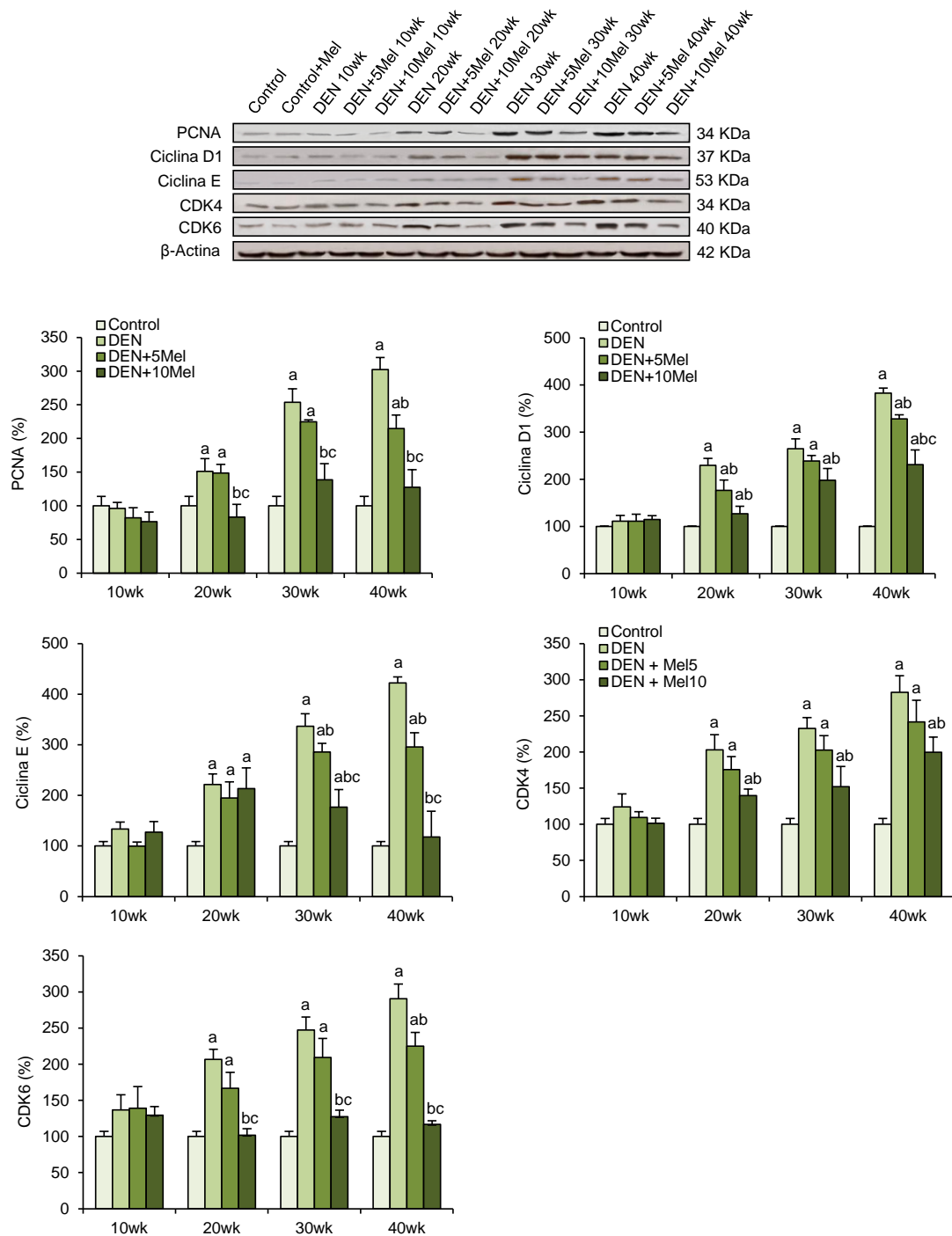
---

### 5.2.1 Efecto de la melatonina sobre proteínas reguladoras del ciclo celular, la proliferación, y la apoptosis

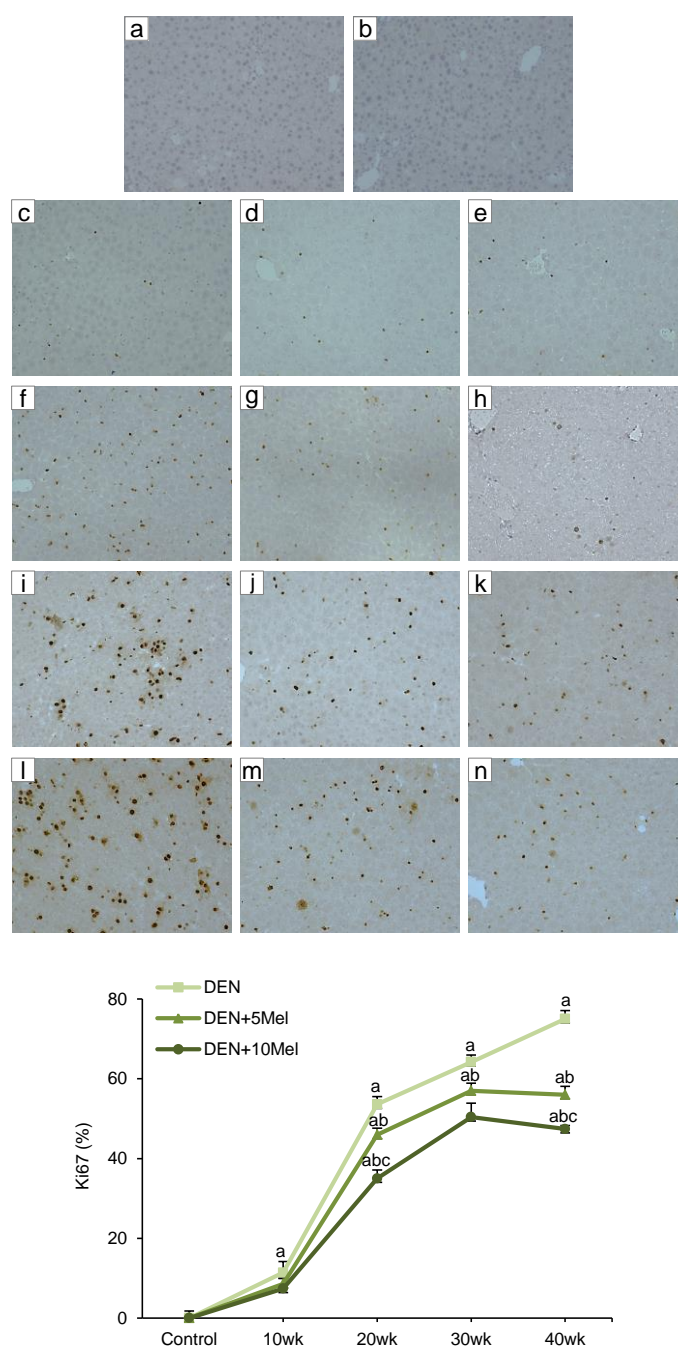
Durante la hepatocarcinogénesis, aumenta la tasa de división celular, y con ello la posibilidad de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, alterándose así la proliferación y apoptosis celular (Leonardi y cols., 2012).

En primer lugar, y con el fin de determinar los efectos de DEN y el tratamiento con melatonina sobre diversas proteínas relacionadas con la proliferación y el ciclo celular, se determinó mediante Western blot la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), las ciclinas D1 y E, y las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6. Los resultados mostraron un incremento paulatino de la expresión del marcador de proliferación, así como de las ciclinas y quinasas, a lo largo de los distintos periodos tras la administración de DEN, alcanzando una máxima expresión a las 40 semanas. Dicha expresión disminuyó de forma significativa en los grupos tratados con melatonina de forma dependiente de la dosis (Figura 24).

Para comprobar *in situ* el aumento de proliferación tras la administración de DEN, y los efectos antiproliferativos de la melatonina, se determinó la expresión inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki67 (Figura 25). Desde la semana 20 de la administración del cancerígeno se observó un aumento significativo del marcador en los grupos de ratones a los cuales se les había administrado DEN, disminuyendo de forma significativa en los animales tratados con melatonina.

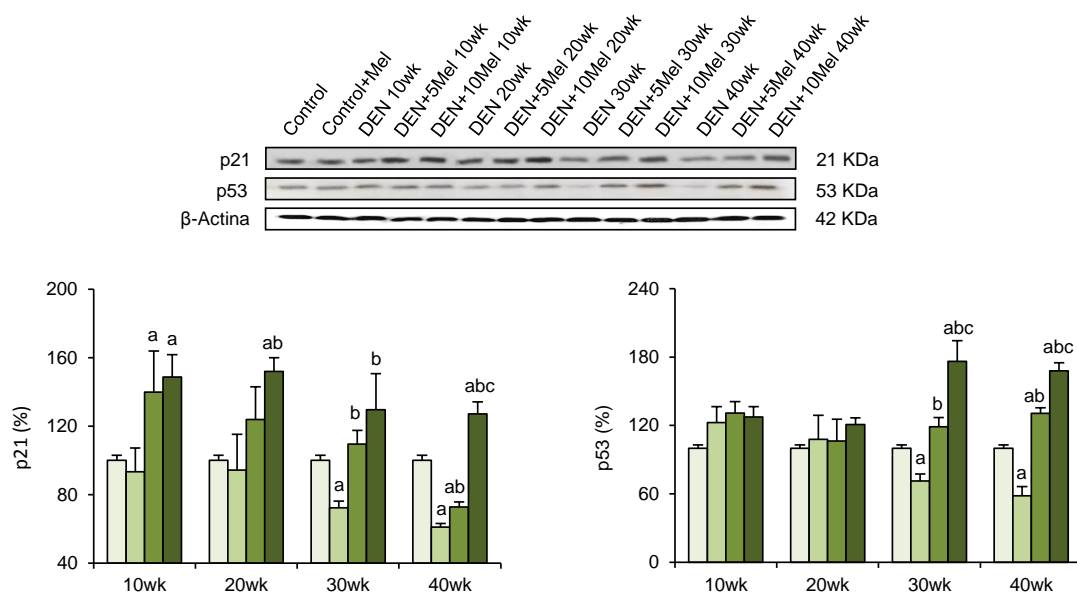


**Figura 24.** Expresión proteica de PCNA, Ciclina D1, Ciclina E, CDK4 y CDK6. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 25.** Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de Ki67. Las imágenes de las distintas secciones de hígado fueron tomadas en los diferentes grupos experimentales y a las diferentes semanas (wk) de estudio. (a) Control; (b) Control+Mel; (c) DEN 10wk; (d) DEN+5Mel 10wk; (e) DEN+10Mel 10wk; (f) DEN 20wk; (g) DEN+5Mel 20wk; (h) DEN+10Mel 20wk; (i) DEN 30wk; (j) DEN+5Mel 30wk; (k) DEN+10Mel 30wk; (l) DEN 40wk; (m) DEN+5Mel 40wk; (n) DEN+10Mel 40wk. Aumentos: 200x. El gráfico inferior muestra el análisis de las áreas positivas a Ki67. La melatonina (5 mg/kg, 5Mel, ó 10 mg/kg, 10Mel) fue administrada durante 10wk, 20wk, 30wk ó 40wk a ratones que previamente habían recibido DEN o vehículo (Control+Mel). Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

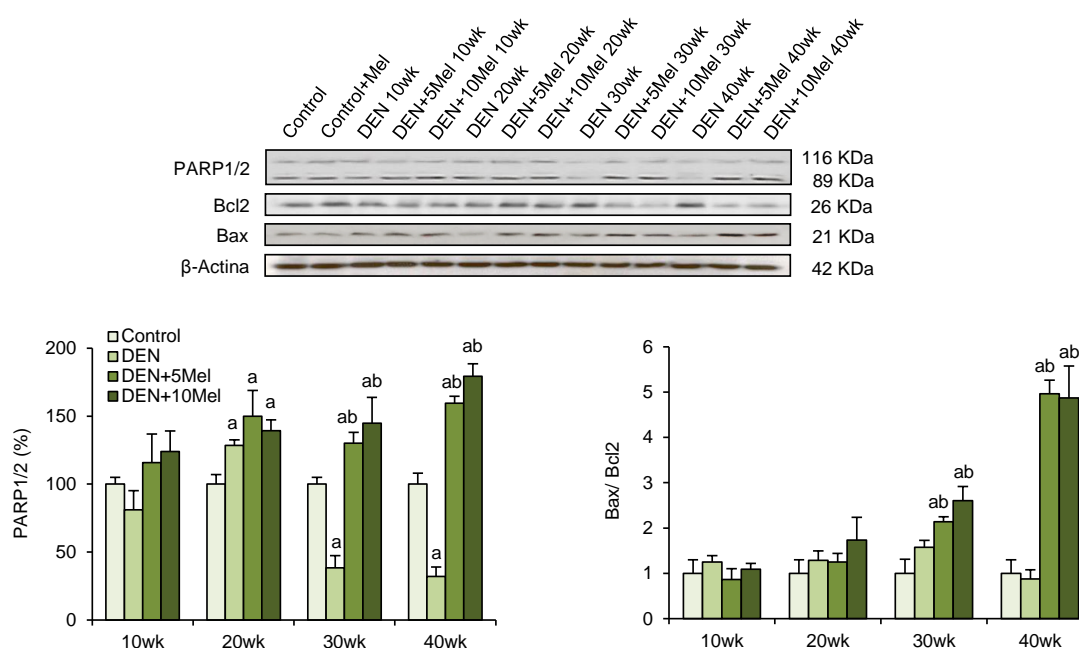
Además, y como parte importante de la evaluación del proceso de hepatocarcinogénesis, se analizó la expresión de las proteínas supresoras de tumores p21 y p53. Nuestros resultados indican que a las 30 y 40 semanas tras la administración del carcinógeno su expresión se redujo significativamente. Sin embargo, en los grupos DEN tratados con melatonina se incrementó significativamente dicha expresión, con una respuesta dependiente de la dosis (Figura 26).



**Figura 26.** Expresión proteica de p21 y p53. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Para evaluar el posible efecto proapoptótico de la melatonina en el CHC, se evaluaron diferentes marcadores de la vía apoptótica mediante Western blot. Observamos que la expresión del marcador de apoptosis PARP1/2 disminuyó en animales con DEN desde la semana 30 hasta el final del estudio, mientras que aumentó significativamente con la administración de melatonina, mostrando valores similares a los de los respectivos grupos control. La melatonina, además, aumentó el

equilibrio entre las proteínas apoptóticas y antiapoptóticas, como indican los resultados de la relación Bax/Bcl-2 (Figura 27). Estos datos sugieren, por tanto, que la melatonina aumenta la expresión de diversos marcadores de la vía intrínseca de la apoptosis en el CHC inducido por DEN.



**Figura 27.** Expresión proteica de PARP1/2, Bax y Bcl2. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

### 5.2.2 Efecto de la melatonina sobre la respuesta autofágica

Se he indicado que la autofagia está asociada a los diferentes agentes causantes del CHC. Por ello, y para definir el impacto funcional de la melatonina en la autofagia, se determinó el flujo autofágico a lo largo de los distintos periodos del estudio. La respuesta autofágica se monitorizó mediante MET evaluando la presencia de vesículas autofágicas o autofagosomas. La MET reveló un aumento de diversas estructuras autofágicas en las células hepáticas de los ratones expuestos a DEN con respecto a los ratones Control, en los primeros periodos del estudio. Los fagóforos y autofagosomas de doble membrana con orgánulos dañados englobados (flechas negras), estaban presentes principalmente a las 40 semanas en los grupos que recibieron DEN (Figura 28). Sin embargo, en los ratones tratados con melatonina, se identificó un menor número de vacuolas autofágicas.

La monitorización estática de los niveles de autofagosomas no es suficiente para dilucidar los efectos sobre el mecanismo autofágico en el CHC inducido por la administración de DEN en el modelo murino, ya que la acumulación de autofagosomas podría ser el resultado tanto de un aumento en su formación como de una disminución en el subsecuente proceso de fusión con los lisosomas (Mizushima y cols., 2010). Por tanto, con el fin de examinar de forma más completa la autofagia, se decidió combinar el estudio de diferentes marcadores autofágicos mediante la técnica de Western blot.

Se analizaron los cambios en la expresión hepática de la forma fosforilada de Atg13, puesto que constituye uno de los elementos necesarios para la formación del autofagosoma. Los resultados mostraron un incremento significativo desde la semana 20 del inicio del experimento en los grupos que recibieron DEN. En los últimos periodos, el tratamiento con melatonina redujo estos incrementos de forma dependiente de la dosis (Figura 29).

El complejo Beclina-1-PI3K es otro elemento crítico en la vía de señalización de la autofagia. La expresión proteica de Beclina-1 reveló un aumento significativo en los

dos últimos periodos del estudio (30 y 40 semanas), tras la administración de DEN. La melatonina logró revertir dichos aumentos con ambas dosis (Figura 29).

También, se evaluó la conversión de LC3-I a LC3-II, marcador específico de autofagia puesto que interviene de forma directa en la formación del autofagosoma (Pankiv y cols., 2007; Mehta y cols., 2014). La relación LC3-II/LC3-I se incrementó con la administración de melatonina en los dos primeros periodos del estudio (10 y 20 semanas) demostrando, así, que la melatonina es capaz de inducir la autofagia en estadios tempranos tras la administración de DEN. Sin embargo, a las 30 y 40 semanas del estudio, el tratamiento con melatonina redujo los niveles significativamente elevados de LC3-II/LC3-I (Figura 29).

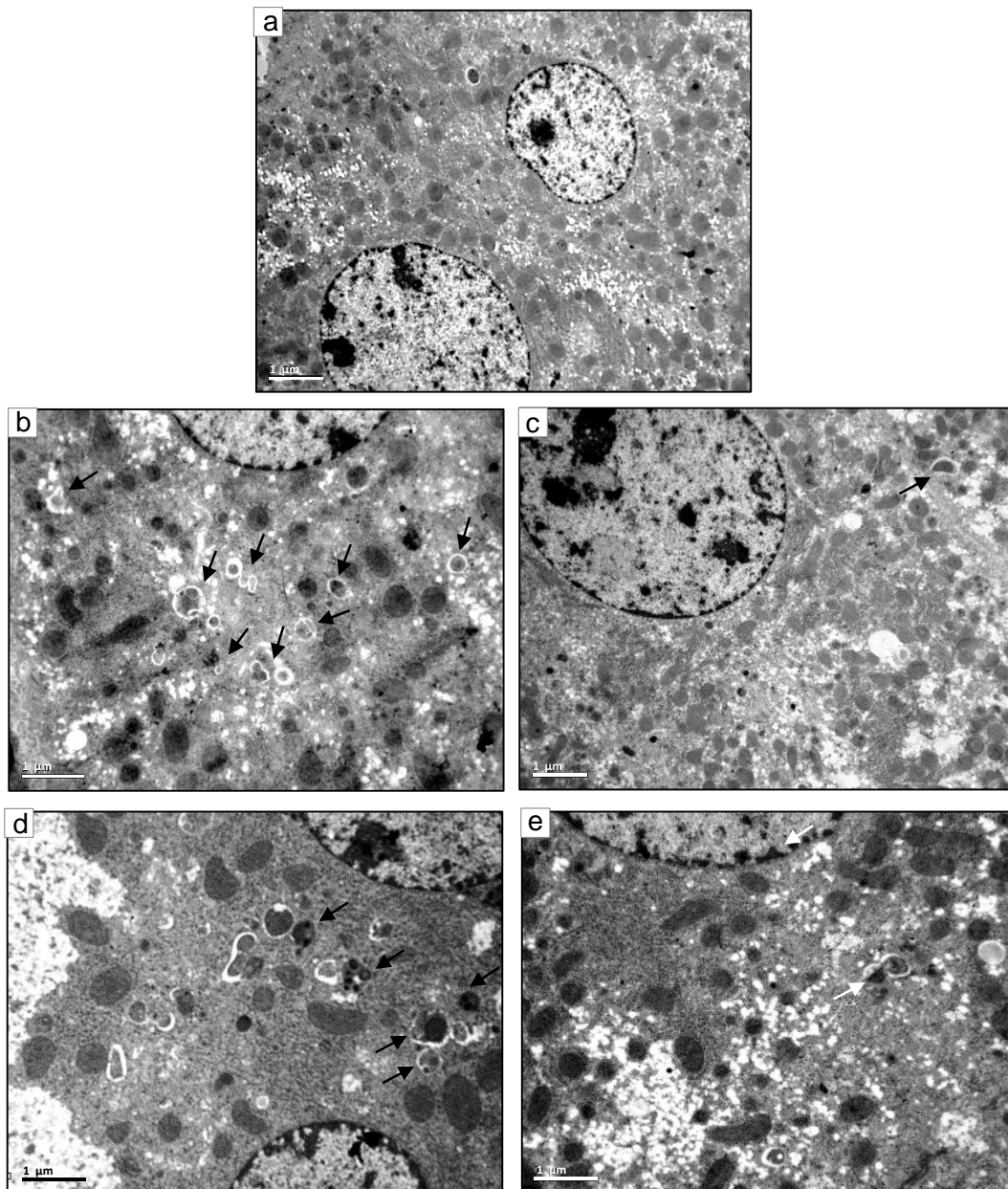
Posteriormente, se estudió mediante Western blot el sustrato específico de autofagia p62/SQTM1, una proteína adaptadora cuyo papel fundamental es medir la autofagia selectiva capturando proteínas ubiquitinadas para fijarlas a LC3-II en el autofagosoma con el fin de que sean degradadas posteriormente (Pankiv y cols., 2007). La expresión proteica de p62/SQTM1 aumentó desde la semana 20 hasta el final del estudio en los grupos que recibieron DEN. Este incremento disminuyó tras la administración de melatonina en las semanas 30 y 40, de una manera dependiente de la dosis (Figura 29).

Además, la expresión del marcador lisosomal LAMP-2 aumentó significativamente en los grupos de CHC, desde la semana 20, probablemente debido a una mayor acumulación de autofagolisosomas. El tratamiento con melatonina redujo dicha expresión de manera significativa (Figura 29).

Una de las principales vías de señalización que regulan la autofagia está modulada por mTOR que, en condiciones estables de nutrientes celulares, actúa como un regulador negativo (Meijer y Codogno, 2009). Los datos obtenidos mostraron una expresión hepática de la forma fosforilada de mTOR (p-mTOR) aumentada en los ratones que recibieron DEN a las 30 y 40 semanas del estudio, al igual que otros marcadores de autofagia analizados mediante Western blot (Figura 29). Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente en un modelo de

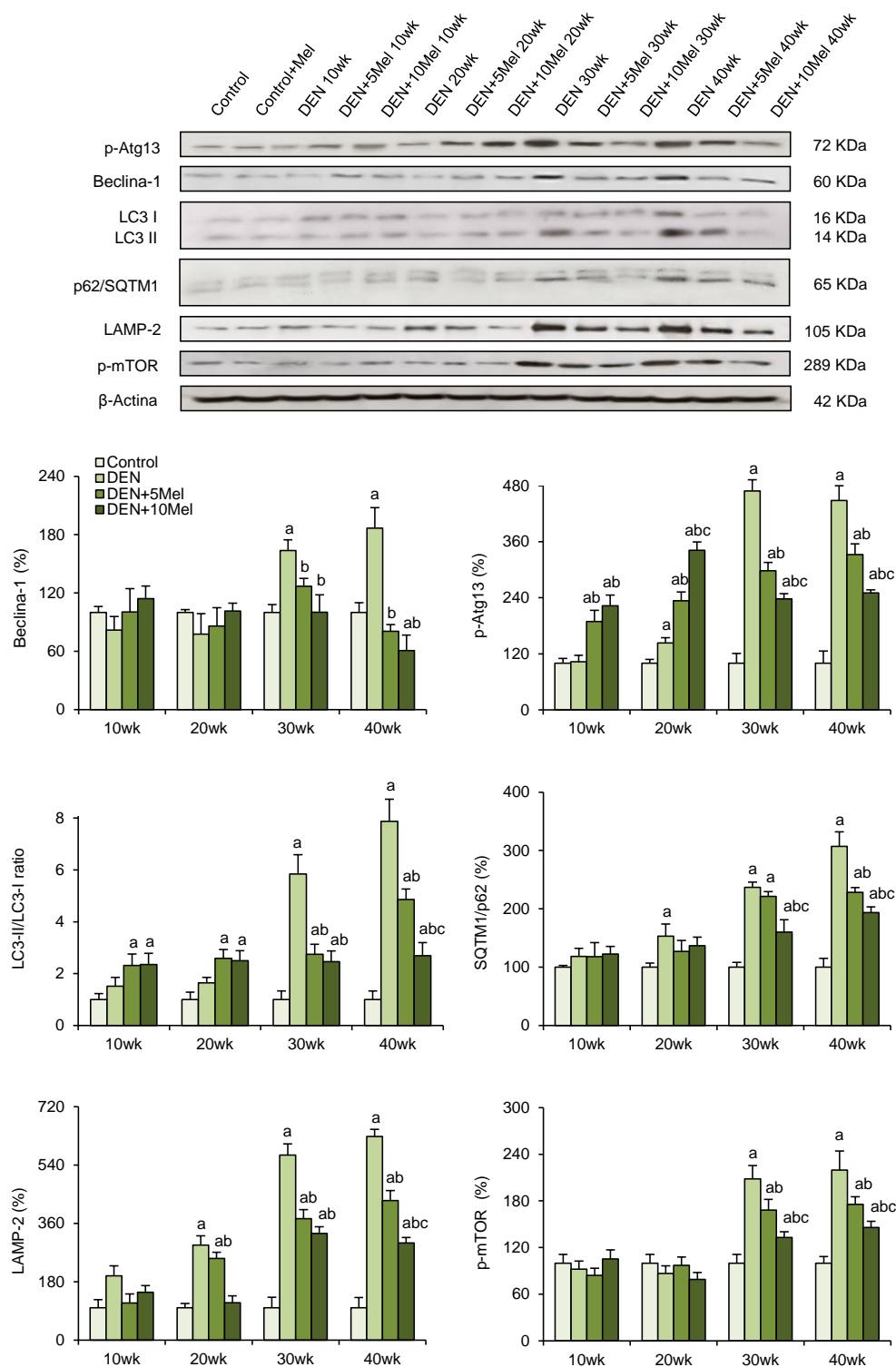
fibrosis hepática inducida por  $\text{CCl}_4$  en ratones (San-Miguel y cols., 2015). En ambos estudios, la melatonina logró disminuir de forma significativa los niveles en hígado de p-mTOR.

Por todo ello, los resultados del presente estudio sugieren que la melatonina aminora la respuesta autofágica asociada con el CHC inducido por el hepatotóxico DEN.



**Figura 28.** MET de las secciones hepáticas de los diferentes grupos experimentales y a diferentes semanas (wk) de estudio. (a): Control; (b): DEN 20wk; (c): DEN+10Mel 20wk; (d): DEN 40wk; (e): DEN+10Mel 40wk. Aumentos: 5.000-15.000.



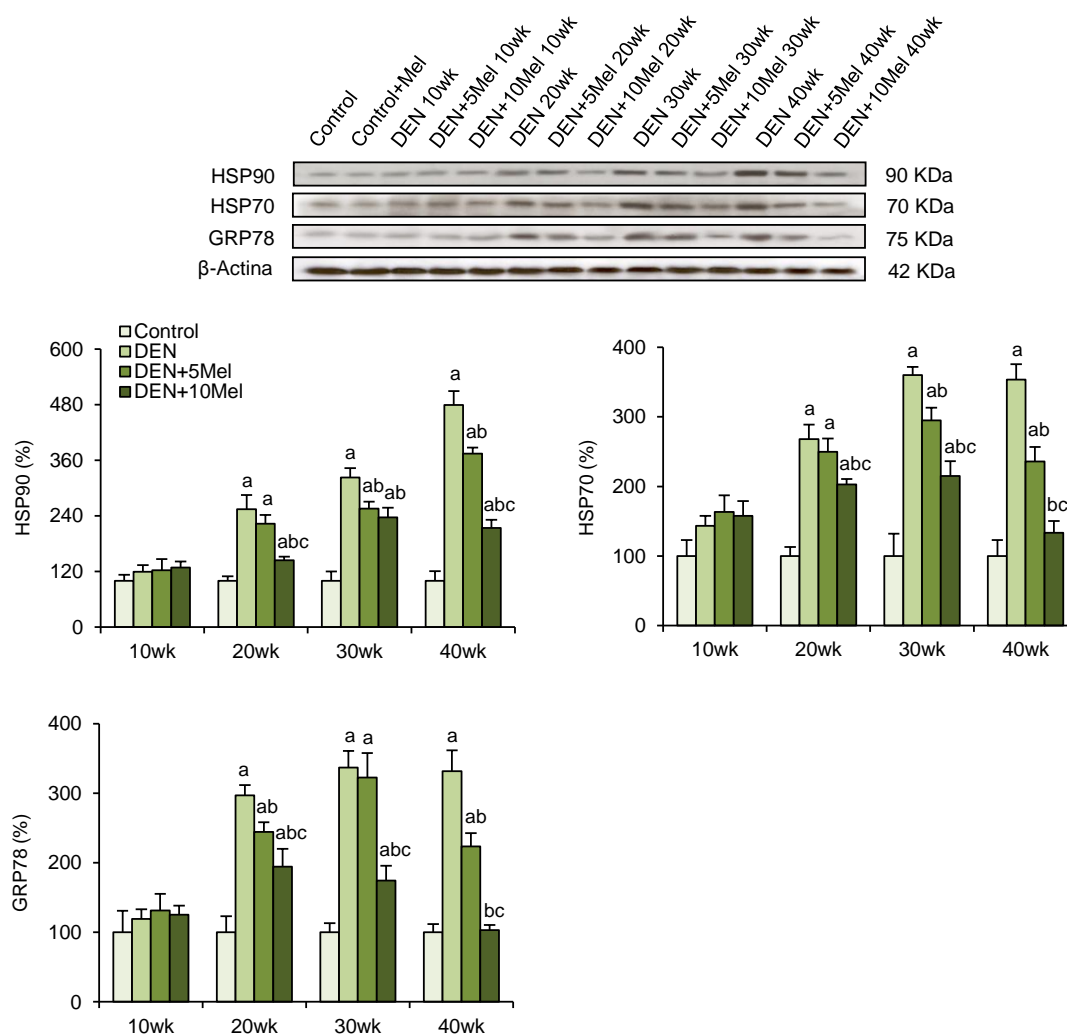


**Figura 29.** Expresión proteica de la forma fosforilada de Atg13, Beclina-1, LC3-I/II, p62/SQTM1, LAMP-2, y p-mTOR. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

### 5.2.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE

El estrés del RE es uno de los mecanismos que se alteran en la hepatocarcinogénesis y está fuertemente ligado a la vía apoptótica. La vía de señalización activada por la interrupción de la homeostasis del RE, la UPR, juega un importante papel en la proliferación, metabolismo y supervivencia celular (Bu y cols., 2018). Por lo tanto, decidimos evaluar alguna de las más importantes chaperonas activadas por la UPR, y el efecto del tratamiento con melatonina en los diferentes periodos de tiempo del modelo de CHC inducido por DEN. Los resultados mostraron un aumento significativo en la concentración de las proteínas HSP70, HSP90 y GRP78 a partir de las 20 semanas de la administración de DEN. Por el contrario, la melatonina indujo una reducción de los niveles sobreexpresados, con una mejor respuesta cuando se empleó la dosis más alta del indol (Figura 30).

Los resultados obtenidos indican que la reducción del daño hepático asociado al tratamiento con la melatonina, se relaciona con la atenuación del estrés del RE mediante la modulación de la UPR. Además, sustentan y apoyan un efecto *in vivo* antitumoral de la melatonina, tal y como se ha visto en otros estudios en cultivos celulares. Esto es importante porque otros compuestos, como la silimarina, con características hepatoprotectoras *in vitro* han resultado ser poco prometedoras en modelos animales (Imamoto y cols., 2014).

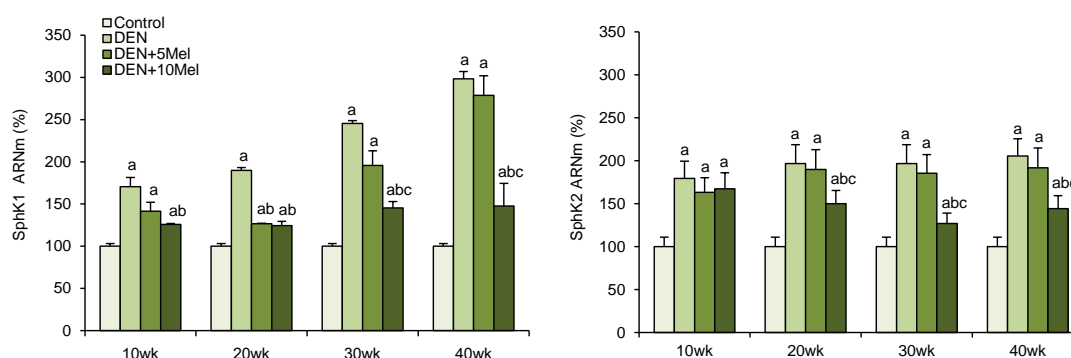


**Figura 30.** Expresión proteica de HSP90, HSP70 y GRP78. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

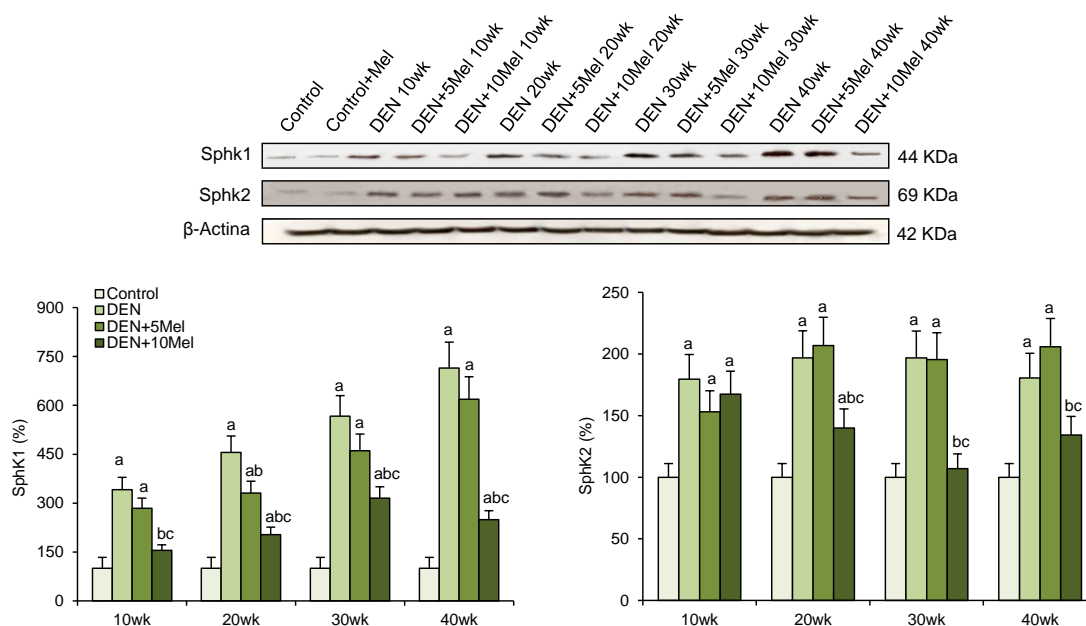
#### **5.2.4 Efecto de la melatonina sobre el eje esfingosina quinasa (SphK)/esfingosina 1-fosfato (S1P), y otras vías de señalización relacionadas**

En el modelo animal se investigó si la reducción de la progresión a CHC, inducida por la melatonina, estaba asociada con la regulación de la vía SphK/S1P y otras vías relacionadas, tales como la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAPKs, que han demostrado ser cruciales para la proliferación y supervivencia celular en el CHC.

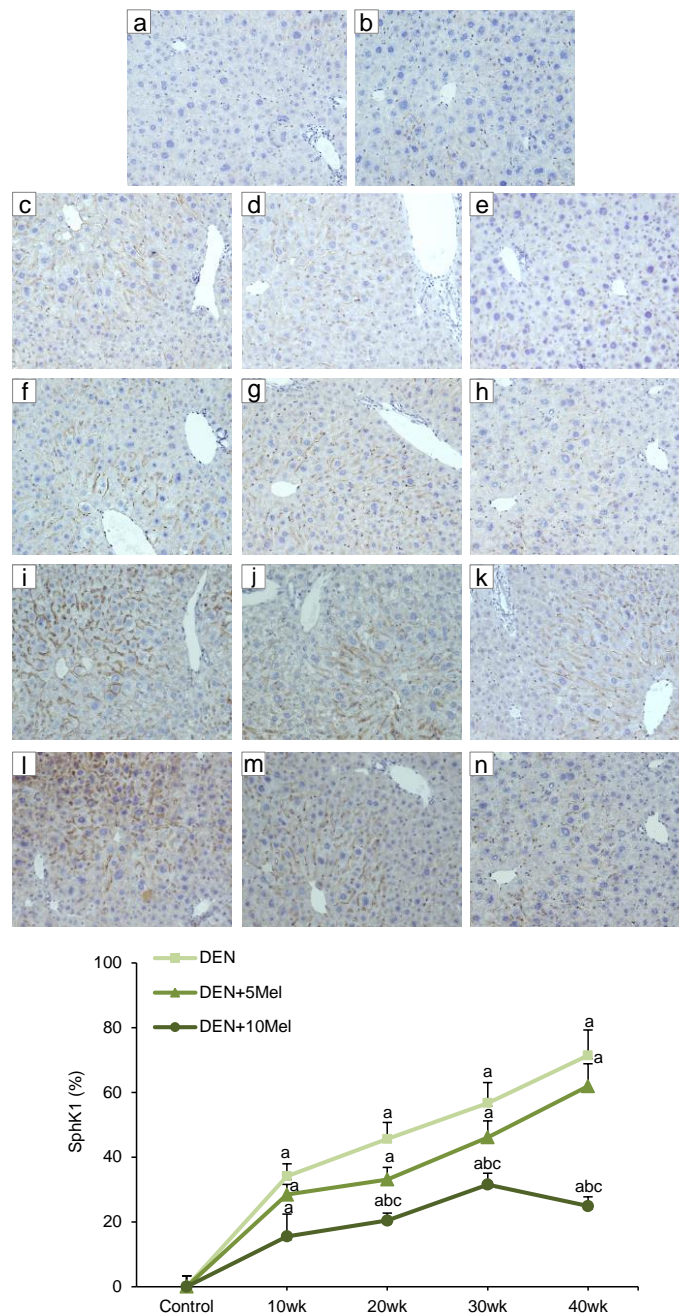
En primer lugar se determinó la expresión de las enzimas SphK1, SphK2 mediante RT-qPCR, Western blot e inmunohistoquímica en los diferentes periodos del estudio. Los niveles de ARNm y la concentración de proteína de la SphK1 se incrementaron significativamente y de manera progresiva desde la semana 10 en ratones que recibieron DEN. Estos efectos disminuyeron tras la administración de melatonina de forma más marcada en los grupos que fueron tratados con la hormona a la dosis más alta (Figuras 31 y 32). Los datos se comprobaron *in situ* mediante la inmunohistoquímica de SphK1, que confirmó un incremento progresivo en el porcentaje de células SphK1-positivas tras la administración de DEN, y una reducción de estos porcentajes tras el tratamiento con melatonina, de manera dosis dependiente (Figura 33). La administración de DEN también provocó un temprano y mantenido incremento de los niveles de ARNm, así como de la expresión proteica, de la SphK2. Este incremento se redujo tras la administración de la dosis mayor de melatonina, desde la semana 20 del estudio.



**Figura 31.** Expresión relativa de ARNm de SphK1 y SphK2 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P$ <0,05 comparado con Control. <sup>b</sup> $P$ <0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P$ <0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

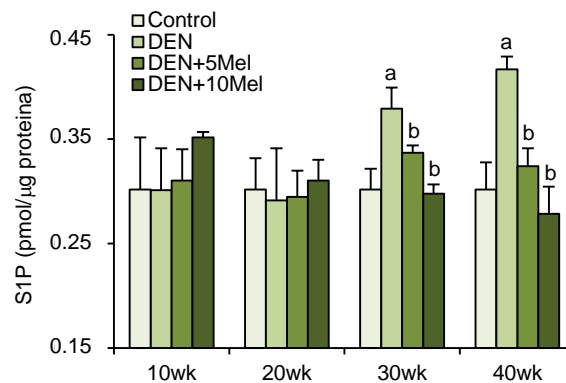


**Figura 32.** Expresión proteica de SphK1 y SphK2. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P$ <0,05 comparado con Control. <sup>b</sup> $P$ <0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P$ <0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



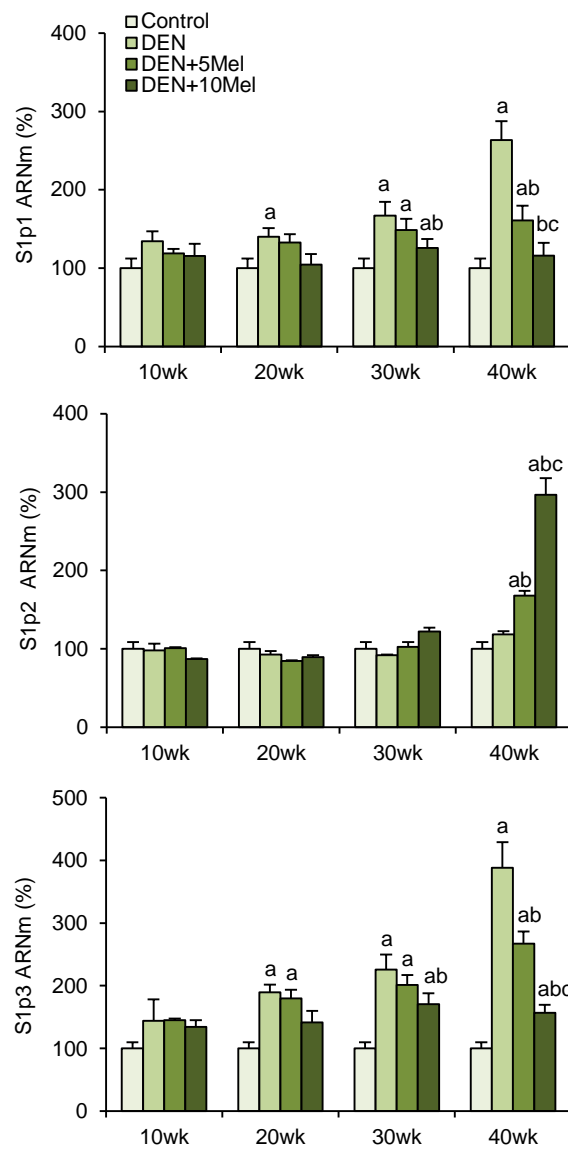
**Figura 33.** Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de SphK1. Las imágenes de las distintas secciones de hígado fueron tomadas en los diferentes grupos experimentales y a las diferentes semanas (wk) de estudio. (a) Control; (b) Control+Mel; (c) DEN 10wk; (d) DEN+5Mel 10wk; (e) DEN+10Mel 10wk; (f) DEN 20wk; (g) DEN+5Mel 20wk; (h) DEN+10Mel 20wk; (i) DEN 30wk; (j) DEN+5Mel 30wk; (k) DEN+10Mel 30wk; (l) DEN 40wk; (m) DEN+5Mel 40wk; (n) DEN+10Mel 40wk. Aumentos: 200x. El gráfico inferior muestra el análisis de las áreas positivas a SphK1. La melatonina (5 mg/kg, 5Mel ó 10 mg/kg, 10Mel) fue administrada durante 10wk, 20wk, 30wk ó 40wk a ratones que previamente habían recibido DEN o vehículo (Control+Mel). Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Además, se analizaron los niveles de S1P mediante una prueba ELISA. Los datos obtenidos mostraron que los niveles de S1P aumentaron significativamente desde la semana 30 en los ratones tratados con el hepatotóxico DEN y que se redujeron tras la administración de melatonina, de manera dosis dependiente (Figura34).



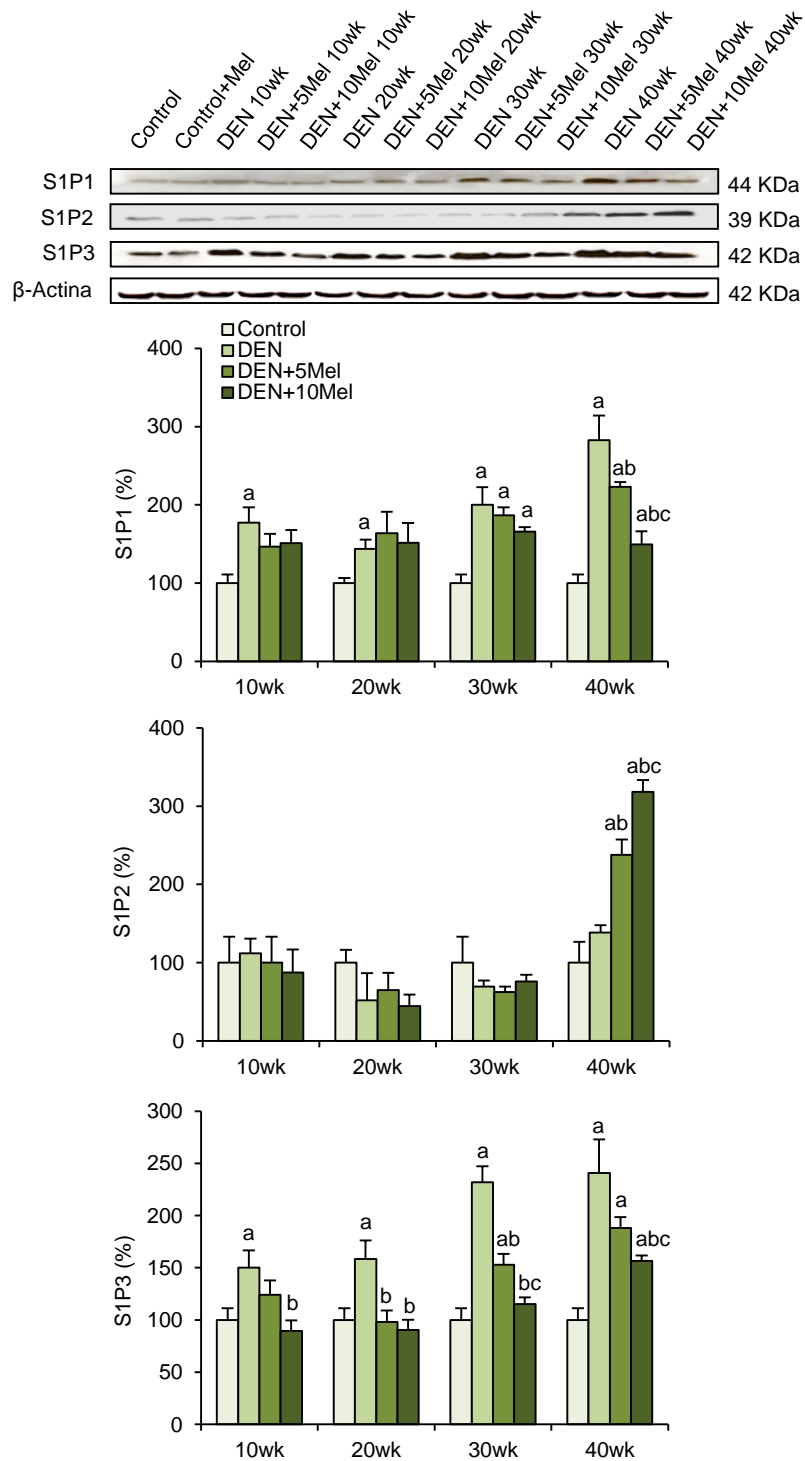
**Figura 34.** Nivel de S1P en homogeneizados de hígado de los diferentes grupos experimentales y a las semanas (wk) de estudio, analizados mediante una prueba ELISA. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Puesto que la S1P está implicada en procesos de proliferación, apoptosis, motilidad, diferenciación, y regulación de la función inmune mediante receptores de superficie unidos a proteína G, se estudiaron los efectos de la melatonina en estos receptores (S1P1, S1P2 y S1P3). Los niveles de ARNm y la concentración de proteína de los receptores S1P1 y S1P3 aumentaron en los ratones a los cuales se les administró DEN, desde la semana 20 del estudio. Estos efectos fueron aminorados con la administración de melatonina, alcanzando mejores resultados con la dosis mayor de la indolamina. Por el contrario, los niveles del S1P2 no variaron durante los tres primeros periodos del estudio, y se incrementaron tras el tratamiento con melatonina a las 40 semanas (Figuras 35 y 36).



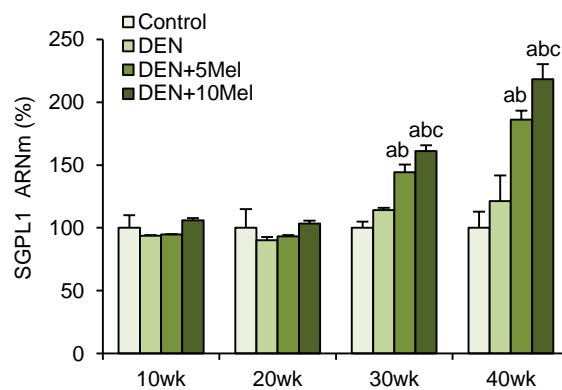
**Figura 35.** Expresión relativa de ARNm de S1p1, S1p2 y S1p3 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



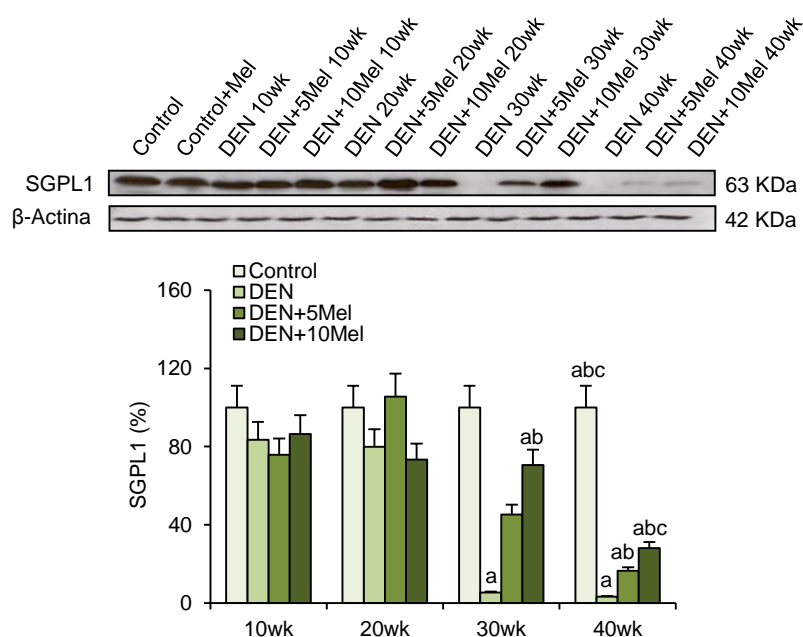


**Figura 36.** Expresión proteica de S1P1, S1P2 y S1P3. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Por otro lado, se determinó la concentración de la SGPL1, única enzima capaz de degradar el esfingolípidio bioactivo S1P de forma irreversible. Esta enzima resultó significativamente disminuida tras el tratamiento con DEN a las 30 y 40 semanas del estudio. La administración de melatonina provocó durante estos periodos un incremento de los niveles de ARNm y de proteína, de forma dependiente de la dosis (Figuras 37 y 38).



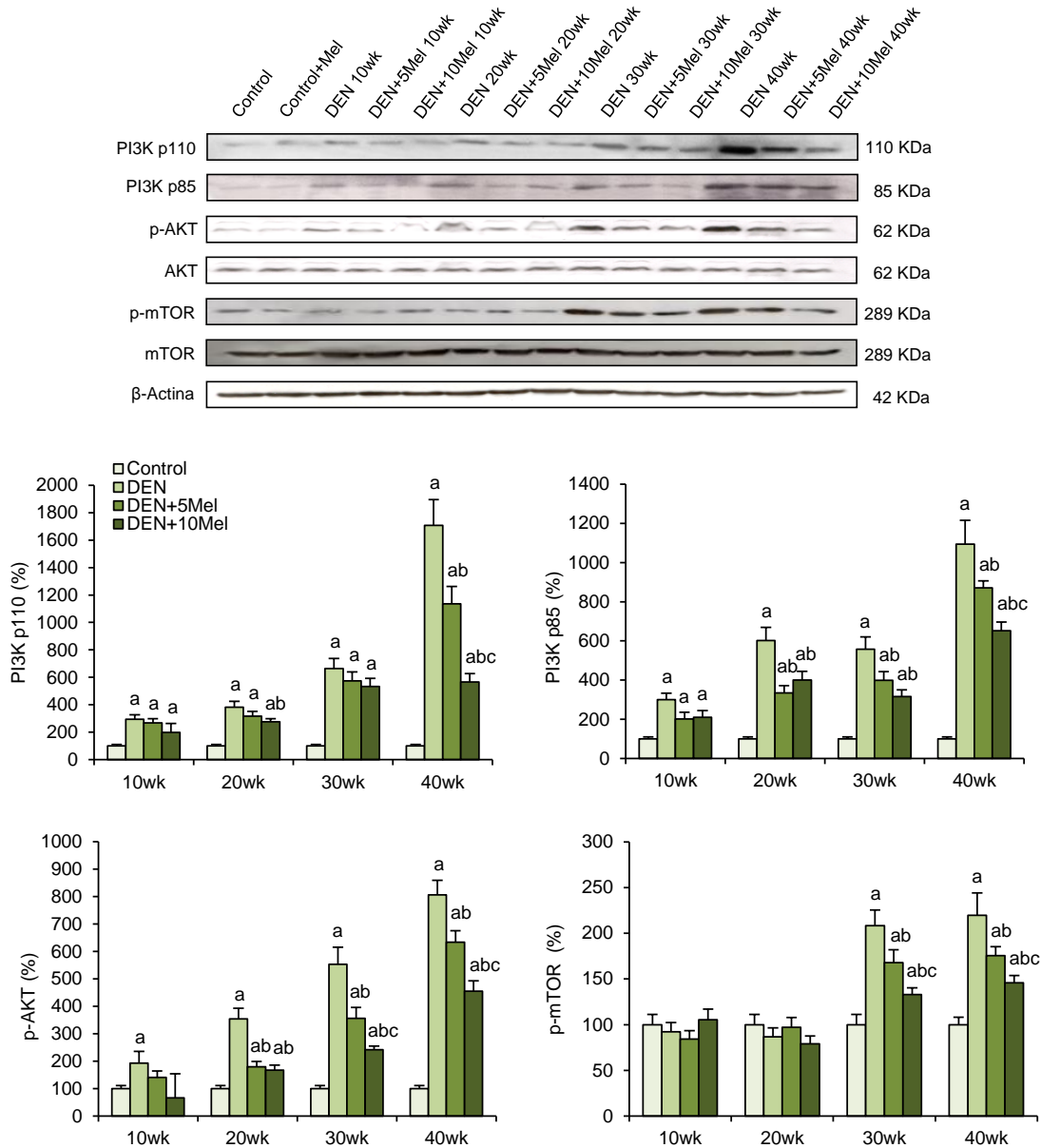
**Figura 37.** Expresión relativa de ARNm de SGPL1 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



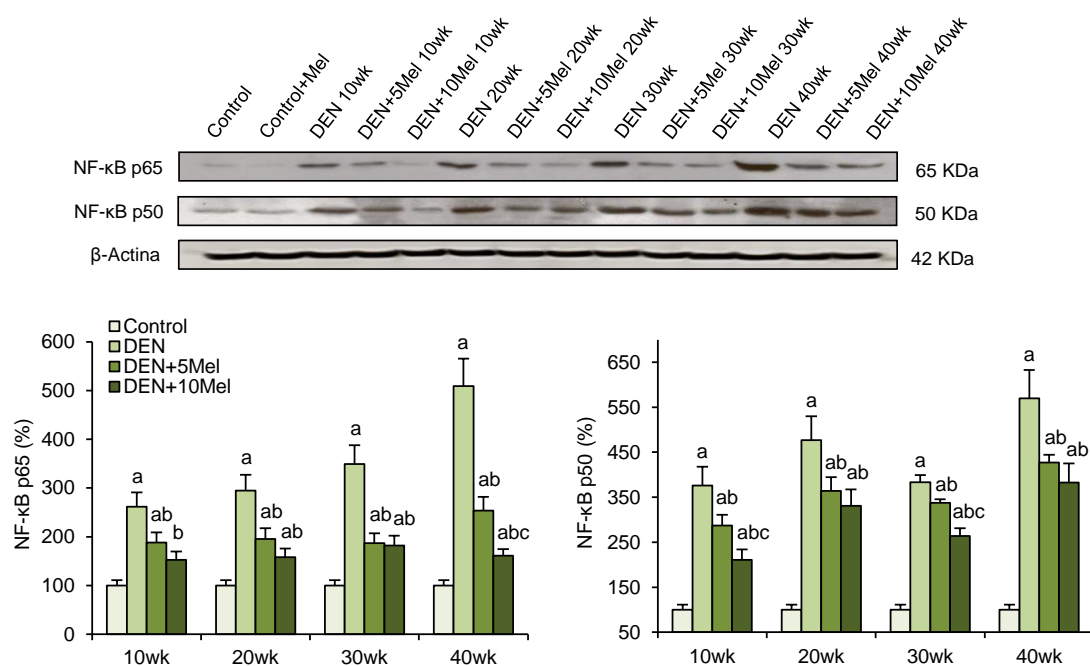
**Figura 38.** Expresión proteica de SGPL1. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

Posteriormente, se estudió el papel de la melatonina en la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAPKs, ya que han demostrado ser de gran interés en el desarrollo del CHC. Los datos obtenidos demostraron que la expresión de las subunidades de PI3K y la forma fosforilada de AKT (p-AKT) se incrementaron desde la semana 10 del experimento; p-mTOR aumentó su expresión a partir de la semana 30, alcanzando un máximo de expresión a las 40 semanas del estudio en los ratones que recibieron DEN (Figura 39). La expresión de las subunidades de NF- $\kappa$ B y la forma fosforilada de STAT3 (p-STAT3) también se incrementaron desde los primeros periodos, 10 y 20 semanas, respectivamente. Finalmente, la administración de DEN indujo un incremento significativo de la forma fosforilada de ERK (p-ERK) y de p38 (p-p38) desde la semana 10 del inicio del experimento. Todos estos efectos fueron significativamente aminorados por la melatonina de manera dependiente de la dosis

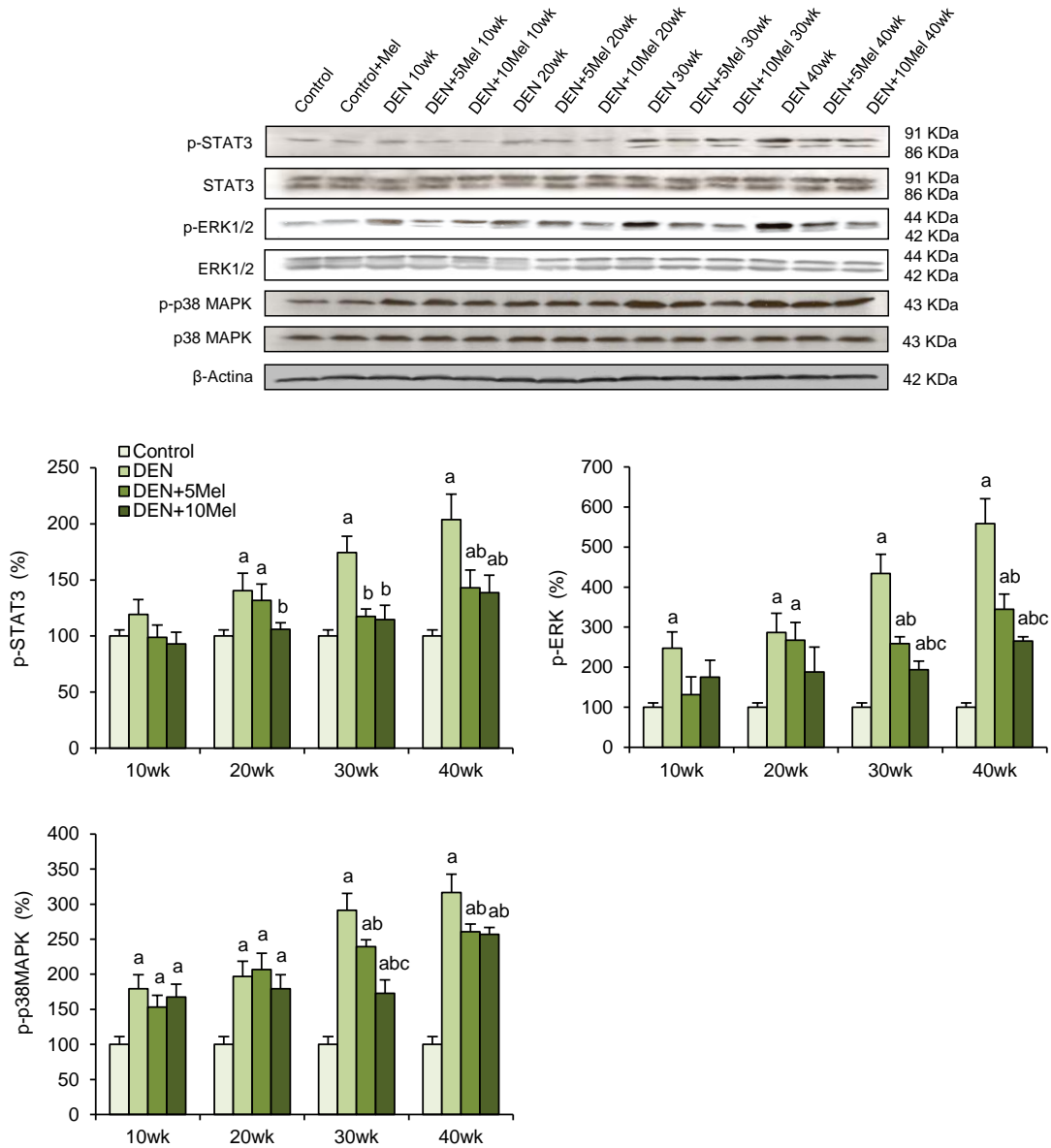
(Figuras 40 y 41). Con estos estudios comprobamos cómo la melatonina juega un papel importante en la reducción de la progresión al CHC mediante la regulación de la vía SphK/S1P y otras vías relacionadas, tales como la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAPKs.



**Figura 39.** Expresión proteica de las subunidades de PI3K, p110 y p85, AKT, p-AKT, mTOR y p-mTOR. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ±S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 40.** Expresión proteica de las subunidades de NF-κB, p65 y p50. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 41.** Expresión proteica de STAT3, p-STAT3, ERK, p-ERK, p38 y p-p38. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios ±S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

---

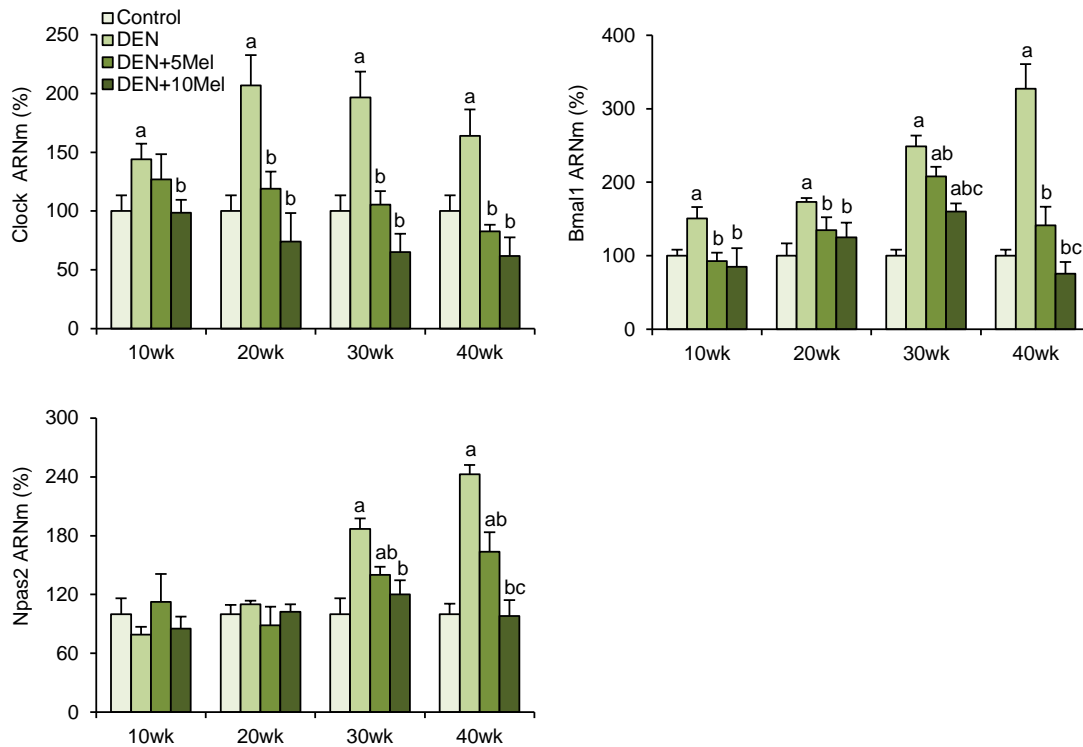
### 5.3 Efecto de la administración de melatonina en la regulación del ritmo circadiano en el modelo animal de CHC inducido por DEN

Con el fin de investigar si la melatonina mejora la progresión del CHC en ratones mediante la regulación de la maquinaria del reloj circadiano, se examinó la expresión de ARNm de los principales “genes reloj” implicados en la vía, *Bmal1*, *Clock*, *Npas2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *CK1ε*, *Rev-erbα*, *Rev-erbβ*, *Rora*, y *Sirt1*, mediante RT-qPCR. Seguidamente, para corroborar los datos del perfil de expresión del ARNm, y evaluar si la desregulación de los genes circadianos daba como resultado un patrón de expresión diferente a nivel de proteína, *BMAL1*, *CLOCK*, *REV-ERBα*, *REV-ERBβ* y *RORα* se evaluaron mediante Western blot.

Desde los primeros períodos experimentales los niveles de ARNm de *Bmal1*, *Clock* y *Npas2* se incrementaron significativamente en los grupos que recibieron DEN, en comparación con el grupo Control. La expresión proteica de *BMAL1* y *CLOCK* también aumentó significativamente. Estos efectos disminuyeron significativamente tras el tratamiento con melatonina (Figuras 42 y 43). Posteriormente, y para evaluar en profundidad el patrón de expresión proteica del factor de transcripción *BMAL1*, se realizó un análisis inmunohistoquímico. Los resultados revelaron un aumento de la inmunorreactividad en los grupos que recibieron DEN. Se observó una reducción significativa en los ratones tratados con melatonina (Figura 44).

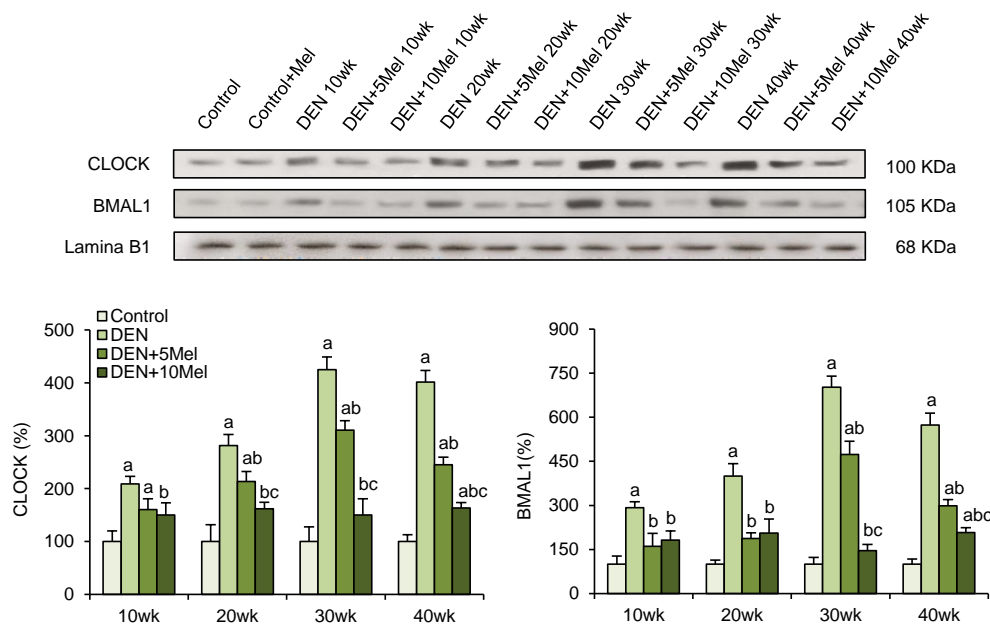
Los genes *Per1*, *Per2*, *Per3* y *Cry1*, constituyen un bucle de retroalimentación negativa reguladora del complejo *BMAL1/CLOCK* (Zhou y cols., 2016). Su análisis mediante RT-qPCR mostró niveles disminuídos de ARNm desde la semana 20 hasta el final del estudio en animales que recibieron DEN. Este efecto fue revertido tras la administración de melatonina (Figura 45).

La caseína quinasa CK1 $\epsilon$ , que al fosforilar las proteínas PER y CRY conduce a su degradación, también disminuyó su expresión tras la administración de DEN. Sin embargo, con la dosis mayor de melatonina se produjo un aumento significativo en dicha expresión (Figura 46).

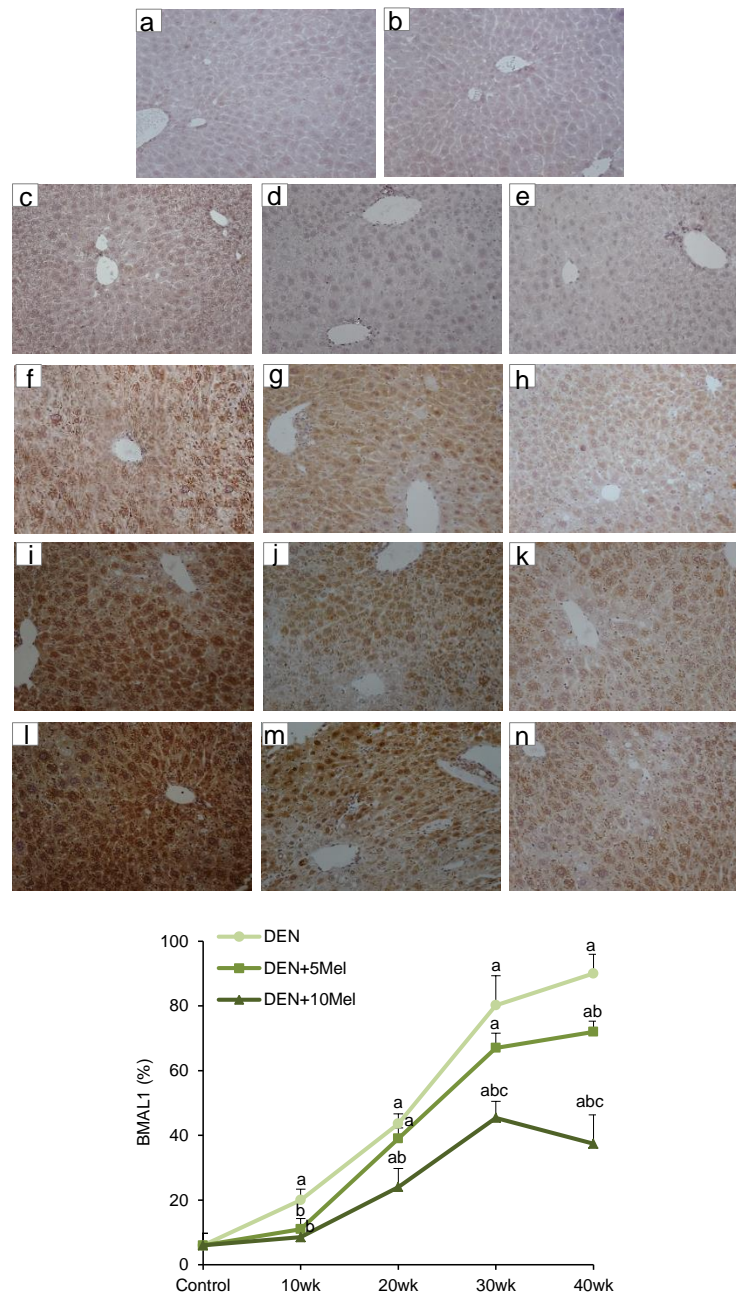


**Figura 42.** Expresión relativa de ARNm de Clock, Bmal1 y Npas2 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

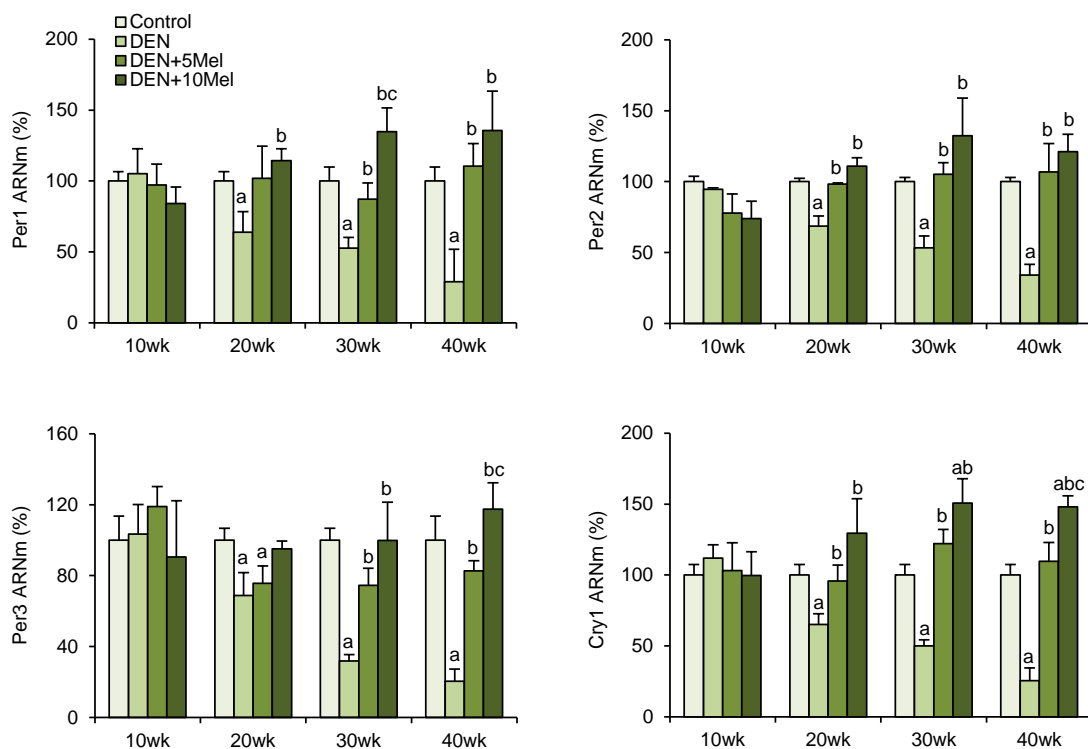




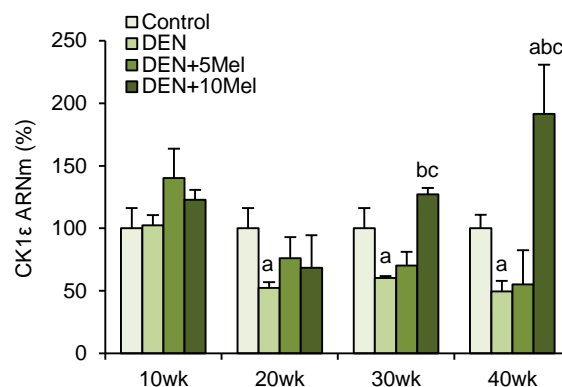
**Figura 43.** Expresión proteica de CLOCK y BMAL1. El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de Lamina B1. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 44.** Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de BMAL1. Las imágenes de las distintas secciones de hígado fueron tomadas en los diferentes grupos experimentales y a las diferentes semanas (wk) de estudio. (a) Control; (b) Control+Mel; (c) DEN 10wk; (d) DEN+5Mel 10wk; (e) DEN+10Mel 10wk; (f) DEN 20wk; (g) DEN+5Mel 20wk; (h) DEN+10Mel 20wk; (i) DEN 30wk; (j) DEN+5Mel 30wk; (k) DEN+10Mel 30wk; (l) DEN 40wk; (m) DEN+5Mel 40wk; (n) DEN+10Mel 40wk. Magnificación original: 200x. El gráfico inferior muestra el análisis de las áreas positivas a SphK1. La melatonina (5 mg/kg, 5Mel ó 10 mg/kg, 10Mel) fue administrada durante 10wk, 20wk, 30wk ó 40wk a ratones que previamente habían recibido DEN o vehículo (Control+Mel). Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

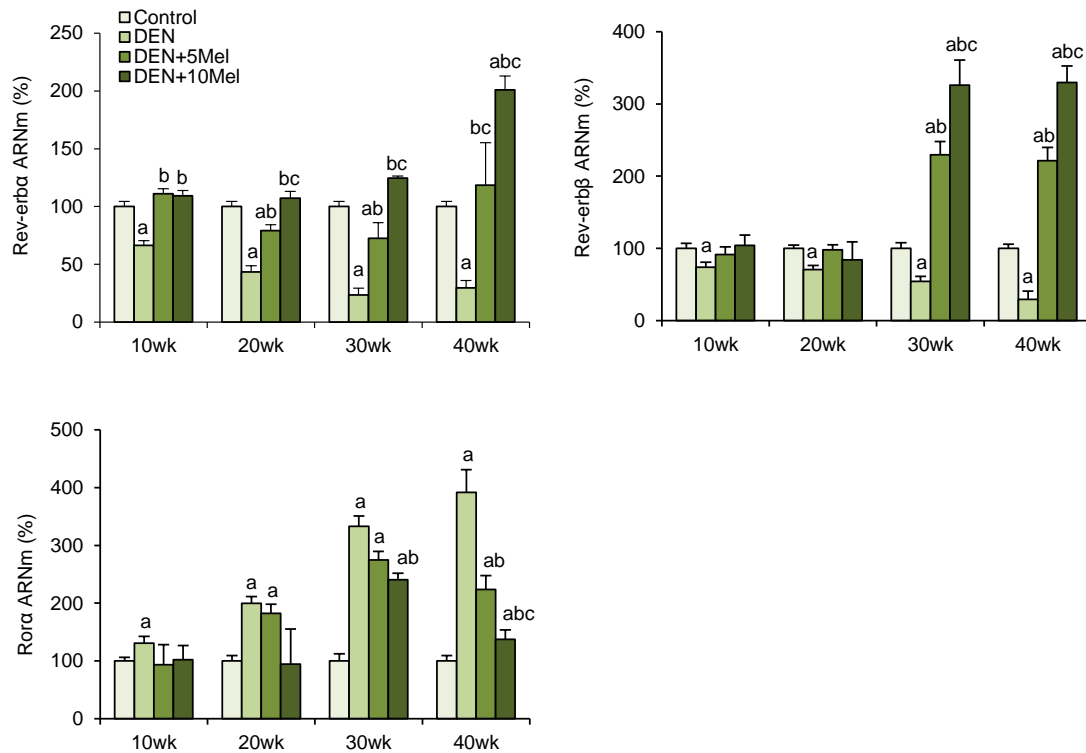


**Figura 45.** Expresión relativa de ARNm de Per1, Per2, Per3 y Cry1 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

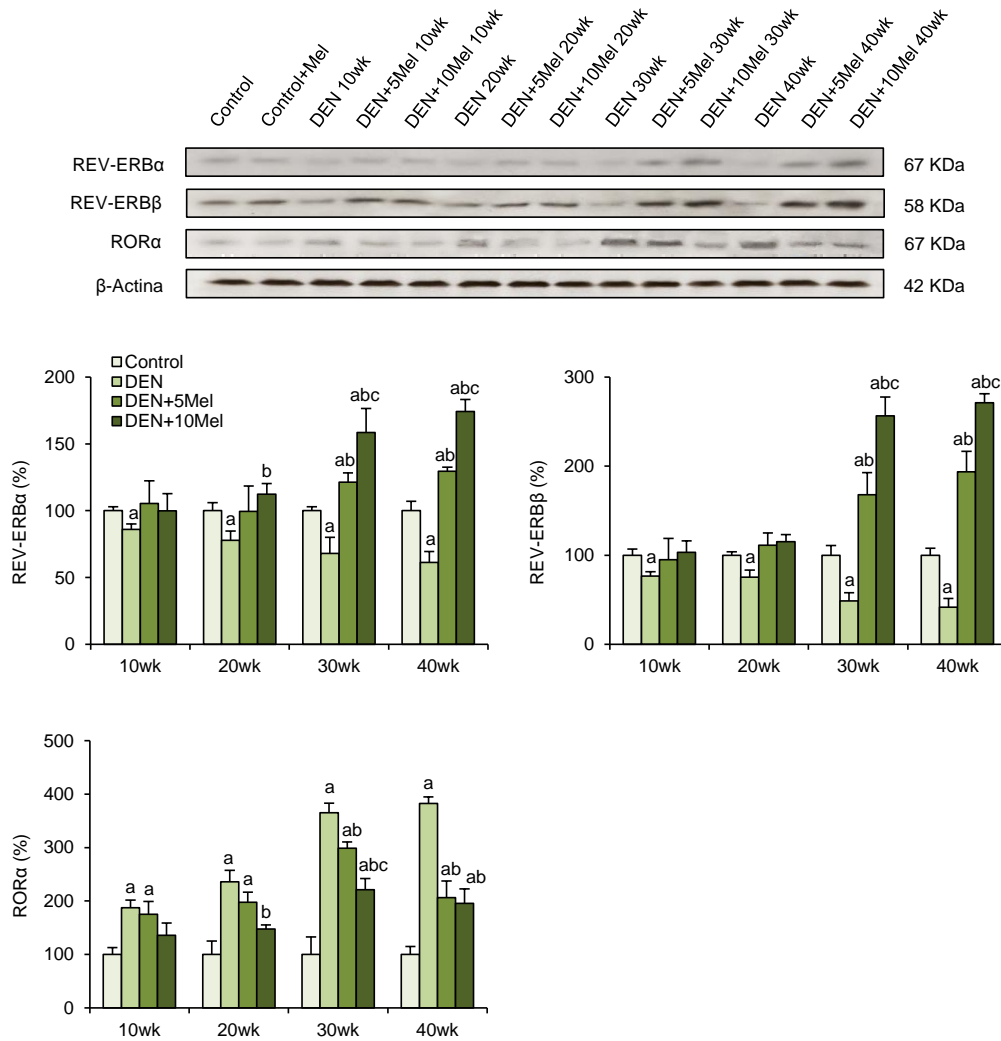


**Figura 46.** Expresión relativa de ARNm de CK1 $\epsilon$  analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

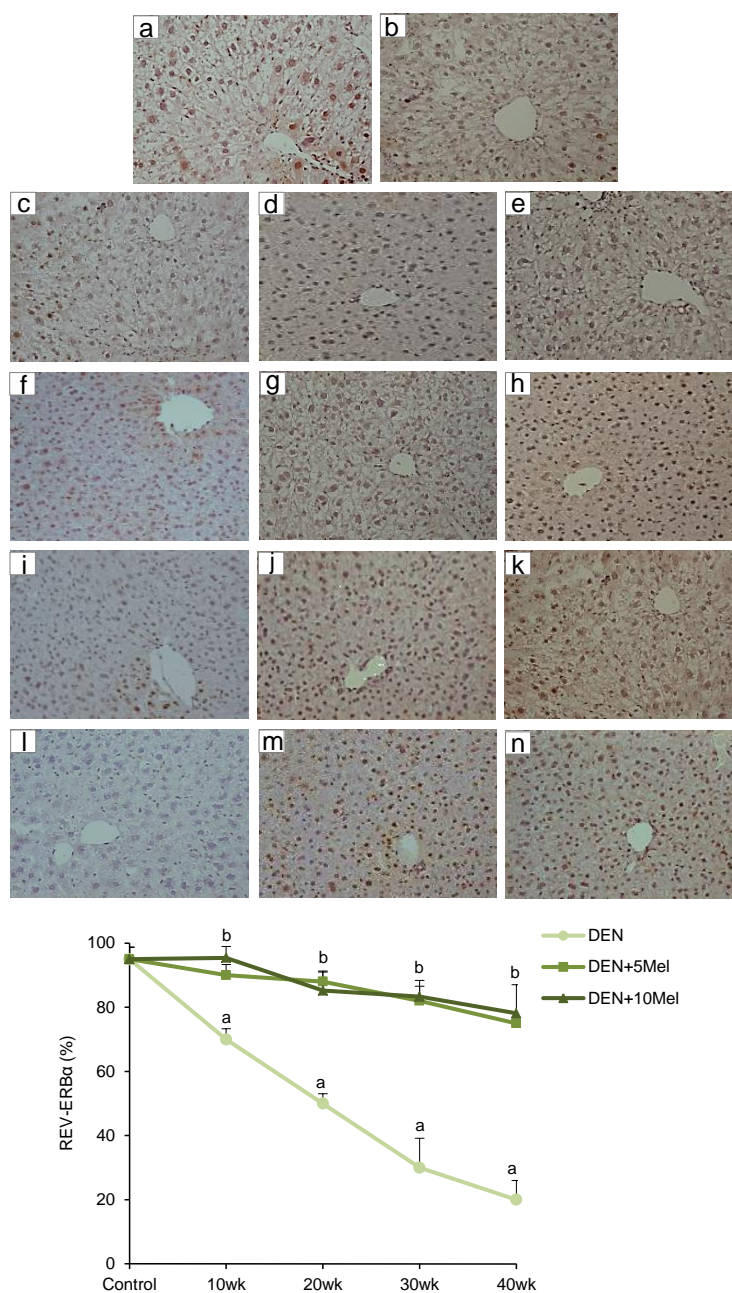
También se investigó el circuito de retroalimentación negativa compuesto por los receptores nucleares REV-ERB y ROR $\alpha$ . REV-ERB $\alpha$  y REV-ERB $\beta$  reprimen la transcripción de BMAL1, en contraste con el papel ejercido por ROR $\alpha$  que activa su transcripción (Wang y cols., 2015). Nuestros resultados mostraron que las expresiones de ARNm y proteína de REV-ERB $\alpha$  y REV-ERB $\beta$  disminuyeron en los grupos que recibieron DEN desde la semana 10. La melatonina aumentó estas expresiones de una manera dependiente de la dosis, principalmente en los dos últimos periodos de tiempo del estudio (Figuras 47 y 48). Los datos se confirmaron mediante inmunohistoquímica. El análisis puso de manifiesto una ubicación nuclear de REV-ERB con una expresión significativamente menor en los grupos que recibieron DEN, en comparación con los grupos Control, desde los primeros periodos del estudio, y con un patrón de expresión similar al observado en los análisis de ARNm y proteína. La melatonina fue capaz de restaurar dicha expresión tras la administración de DEN (Figura 49). Por el contrario, los niveles de ARNm y proteína de ROR $\alpha$  se sobreexpresaron en los animales inyectados con DEN, y este efecto se redujo significativamente tras el tratamiento con melatonina (Figuras 47 y 48).



**Figura 47.** Expresión relativa de ARNm de Rev-erb $\alpha$ , Rev-erb $\beta$  y Rora analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

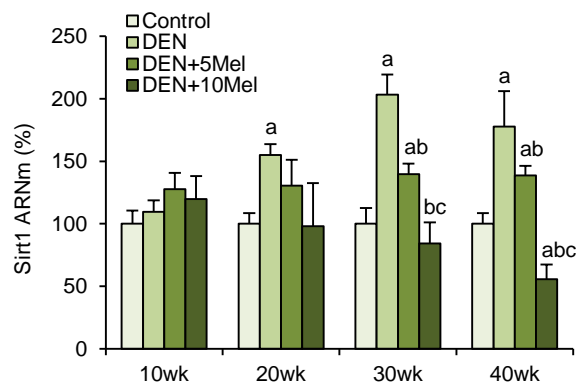


**Figura 48.** Expresión proteica de REV-ERB $\alpha$ , REV-ERB $\beta$  y ROR $\alpha$ . El panel superior muestra los Western blot representativos de los diferentes grupos experimentales a las diferentes semanas (wk) de estudio. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina. El panel inferior muestra el análisis densitométrico expresado como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.



**Figura 49.** Detección inmunohistoquímica de la expresión hepática de REV-ERB $\alpha$ . Las imágenes de las distintas secciones de hígado fueron tomadas en los diferentes grupos experimentales y a las diferentes semanas (wk) de estudio. (a) Control; (b) Control+Mel; (c) DEN 10wk; (d) DEN+5Mel 10wk; (e) DEN+10Mel 10wk; (f) DEN 20wk; (g) DEN+5Mel 20wk; (h) DEN+10Mel 20wk; (i) DEN 30wk; (j) DEN+5Mel 30wk; (k) DEN+10Mel 30wk; (l) DEN 40wk; (m) DEN+5Mel 40wk; (n) DEN+10Mel 40wk. Magnificación original: 200x. El gráfico inferior muestra el análisis de las áreas positivas a SphK1. La melatonina (5 mg/kg, 5Mel ó 10 mg/kg, 10Mel) fue administrada durante 10wk, 20wk, 30wk ó 40wk a ratones que previamente habían recibido DEN o vehículo (Control+Mel). Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

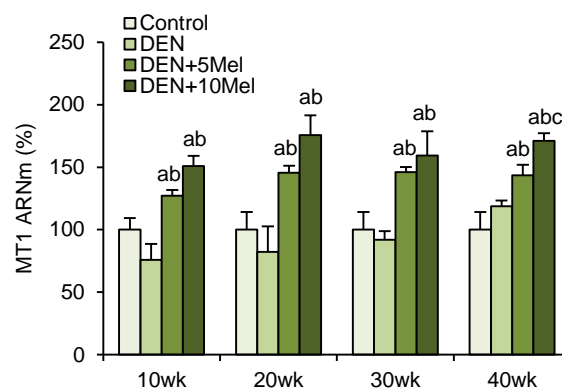
La expresión de ARNm de Sirt1 también se evaluó debido a su papel en la modulación de los relojes circadianos (Asher y cols., 2008) y su influencia en las respuestas celulares regulando el ciclo celular, la reparación del ADN, la supervivencia celular y la apoptosis (Chalkiadaki y Guarente, 2015). La melatonina redujo los niveles elevados de Sirt1 producidos por el DEN a partir de las 20 semanas del inicio del experimento y hasta el final del estudio (Figura 50).



**Figura 50.** Expresión relativa de ARNm de Sirt1 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

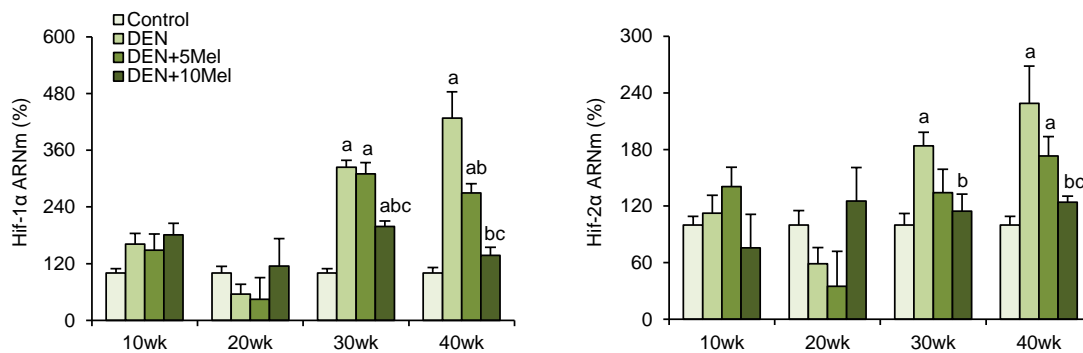


Por otro lado, estudios previos indican que la administración de melatonina, a través de su receptor de membrana MT1, reprime elementos del oscilador periférico en células de cáncer de mama (Xiang y cols., 2012). Por lo tanto, evaluamos la expresión de MT1 en cada uno de los periodos del estudio, encontrando un aumento significativo a partir de la semana 10 en los grupos que recibieron melatonina (Figura 51).



**Figura 51.** Expresión relativa de ARNm de MT1 analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

La expresión alterada de los genes reloj es una de las causas derivadas de la hipoxia en el CHC, y se ha demostrado que la sobreexpresión de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$ , inducidos en células de CHC después del tratamiento con CoCl<sub>2</sub>, altera el patrón de expresión de dichos genes (Yu y cols., 2015). Los resultados del presente estudio mostraron que la melatonina reduce los niveles sobreexpresados de estos factores de transcripción inducidos por DEN, a las 30 y 40 semanas del estudio (Figura 52).



**Figura 52.** Expresión relativa de ARNm de Hif-1 $\alpha$  y Hif-2 $\alpha$  analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos experimentales y semanas (wk) de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M (n=8). <sup>a</sup>P<0,05 comparado con Control. <sup>b</sup>P<0,05 comparado con DEN mismo periodo. <sup>c</sup>P<0,05 comparado con DEN+5Mel mismo periodo. Los datos del grupo Control+Mel no se muestran ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control y Control+Mel.

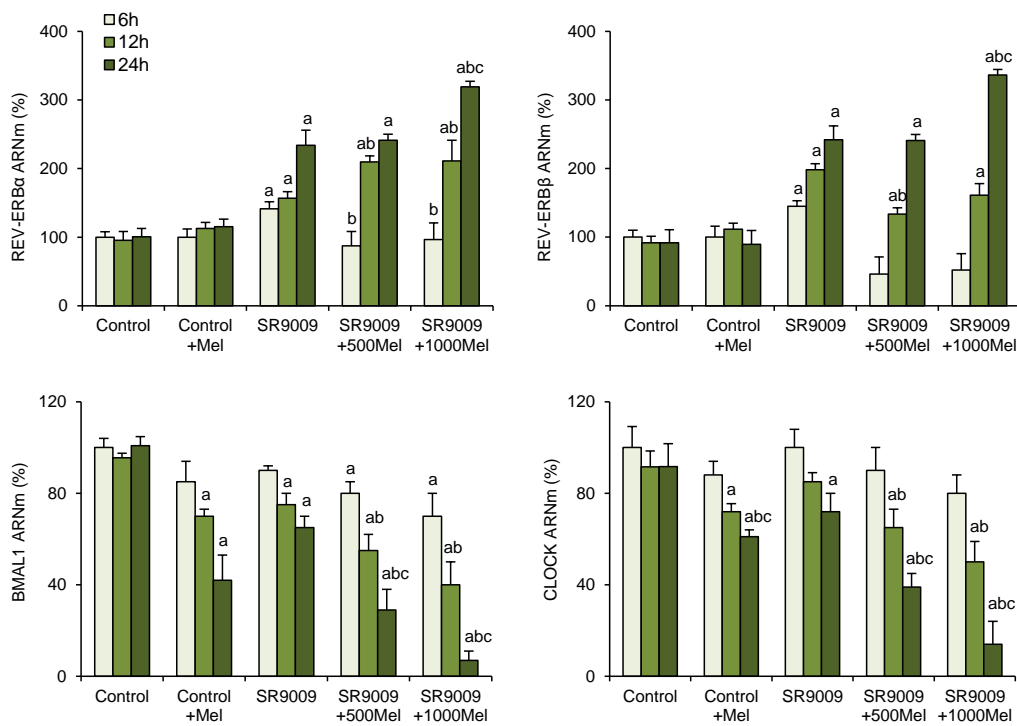
---

## **5.4 Efecto de la administración de melatonina en la regulación del ritmo circadiano en células Hep3B**

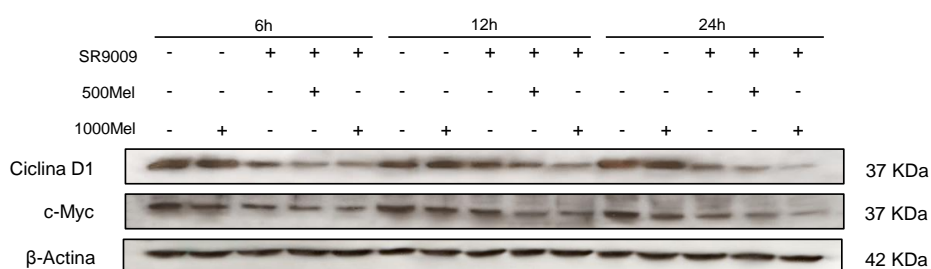
Con el fin de profundizar en el conocimiento del papel modulador de la melatonina sobre los principales genes que controlan el ritmo circadiano, se decidió emplear un modelo *in vitro* de estudio, como es el caso de las células Hep3B, una línea celular de hepatocarcinoma humano.

### **5.4.1 Efecto de la administración de melatonina y SR9009 sobre la proliferación de células Hep3B**

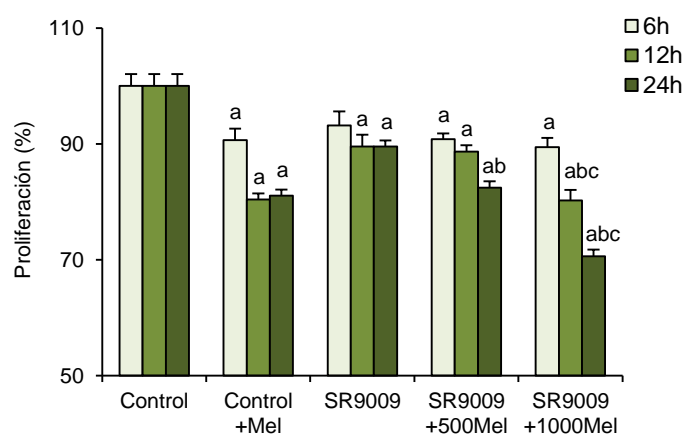
Para conocer el papel del receptor nuclear REV-ERB sobre BMAL1, uno de los principales componentes de la maquinaria circadiana, y sobre el posible efecto regulador de la melatonina sobre este y, por consiguiente, sobre el ritmo circadiano, se decidió emplear un ligando sintético de REV-ERB en células Hep3B. Estos ligandos, incluido el SR9009, se han desarrollado como prometedores moduladores del reloj molecular (Solt y cols., 2012). En este estudio *in vitro*, se analizó el efecto del SR9009, solo o en combinación con melatonina, sobre la proliferación de las células Hep3B. El tratamiento con el agonista SR9009 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) produjo una sobreexpresión de REV-ERB $\alpha$  y REV-ERB $\beta$  y una disminución en los niveles del ARNm de BMAL1 y CLOCK. Estos efectos fueron potenciados por el tratamiento con melatonina (0,5 ó 1  $\text{mmol/L}$ ) (Figura 53). La administración conjunta de melatonina y SR9009 indujo una disminución adicional en la expresión de oncogenes clave, tales como la ciclina D1 y c-Myc, en comparación con la administración única del SR9009 (Figura 54). También se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular para analizar la capacidad de la melatonina, junto con el ligando de REV-ERB, para reducir la proliferación de las células Hep3B. La melatonina indujo un efecto antiproliferativo significativo y mejoró el efecto ejercido por el SR9009 (Figura 55).



**Figura 53.** Expresión relativa de ARNm de Rev-erb $\alpha$ , Rev-erb $\beta$ , Bmal1 y Clock analizada mediante ensayo de RT-qPCR en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos (6h, 12h ó 24h), e indicada como % respecto al grupo Control. Los datos fueron normalizados frente a  $\beta$ -Actina. Valores medios  $\pm$ S.E.M de 3 experimentos independientes. <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control al mismo tiempo. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con SR9009 en el mismo tiempo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con SR9009 + 500Mel en el mismo tiempo.



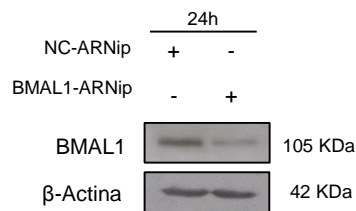
**Figura 54.** Expresión proteica de Ciclina D1 y c-Myc. Western blot representativos de los diferentes grupos de estudio a diferentes tiempos (6h, 12h ó 24h). La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de  $\beta$ -Actina.



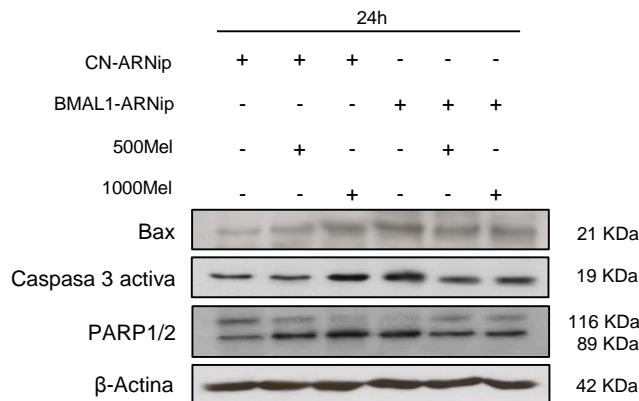
**Figura 55.** Respuesta proliferativa en células Hep3B analizada mediante el kit de proliferación celular CyQUANT en los diferentes grupos de estudio y a diferentes tiempos (6h, 12h ó 24h), e indicada como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M de 3 experimentos independientes. <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control en el mismo tiempo. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con SR9009 en el mismo tiempo. <sup>c</sup> $P < 0,05$  comparado con SR9009 +500Mel en el mismo tiempo.

#### 5.4.2 Efecto de la administración de melatonina sobre la apoptosis y la proliferación, tras el silenciamiento génico de BMAL1, en células Hep3B

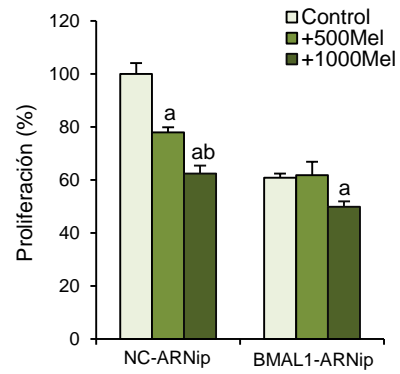
Para investigar más a fondo la posible contribución del sistema circadiano y, en concreto de BMAL1, uno de los componentes centrales de la vía, en los efectos de la melatonina, se llevaron a cabo experimentos adicionales de silenciamiento génico en células Hep3B. Se transfectaron las células con los ARNs de interferencia BMAL1-ARNip, y su control negativo CN-ARNip, encontrando aproximadamente un 80% de eficacia de silenciamiento a las 48 horas de realizada la transfección (Figura 56). Se observó que la proliferación de las células Hep3B disminuyó después del silenciamiento de BMAL1. Además, se produjo un aumento en la expresión de los marcadores de apoptosis Bax, la forma activa de la Caspasa 3 y PARP1/2. Así, el silenciamiento de BMAL1 atenuó el efecto pro-apoptótico y antiproliferativo de la melatonina (Figuras 57 y 58).



**Figura 56.** Confirmación del silenciamiento de BMAL1. Western blot representativos de los diferentes grupos de estudio a las 24h post-transfección. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina.



**Figura 57.** Expresión proteica de Bax, Caspasa 3 activa y PARP1/2. Western blot representativos de los diferentes grupos de estudio a las 24h post-tratamiento. La igualdad en la carga de las proteínas se ilustra con las bandas de β-Actina.



**Figura 58.** Respuesta proliferativa en células Hep3B analizada mediante el kit de proliferación celular CyQUANT en los diferentes grupos de estudio, e indicada como % respecto al grupo Control. Valores medios  $\pm$ S.E.M de 3 experimentos independientes. <sup>a</sup> $P < 0,05$  comparado con Control. <sup>b</sup> $P < 0,05$  comparado con 500Mel.





## *6 DISCUSIÓN*

---



El CHC es el principal tumor hepático en todo el mundo y, lamentablemente, su incidencia en los países de Europa occidental, entre los que se incluye España, continúa en aumento (El-Serag, 2012). La prevención de la enfermedad hepática crónica como la cirrosis o la hepatitis sigue siendo la primera línea de acción; sin embargo, una vez establecido, el desarrollo del CHC es silencioso y asintomático (Mazzaferro y cols., 1996). Una vez detectado, el CHC puede tratarse principalmente mediante cirugía, quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia; esencialmente dependiendo del grado del tumor y la etapa de la enfermedad. La eliminación completa del cáncer sin dañar los tejidos circundantes es el objetivo del tratamiento (De Lope y cols., 2012). Sin embargo, la propensión del CHC a invadir el tejido adyacente o a diseminarse a sitios distantes por metástasis, a menudo, limita la efectividad de los tratamientos disponibles; y la quimioterapia y la radioterapia lamentablemente ejercen un efecto negativo sobre las células normales.

En los últimos años, las terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas se proponen como una alternativa prometedora en oncología. Administradas solas o en combinación con otros tratamientos, estas terapias están destinadas a mejorar la eficacia y la selectividad, y a reducir los efectos nocivos en las células no tumorales (Rossi y cols., 2010). Sin embargo, dado que el "cáncer" hace referencia a un conjunto de enfermedades, es poco probable que haya una terapia única para el mismo.

Como mencionamos anteriormente, la melatonina es una indolamina ubícuamente altamente conservada a lo largo de la evolución. Debido a su estructura química y a sus características hidrofílicas y lipofílicas, es una molécula muy versátil, capaz de interactuar con diferentes vías intracelulares para modular procesos fisiológicos (Hardeland, 2009; Leja-Szpak y cols., 2010). Sus características antioxidantes, inmunomoduladoras y antiinflamatorias han sido ampliamente documentadas, alcanzando un creciente interés en investigación biomédica (Reiter y cols., 2000; Guerrero y Reiter, 2002; Carrillo-Vico y cols., 2005; Kubatka y cols., 2018). Además, varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado sus propiedades antitumorales (Vijayalaxmi y cols., 2002; Martin y cols., 2006). Varios ensayos clínicos

han abordado los efectos beneficiosos de la melatonina en tumores sólidos, destacando su mínima o nula toxicidad incluso a dosis altas (Mills y cols., 2005). A pesar de que se han documentado efectos antitumorales, los mecanismos moleculares precisos no han sido completamente dilucidados, y solo hay unos pocos datos con respecto a sus efectos en el CHC.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación muestran que la melatonina disminuye la viabilidad de los hepatocitos tumorales, y sugieren que este efecto puede asociarse con una inducción en la expresión de sus receptores (Martin-Renedo y cols., 2008; Carbajo-Pescador y cols., 2009). Sin embargo, debemos comprender la base científica de estos resultados para confirmar las propiedades potenciales de la melatonina en el CHC.

En línea con estos datos, los estudios realizados en la presente tesis doctoral se centraron en analizar los mecanismos moleculares implicados en los efectos antitumorales de la melatonina en ratones con CHC inducido por DEN, y en células Hep3B derivadas de hepatocitos tumorales humanos.

### **6.1 Efecto de la administración de la melatonina sobre el daño hepático y la progresión tumoral en el modelo animal de CHC inducido por DEN**

Los tumores presentan, generalmente, un alto grado de complejidad, donde los procesos celulares fundamentales tales como la proliferación, la diferenciación y la angiogénesis están alterados o regulados incorrectamente. La terapia molecular eficiente requiere moléculas capaces de modular, no solo uno, sino varios de estos procesos alterados mientras se mantiene la integridad de las células no tumorales (Sun y Tang, 2004). Por esta razón, y en base a las propiedades descritas de la melatonina, y a su toxicidad casi inexistente en los hepatocitos normales, investigamos el uso potencial de este indol en el daño hepático inducido por el hepatotóxico DEN en ratones.

---

En primer lugar, observamos que el patrón histopatológico de las lesiones hepáticas era compatible con los hallazgos bioquímicos, lo cual respalda los cambios biomoleculares implicados en la transformación preneoplásica y neoplásica tras la administración de DEN. Sorprendentemente, y sobre la base de las características histológicas encontradas, el tratamiento con melatonina contribuyó a la disminución del daño inducido químicamente.

Además, la administración de melatonina produjo un descenso significativo en los marcadores de respuesta inflamatoria (IL-6), en los factores de crecimiento (HGF y su receptor c-Met, PDGF- $\beta$  y su receptor PDGFR- $\beta$ ), así como en los marcadores asociados a angiogénesis (VEGF y su receptor VEGFR2, y CD105), todos ellos implicados en la progresión del CHC. Estos resultados se acompañaron de una disminución en la expresión de los marcadores de proliferación Ki67 y PCNA, tras el tratamiento con el indol y, en comparación con los grupos de animales que recibieron el hepatotóxico.

En base a estos resultados, demostramos que el tratamiento con melatonina podría ejercer un efecto protector debido, no solo a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios o regenerativos, sino también a su capacidad para modular diferentes vías de señalización implicadas en la progresión tumoral.

## **6.2 Efecto de la melatonina sobre el eje esfingosina quinasa (SphK)/esfingosina 1-fosfato (S1P), y otras vías de señalización relacionadas, en el modelo animal de CHC inducido por DEN**

Tras la inducción del CHC en ratones, y la confirmación del efecto antiproliferativo de la melatonina, se decidió investigar si la modulación de la vía SphK/S1P se asocia a los efectos beneficiosos del indol. Previamente, se ha demostrado que el complejo SphK/S1P está desregulado en una amplia gama de cánceres sólidos y hematológicos humanos, tales como el CHC, y el adenoma intestinal de cáncer colorrectal (Kohno y cols., 2006), entre otros. Además, se sabe

que la administración de la S1P exógena, potencia la proliferación en células madre cancerosas (Hirata y cols., 2014), células endoteliales migratorias (Heo y cols., 2009), o en células RasV12 transformadas (Yamamoto y cols., 2016), y también induce el crecimiento celular, y reduce la apoptosis en células de cáncer colorrectal (Xun y cols., 2015). Teniendo todo esto en cuenta, una estrategia terapéutica eficaz contra el cáncer podría consistir en modular el eje SphK/S1P.

Anticuerpos monoclonales anti-S1P que neutralizan y atacan específicamente a la S1P son eficaces como terapia frente a diversos tipos de cáncer (Sabbadini, 2011). Por otro lado, la inhibición de la SphK ha demostrado reducir la viabilidad de células de glioblastoma multiforme, células de neuroblastoma, varios tipos celulares en la leucemia, y ciertas líneas tumorales sólidas (Takuga y cols., 2011; Gao y cols., 2015).

El inhibidor selectivo de la SphK1, FTY720, el cual tiene efectos citotóxicos en diversos tipos de cáncer, induce apoptosis tanto en líneas celulares como en modelos animales de CHC (Lee y cols., 2004), y sensibiliza las células del CHC a la citotoxicidad mediada por el antineoplásico sorafenib (Ahmed y cols., 2015). Además, se ha indicado que la N, N-dimetilesfingosina (DMS), otro inhibidor de la SphK, es capaz de suprimir la proliferación y la migración celular en el CHC (Zhang y cols., 2013b).

Los datos del presente estudio indican que la sobreexpresión de las SphK1/SphK2 tuvo lugar en la semana 10 después de la administración de DEN, lo que se acompañó, a partir de la semana 20, de un aumento en la expresión hepática de PCNA, Ciclina D1, Ciclina E, CDK4 y CDK6. Las expresiones de las SphKs y las diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular y la proliferación, se redujeron después de la administración de melatonina. Nuestros resultados sugieren un papel de las SphKs en la respuesta proliferativa, apoyando investigaciones previas que han demostrado que la activación de las SphKs juega un papel significativo en la expresión de Ciclina D, y la proliferación en células de glioblastoma (Radeff-Huang y cols., 2007).

Aunque una investigación reciente demostró que los niveles de ARNm de laSGPL1 están aumentados en pacientes con CHC (Uranbileg y cols., 2016), y existe un consenso general de que la SGPL1 potencia la resistencia celular a los tratamientos

anticancerígenos y da como resultado una mayor capacidad de las células para adquirir un fenotipo transformado y volverse maligno, se ha demostrado una disminución notable de la actividad de la SGPL1 en muestras de tumores de próstata (Brizuela y cols., 2012). Además, estudios en cáncer gastroesofágico correlacionan la resistencia a fármacos citotóxicos con una deficiencia de la SGPL1 (Matula y cols., 2015). Otros estudios han demostrado que bajos niveles de la SGPL1 promueven el cáncer de colon (Degagné y cols., 2014), y se correlacionan con una supervivencia global inferior en pacientes con carcinoma oral de células escamosas (Patmanathan y cols., 2016). Por lo tanto, la literatura sugiere que una doble estrategia destinada a estimular la SGPL1 e inhibir la SphK podría representar un enfoque futuro para sensibilizar las células cancerosas de ciertos tipos de tumores a los tratamientos. Nuestros resultados respaldan este enfoque, mostrando una relación inversa entre la expresión de las SphKs (aumentada) y la SGPL1 (disminuida) en los animales que recibieron DEN. Los datos obtenidos en los grupos que fueron tratados con melatonina, demostraron que la hormona es capaz de modular ambas expresiones.

Se ha indicado que la respuesta biológica a la S1P está desregulada en el cáncer debido a un perfil alterado en la expresión de sus receptores en las células malignas (Patmanathan y cols., 2016). Habiendo comprobado que los animales tratados con DEN podrían producir cantidades elevadas de S1P como resultado de la desregulación en la expresión de las SphKs y la SGPL1, evaluamos qué receptores de la S1P podrían estar involucrados en los efectos de la S1P. Los datos obtenidos mostraron que los receptores S1P1 y S1P3 estaban significativamente sobreexpresados en los animales a los cuales se les había administrado el carcinógeno. Esta expresión se redujo tras el tratamiento con el indol, que también indujo un aumento significativo en la expresión del S1P2. Nuestros datos coinciden con estudios previos que muestran que la alta expresión del S1P1 y del S1P3 en tumores de pacientes con cáncer de mama, se asocia con un mal pronóstico (Watson y cols., 2010), y con otros estudios que demuestran que el antagonista de los receptores S1P1/3, VPC23019, inhibe significativamente la migración de células de carcinoma escamoso (Patmanathan y cols., 2016). Nuestros resultados también

apoyan la demostración experimental de que la sobreexpresión del S1P2 inhibe la migración de células de melanoma (Arikawa y cols., 2003). Además, hay estudios que ponen de manifiesto que la expresión del S1P1 está significativamente incrementada en el CHC, y que el bloqueo de este receptor inhibe la invasión tumoral (Zhang y cols., 2015). Los resultados obtenidos en este estudio respaldan la teoría de que la activación selectiva del S1P2, en combinación con el bloqueo selectivo de los receptores S1P1/S1P3, podría constituir una estrategia terapéutica efectiva contra el cáncer (Takuwa y cols., 2011).

También realizamos estudios para conocer los efectos de la melatonina en las vías de señalización del eje SphK/S1P. Existen evidencias que indican que la vía PI3K/AKT/mTOR desempeña un papel significativo en la regulación de la supervivencia de células malignas en diferentes tipos de cáncer, incluido el CHC. Además, la fosforilación de AKT se ha identificado como un factor de riesgo de recurrencia temprana de la enfermedad y mal pronóstico en el CHC (Samarin y cols., 2016). Cabe destacar que hay estudios que han demostrado que la inhibición de la vía PI3K/AKT, por parte de la melatonina, mejora la respuesta citotóxica a la doxorubicina en células HepG2 (Fan y cols., 2013). El silenciamiento de la SphK1 en células de cáncer de mama disminuye los niveles de fosforilación de PI3K y AKT (Li y cols., 2016), y el inhibidor selectivo de la SphK2, ABC294640, reduce la fosforilación de AKT y la activación del complejo C1 de mTOR en células de cáncer colorrectal (Xun y cols., 2015). Así, los datos del presente estudio indican que la inhibición de las enzimas SphK1 y SphK2, por parte de la melatonina, se acompaña de una menor expresión de PI3K fosforilada, AKT y mTOR.

Además, la administración de melatonina produjo una disminución de la expresión de las subunidades p50 y p65 del NF- $\kappa$ B, junto con una menor fosforilación de STAT3. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B ha sido implicado en la proliferación de células tumorales y la invasión de células de hepatocarcinoma (Wu y cols., 2016). La sobreexpresión de STAT3 contribuye a la progresión del CHC (Won y cols., 2015); sin embargo, el bloqueo de su activación reduce significativamente el crecimiento del CHC en estudios *in vitro* e *in vivo* (Wang y cols., 2011; Carbajo-Pescador y cols.,



---

2013b). Se requiere de la señalización de AKT para la activación del NF- $\kappa$ B en células de melanoma (Campos y cols., 2015). NF- $\kappa$ B, a su vez, puede activar STAT3 a través de la IL-6 (Kim y Yoon, 2016). La regulación recíproca de la actividad de STAT3 en la vía S1P-S1P1 es un circuito de retroalimentación positiva, importante para la activación continua de STAT3 en células cancerosas y para la progresión maligna (Lee y cols., 2010). Además, se sabe que en el cáncer asociado a la colitis, la formación de S1P desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la activación constante de NF- $\kappa$ B y STAT3 en un círculo vicioso de retroalimentación positiva (Liang y cols., 2013), y que la expresión aberrante del gen miR-506 facilita la progresión del cáncer de páncreas y la quimiorresistencia a través de la señalización SphK1/AKT/NF- $\kappa$ B (Li y cols., 2016). También se ha demostrado que el supresor de tumores PRSS8 actúa mediante la inhibición de la vía de señalización SphK1/S1P/STAT3/AKT (Marcolin y cols., 2012).

Las MAPKs juegan un papel fundamental en el control de la supervivencia y proliferación celular, y por lo tanto, su desregulación está implicada en la transformación y progresión maligna de varios tipos de tumores, incluido el cáncer de hígado (Delire y Starkel, 2015). En líneas celulares de cáncer de colon, la actividad de ERK1/2 se eleva con la sobreexpresión de la SphK1, pero es atenuada si la expresión de la SphK1 se suprime (Liu y cols., 2012). También se ha demostrado que la inhibición de la SphK1 atenúa la señalización de ERK1/2 y AKT, y reduce el crecimiento de células de cáncer de mama (Datta y cols., 2014). Por otro lado, la inhibición de la SphK1 se traduce en una fosforilación reducida de p38 en cáncer de ovario (Beach y cols., 2016). Otros estudios también muestran que un compuesto similar a la piperamida natural, NED-135, inhibe significativamente la activación inducida por la S1P de AKT, ERK y p38 en células de cáncer de mama (Kim y cols., 2015). En el presente estudio, la marcada sobreexpresión de ERK1/2 y p38 en ratones tratados con DEN se redujo significativamente por la melatonina, lo que confirma que el indol es capaz de suprimir las diferentes rutas posteriores del eje SphK/S1P.

En resumen, el efecto antiproliferativo de la melatonina parece estar asociado, al menos en parte, a la modulación de los niveles desregulados de S1P y sus

vías de señalización, en un modelo murino de CHC inducido por DEN. Aunque el papel exacto de la vía SphK/S1P en la regulación de la patogénesis del CHC aún no se ha dilucidado completamente, nuestros hallazgos revelan nuevas rutas moleculares que pueden explicar el efecto protector de la melatonina en la carcinogénesis. Los resultados obtenidos apoyan la utilidad de la melatonina como un agente oncostático y el interés del sistema SphK/S1P como diana terapéutica en el CHC.

### **6.3 Efecto de la melatonina sobre la regulación del ritmo circadiano en el modelo animal de CHC inducido por DEN y en células Hep3B**

El mantenimiento de los ritmos circadianos puede ser un punto de control crítico en el desarrollo del cáncer. Además, la desregulación de los genes del reloj circadiano se ha visto implicada en la pérdida de control del ciclo celular y la formación de tumores (Takahashi y cols., 2008; Yu y Weaver, 2011). Por lo tanto, el establecer como dianas farmacológicas a los reguladores circadianos podría ser una estrategia esencial en la lucha contra el cáncer, y la melatonina podría contribuir a ella de manera relevante (Verma y cols., 2014).

Un primer bucle en el circuito de retroalimentación negativa del reloj circadiano engloba a los genes, Clock y su parólogo Npas2, Bmal1, Per1, Per2, Per3, Cry1 y Cry2 (Takahashi y cols., 2008). BMAL1 y CLOCK (o NPAS2) activan la transcripción de Per1-3 y Cry1/2. Por otro lado, las proteínas PER y CRY inhiben el complejo BMAL1/CLOCK (o NPAS2) y, por tanto, su propia transcripción (Landgraf y cols., 2016). Cabe destacar que se ha encontrado asociación entre los ritmos circadianos humanos alterados y los genes del reloj desregulados en células HepG2 de CHC humano (Polo y cols., 2017). En investigaciones recientes, se han observado expresiones disminuidas de CRY y PER en tejido de CHC humano (Li y cols., 2017), unido a una elevada expresión de BMAL1 en pacientes con metástasis hepática diagnosticada (Oshima y cols., 2011). En el presente estudio, la administración de DEN produjo una desregulación de estos genes. Además, comprobamos que la administración de melatonina reprimía significativamente los niveles anormalmente elevados de ARNm y proteína de los

---

factores de transcripción, y aumentaba significativamente la menor expresión de los genes *Per* y *Cry*, de forma similar a lo indicado anteriormente sobre el efecto de la hormona en células de cáncer de próstata humano (Jung-Hynes y cols., 2010). Estos datos confirman en el modelo animal de cáncer hepático, que la resincronización de los ritmos circadianos desregulados podría disminuir el desarrollo y progresión tumorales.

Se sabe que un modulador crucial del reloj circadiano, SIRT1, regula varios genes de los relojes centrales, incluidos *Bmal1*, *Per2* y *Cry1* (Hill y cols., 2009). SIRT1 se une al complejo BMAL1/CLOCK y promueve la desacetilación y degradación de PER2 (Asher y cols., 2008). El aumento de los niveles de ARNm de *Sirt1* en ratones tratados con DEN, junto con los cambios en las expresiones de *Bmal1*, *Clock*, *Npas2* y *Per2*, respaldan la posible contribución de SIRT1 a los mecanismos del reloj en el CHC. La prevención de estos efectos tras el tratamiento con melatonina indica que SIRT1 podría ser un punto focal a través del cual el indol influye en el reloj circadiano.

En términos de fosforilación, CK1 $\epsilon$  es un factor crítico que regula el recambio circadiano de proteína (Xu y cols., 2005). En el presente estudio, CK1 $\epsilon$  disminuyó en ratones tratados con DEN, al igual que *Per* y *Cry*, mientras que los genes *Bmal1*, *Clock* y *Npas2* aumentaron significativamente. Estos datos concuerdan con investigaciones previas que muestran una expresión modificada de CK1 $\epsilon$  en paralelo con el perfil alterado de otros genes del reloj circadiano en cáncer gástrico (Hu y cols., 2014), o carcinoma colorrectal humano (Momma y cols., 2017). El tratamiento con melatonina produjo un aumento en los niveles de ARNm de CK1 $\epsilon$ , lo cual podría contribuir al efecto protector del indol. Así mismo, diferentes estudios han demostrado que una alta expresión de CK1 $\epsilon$  se asocia a un mejor pronóstico en pacientes con cáncer, incluido el CHC (Lin y cols., 2014; Lopez-Guerra y cols., 2015; Lin y cols., 2016).

También investigamos los receptores nucleares REV-ERB $\alpha$  y REV-ERB $\beta$ , los cuales muestran actividad de represión transcripcional dependiente de ligando, y regulan directamente la expresión de BMAL1 (Guillaumond y cols., 2005). Nuestros resultados mostraron cómo la melatonina aumentó la expresión de REV-ERB $\alpha$  y  $\beta$ ,

pero reprimió la expresión de ROR $\alpha$ , un inductor transcripcional de BMAL1 (Hill y cols., 2015). REV-ERB $\alpha$  y  $\beta$ , además de su función circadiana, regulan la proliferación celular. De hecho, hay estudios que demuestran que la activación farmacológica de REV-ERB conduce a una proliferación reducida en células de cáncer de mama (Wang y cols., 2015). Por ello, llevamos a cabo un estudio *in vitro* en el que se analizó el efecto de la melatonina, y del ligando sintético de REV-ERB, SR9009, sobre la proliferación de células Hep3B. El SR9009 se ha desarrollado como un modulador del reloj molecular (Solt y cols., 2012), y se ha demostrado recientemente que es letal específicamente para células cancerosas y células senescentes inducidas por oncogenes (Sulli y cols., 2018). Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el tratamiento con SR9009 disminuye la expresión de oncogenes clave, tales como la Ciclina D1 ó el c-Myc, y la proliferación celular. Además, la coadministración del ligando sintético y la melatonina aumentó los efectos antiproliferativos de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que una terapia combinada puede ser eficaz para potenciar los efectos del agonista de REV-ERB. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la melatonina podría ser un coadyuvante útil en el tratamiento de diferentes tipos de tumores (Prieto-Domínguez y cols., 2017).

Para investigar más a fondo la contribución de los cambios en la expresión de los genes del reloj en los efectos beneficiosos de la melatonina, realizamos un silenciamiento de BMAL1, diana principal de REV-ERB, en células Hep3B. Los resultados obtenidos apoyan el importante papel desempeñado por BMAL1 en la carcinogénesis (Oshima y cols., 2011; Bu y cols., 2018), y muestran que los efectos, proapoptótico y antiproliferativo, de la melatonina se atenúan tras el silenciamiento de BMAL1 en dichas células.

Varios estudios han demostrado que las acciones anticancerígenas de la melatonina en líneas celulares de cáncer de mama y xenoinjertos, involucran mecanismos mediados por receptores, en concreto, mecanismos mediados por el receptor de la melatonina MT1 contribuyendo, así, a las acciones citostáticas y proapoptóticas del indol (Hill y cols., 2015). Además, hay estudios que señalan que la administración de melatonina en las células de cáncer de mama MCF-7, reprime

---

significativamente la transactivación de ROR $\alpha$  y, por consiguiente, reduce la expresión de BMAL1 (Xiang y cols., 2012). En la presente investigación, la disminución temprana de las expresiones de BMAL1 y ROR $\alpha$  inducida por la administración de melatonina, se acompañó de un aumento significativo de MT1, lo que sugiere que en nuestro modelo animal de CHC, el receptor MT1 también puede estar involucrado en la modulación del reloj circadiano.

El microambiente hipóxico, una característica común en el cáncer, puede activar HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ , y la sobreexpresión de estos factores de transcripción contribuye a la alteración de los niveles de ARNm de los genes circadianos en células de CHC (Yu y cols., 2015). Estudios recientes también sugieren que PER2 puede funcionar como una molécula efectora para el reclutamiento de HIF-1 a las regiones promotoras de los genes que lo regulan (Kobayashi y cols., 2017). Nuestros resultados mostraron que la melatonina, además de aumentar los niveles de ARNm de Per1 y 2, reduce los niveles sobreexpresados de Hif-1 $\alpha$  y Hif-2 $\alpha$  en los grupos de ratones tratados con DEN, lo cual apoya aún más la relación del indol con el reloj circadiano, y sus efectos protectores sobre la hipoxia y el cáncer.

Posteriormente, la investigación tuvo entre sus objetivos identificar si la modulación de los relojes circadianos desregulados podría contribuir en los efectos beneficiosos de la melatonina sobre el ciclo celular, la proliferación, la apoptosis, la autofagia, o la respuesta de la UPR, en el modelo animal de CHC inducido por DEN.

### **6.3.1 Efecto de la melatonina sobre el ciclo celular y la apoptosis, y su relación con el ritmo circadiano**

Muchos genes implicados en el ciclo celular y la supervivencia están bajo el control de los relojes circadianos. Se ha demostrado que el heterodímero CLOCK/BMAL1 regula los genes del ciclo celular que están implicados en la progresión del cáncer de mama (Haus y Smolensky, 2013). El silenciamiento de NPAS2 reprime significativamente la expresión de varios genes del ciclo celular y la reparación del ADN en cáncer de mama y células de linfoma (Hoffman y cols., 2008). PER1 influye en numerosos genes que controlan el ciclo celular, que incluyen Ciclina D1, Ciclina E,

CDK4, CDK6, p21 y p53, jugando así un papel importante en la aparición y progresión de diferentes tipos de tumores (Zhao y cols., 2016). PER2 actúa como un gen supresor tumoral a través del paro del ciclo celular y la inducción de apoptosis en células de carcinoma EMT64 ó LLC, o en células de leucemia K562 (Sun y cols., 2010). Además, se ha demostrado que una mutación en el gen Per2 desregula la proliferación celular en modelos murinos de DEN (Mteyrek y cols., 2016). En el presente estudio observamos cómo la melatonina fue capaz de modular la expresión desregulada de Ciclina D1, Ciclina E, CDK4, CDK6, p21 y p53 inducida por la administración del hepatotóxico DEN. Además, la respuesta apoptótica, evaluada mediante la expresión proteica de PARP1/2 y la relación Bax/Bcl2, que disminuyó tras la administración de DEN, se previno de manera significativa con el tratamiento de melatonina. Por lo tanto, el efecto antiproliferativo y proapoptótico de la melatonina, en el CHC inducido por DEN, podría contribuir a reducir la progresión tumoral, y este efecto podría estar mediado, al menos en parte, por la modulación de los relojes circadianos.

### **6.3.2 Efecto de la melatonina sobre la autofagia y su relación con el ritmo circadiano**

Cada vez hay más pruebas que demuestran que la autofagia se activa en diferentes tipos de tumores, entre los que se incluye el CHC (White, 2012). Nuestros datos respaldan la idea de que el CHC inducido por DEN desencadena la autofagia en los últimos periodos del experimento. El estudio realizado en tejido hepático mediante MET reveló un incremento significativo de vacuolas autofágicas degradativas en ratones tratados con DEN, en las últimas semanas del estudio. Además, se realizaron análisis adicionales que se centraron en el impacto de la administración de DEN sobre distintas proteínas que regulan la formación de vesículas de autofagia, su inducción (Atg13), nucleación (Beclina-1), y elongación (LC3). También se evaluó la expresión de p62/SQTM1 y LAMP-2, moléculas cuyos cambios conducen a la activación de la ruta autofágica-lisosómica, y al aumento en el flujo autofágico. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de los marcadores de autofagia, en los ratones tratados con DEN en las últimas etapas del estudio. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios que revocan

la idea de que la autofagia pueda ser necesaria para el desarrollo de cánceres agresivos (Guo y cols., 2011). Los niveles de autofagia disminuyeron después de la administración de la melatonina en los períodos finales del estudio, en comparación con los grupos de animales que recibieron DEN. Sin embargo, en las primeras semanas del experimento la autofagia fue inducida por la melatonina, dado que se detectó un incremento en la expresión de LC3-II. Esto podría apoyar la teoría de que la autofagia podría actuar como un mecanismo supresor tumoral en las primeras etapas del cáncer, pero, sin embargo, favorecer la progresión del tumor en los últimos períodos. Por lo tanto, la melatonina podría ser un regulador prometedor del flujo autofágico.

Una de las principales proteínas que regulan la autofagia es mTOR. Cuando la expresión de la forma fosforilada de mTOR se analizó mediante Western blot, observamos un aumento en dicha expresión en los grupos tratados con DEN, demostrando, así, que el hepatotóxico estimula la vía de mTOR en paralelo al flujo autofágico, y sugiriendo que mTOR regula de manera positiva la autofagia en el CHC inducido por DEN. El tratamiento con melatonina reguló la inducción de autofagia disminuyendo los niveles anormalmente incrementados de los marcadores de autofagia, así como de fosfo-mTOR. Además, la regulación coordinada de la autofagia y de la apoptosis es esencial para que las células mueran o sobrevivan cuando están sometidas a estrés (Motilva y cols., 2011). El papel de la apoptosis en la inhibición del proceso de autofagia (Wang y cols., 2013), junto con el mecanismo inicial de la autofagia que promueve la supervivencia en células cancerosas (Wu y cols., 2012b), nos permite hipotetizar que la modulación por parte de la melatonina, de ambas vías, podría reducir la supervivencia tumoral. Nuestros resultados mostraron que la melatonina aumentaba la respuesta apoptótica (p53, PARP-1 y Bax/Bcl-2) tras la administración de DEN. La administración de la hormona también logró una reducción en la expresión de los marcadores de autofagia confirmando, así, nuestra hipótesis.

Existen evidencias del papel de los relojes circadianos en la regulación de la autofagia. Se ha demostrado que la regulación circadiana actúa directamente a través

de REV-ERB $\alpha$  en hígado de pez cebra (Huang y cols., 2016). Nuestros experimentos indican que la modulación de la autofagia, así como las vías que regulan su inducción, podría producirse a través de la regulación de los relojes circadianos, por parte de la melatonina.

### **6.3.3 Efecto de la melatonina sobre el estrés del RE y su relación con el ritmo circadiano**

La UPR es una vía de señalización activada por estrés que modifica la proliferación celular y la supervivencia (Crespo y cols., 2012), y desempeña un papel importante en el desarrollo del CHC (Wu y cols., 2015; Yang y cols., 2015). Durante el estrés de RE, diferentes factores de transcripción regulan la expresión de chaperonas de ER que, a menudo, se sobreexpresan en tejidos tumorales (Booth y cols., 2016). Diferentes estudios han demostrado que la UPR está regulada por el reloj circadiano (Maillo y cols., 2017; Moore y Oakes, 2017). Así, en el linfoma de Burkitt, la represión de BMAL1 es esencial para la inhibición de la síntesis proteica dependiente de la UPR (Bu y cols., 2018). Otros estudios han evidenciado que una baja expresión de PER1 y una respuesta elevada de la UPR, se asocia a un peor pronóstico en pacientes con glioblastoma (Pluquet y cols., 2013). En el presente estudio, la melatonina redujo la expresión anormalmente elevada de las chaperonas HSP70, HSP90 y GRP78, a partir de las 20 semanas de la administración de DEN. BMAL1 y CLOCK disminuyeron desde el inicio del estudio en los grupos que fueron tratados con melatonina. Nuestros resultados refuerzan la idea de que el control de la interacción entre la señalización de la UPR y el reloj circadiano podría ser una estrategia adecuada para frenar la progresión del cáncer (Pluquet y cols., 2014).

En resumen, los resultados de los experimentos aquí descritos sugieren que la regulación de los relojes circadianos, mediante la administración de melatonina, podría contribuir a la modulación de la progresión del CHC inducido por DEN. Esto respalda los efectos oncostáticos de la melatonina en el CHC, y resalta la utilidad de estrategias combinadas que modulen la maquinaria circadiana alterada en el cáncer.



## ***7 CONCLUSIONES***

---



### ***Primera conclusión***

La administración crónica de dietilnitrosamina en ratones induce daño hepático y conduce al desarrollo de carcinoma hepatocelular como se pone de manifiesto por las alteraciones que se producen en la expresión de los principales mediadores y vías de señalización implicadas en el proceso de hepatocarcinogénesis. Por ello, junto con los estudios realizados en la línea celular de hepatocarcinoma humano Hep3B, pueden ser modelos experimentales muy adecuados para dilucidar y explicar los potenciales efectos anticancerígenos de la melatonina.

### ***Segunda conclusión***

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el efecto protector de la melatonina en el modelo animal de carcinoma hepatocelular se asocia a su capacidad para modular diferentes vías de señalización implicadas en el daño y la progresión tumoral, tales como la proliferación, la diferenciación o la angiogénesis. Además, la melatonina juega un papel beneficioso en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta autofágica y el estrés de retículo endoplasmático, mecanismos alterados por la administración del carcinógeno.

### ***Tercera conclusión***

Los efectos de la melatonina se asocian, de manera dependiente del tiempo y de la dosis, con una regulación del eje de la esfingosina quinasa/esfingosina 1-fosfato, así como de otras vías de señalización relacionadas, tales como la vía de la PI3K/AKT/mTOR y la vía de las proteínas quineras activadas por mitógenos. Estos resultados apoyan la utilidad de la melatonina como agente protector frente al daño hepático inducido por dietilnitrosamina en el modelo animal, y el interés del sistema SphK/S1P como diana terapéutica en el cáncer.

### ***Cuarta conclusión***

La melatonina regula la alteración de los genes reloj implicados en el control de los ritmos circadianos, tanto en el modelo animal de carcinoma hepatocelular inducido por dietilnitrosamina, como en células de la línea Hep3B; lo que podría contribuir a los efectos beneficiosos del indol sobre el ciclo celular, la proliferación, la apoptosis, la autofagia, o la respuesta a proteínas mal plegadas, aminorando de este modo el desarrollo y la progresión del carcinoma hepatocelular. El conocimiento de los efectos de la melatonina sobre la regulación de los ritmos circadianos podría constituir un elemento esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

### ***Conclusión final***

Los efectos de la melatonina sobre las diferentes vías de señalización implicadas en la hepatocarcinogénesis, en el modelo animal de carcinoma hepatocelular inducido por el hepatotóxico dietilnitrosamina, así como en el modelo *in vitro* en células de hepatocarcinoma humano de la línea Hep3B, demuestran el potencial interés de esta molécula, al menos como adyuvante, en la terapia del carcinoma hepatocelular. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar la utilidad de esta molécula en la prevención y el tratamiento de pacientes con cáncer.

## ***8 BIBLIOGRAFÍA***

---



---

Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem* 2012; 3:1-6.

Adada MM, Canals D, Jeong N, Kelkar AD, Hernandez-Corbacho M, Pulkoski-Gross MJ, *et al.* Intracellular sphingosine kinase 2-derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion. *FASEB J* 2015; 29:4654-4669.

Ader I, Gstalder C, Bouquerel P, Golzio M, Andrieu G, Zalvidea S, *et al.* Neutralizing S1P inhibits intratumoral hypoxia, induces vascular remodelling and sensitizes to chemotherapy in prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6:13803-13821.

Ahmed D, De Verdier PJ, Ryk C, Lunqe O, Stål P, Flygare J. FTY720 (Fingolimod) sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-mediated cytotoxicity. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3:e00171.

Aldeghi R, Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Tancini G, Piperno A, *et al.* Low-dose interleukin-2 subcutaneous immunotherapy in association with the pineal hormone melatonin as a first-line therapy in locally advanced or metastatic hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 1994; 30A:167-170.

Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:55-62.

Al-Harbi NO, Imam F, Nadeem A, Al-Harbi MM, Iqbal M, Ahmad SF. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. *Int Immunopharmacol* 2014; 21:383-388.

Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010; 465:1084-1088.

Ambriz-Tututi M, Rocha-Gonzalez HI, Cruz SL, Granados-Soto V. Melatonin: a hormone that modulates pain. *Life Sci* 2009; 84:489-498.

Aravalli RN, Cressman ENK, Steer CJ. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Arch Toxicol* 2013; 87:227-247.

Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, *et al.* Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. *J Biol Chem* 2003; 278:32841-32851.

Arish M, Alaidarous M, Ali R, Akhter Y, Rub A. Implication of sphingosine-1-phosphate signaling in diseases: molecular mechanism and therapeutic strategies. *J Recept Signal Transduct Res* 2017; 37:437-446.

Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1751-1758.

Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, *et al.* SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 2008; 134:317-328.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:255-60.

Attwa MH, El-Etreby SA. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015; 7:1632-1651.

B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, *et al.* The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:7683-7699.

Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, *et al.* Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* 2001; 20:147-155.

Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19:4621-4631.

Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer. *Mol Oncol* 2013; 7:206-223.

Balamurugan K, Karthikeyan J. Evaluation of Luteolin in the Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced Hepatocellular Carcinoma Using Animal Model System. *Indian J Clin Biochem* 2012; 27:157-163.

Bangoura G, Liu ZS, Qian Q, Jiang CQ, Yang GF, Jing S. Prognostic significance of HIF-2 $\alpha$ /EPAS1 expression in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13:3176-82.

Barone C, Koeberle D, Metselaar H, Parisi G, Sansonno D, Spinzi G. Multidisciplinary approach for HCC patients: hepatology for the oncologists. *Ann Oncol* 2013; 24:15-23.

Beach JA, Aspuria PJ, Cheon DJ, Lawrenson K, Agadjanian H, Walsh CS, *et al.* Sphingosine kinase 1 is required for TGF- $\beta$  mediated fibroblast-to-myofibroblast differentiation in ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 26:4167-4182.

Bejarano E, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 2010; 7:29-39.

Bellissimo F, Pinzone MR, Cacopardo B, Nunnari G. Diagnostic and therapeutic management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2015; 21:12003-12021.



---

Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouysségur J, *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009; 29:2570-2581.

Bennukul K, Numkliang S, Leardkamolkarn V. Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. *Worl J Hepatol* 2014; 6:230-242.

Benson AB, D'Angelica MI, Abbott DE, Abrams TA, Alberts SR, Saenz DA, *et al.* Hepatobiliary Cancers, Version 1.2017: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15:563-573.

Bertino G, Demma S, Ardiri A, Proiti M, Gruttadauria S, Toro A, *et al.* Hepatocellular carcinoma: novel molecular targets in carcinogenesis for future therapies. *Biomed Res Int* 2014; 2014:203693.

Bertuccio P, Bosetti C, Levi F, Decarli A, Negri E, La Vecchia C. A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe. *Ann Oncol* 2013; 24:1667-1674.

Bieler J, Cannavo R, Gustafson K, Gobet C, Gatfield D, Naef F. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. *Mol Syst Biol* 2014; 10:739.

Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, *et al.* The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res* 2007; 67:10428-10435.

Bigaud M, Guerini D, Billich A, Bassilana F, Brinkmann V. Second generation S1P pathway modulators: research strategies and clinical developments. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841:745-758.

Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebt SM. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 2003; 63:1270-1279.

Booth L, Roberts JL, Tavallai M, Webb T, Leon D, Chen J, *et al.* The afatinib resistance of in vivo generated H1975 lung cancer cell clones is mediated by SRC/ERBB3/c-KIT/c-MET compensatory survival signaling. *Oncotarget* 2016; 7:19620-19630.

Boyd NM, Reade PC. Differences between preneoplastic cells, neoplastic cells and their normal counterparts. *J Oral Pathol* 1988; 17:257-265.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

Brantley EC, Nabors LB, Gillespie GY, Choi YH, Palmer CA, Harrison K, *et al.* Loss of protein inhibitors of activated STAT-3 expression in glioblastoma multiforme tumors: implications for STAT-3 activation and gene expression. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4694-4704.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. [Epub ahead of print]. doi: 10.3322/caac.21492.

Bremer E, Helfrich W. Targetting the messengers of death: the advent of selective activation of apoptosis for cancer therapy. *Discov Med* 2006; 6:113-117.

Brizuela L, Ader I, Mazerolles C, Bocquet M, Malavaud B, Cuvillier O. First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: Implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2012; 11:1841-1851.

Brunati AM, Tibaldi E, Carraro A, Gringeri E, D'Amico F, Jr. Toninello A, *et al.* Cross-talk between PDGF and S1P signalling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulatory FTY720 in activated HSC-cultures. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783:347-359.

Bu Y, Yoshida A, Chitnis N, Altman BJ, Tameire F, Oran A, *et al.* A PERK-miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival. *Nat Cell Biol* 2018; 20:104-115.

Calvo JR, González-Yanes C, Maldonado MD. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review. *J Pineal Res* 2013; 55:103-120.

Campos LS, Rodriguez YI, Leopoldino AM, *et al.* Filamin A expression negatively regulates sphingosine-1-phosphate-induced NF- $\kappa$ B activation in melanoma cells by inhibition of Akt signaling. *Mol Cell Biol* 2015; 36:320-329.

Carbajo-Pescador S, García-Palomo A, Martín-Renedo J, Piva M, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *J Pineal Res* 2011; 51:463-471.

Carbajo-Pescador S, Martín-Renedo J, García-Palomo A, Tuñón MJ, Mauriz JL, González-Gallego J. Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *J Pineal Res* 2009; 47:330-338.

Carbajo-Pescador S, Ordoñez R, Benet M, Jover R, García-Palomo A, Mauriz JL, *et al.* Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *Br J Cancer* 2013a; 109:83-91.

---

Carbajo-Pescador S, Steinmetz C, Kashyap A, Lorenz S, Mauriz JL, Heise M, *et al.* Melatonin induces transcriptional regulation of Bim by FoxO3a in HepG2 cells. *Br J Cancer* 2013b; 108:442-449.

Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10:417-427.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27:189-200.

Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15:608-624.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14:249-257.

Che Y, Ye F, Xu R, Qing H, Wang X, Yin F, *et al.* Co-Expression of XIAP and Cyclin D1 Complex Correlates with a Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol* 2012; 180:1798-1807.

Chen J, Wang W, Qi Y, Kaczorowski D, McCaughan GW, Gamble JR, *et al.* Deletion of sphingosine kinase 1 ameliorates hepatic steatosis in diet-induced obese mice: role of PPAR $\gamma$ . *Biochim Biophys Acta* 2016; 1861:138-147.

Chin R, Earnest-Silveira L, Koeberlein B, Franz S, Zentgraf H, Dong X, *et al.* Modulation of MAPK pathways and cell cycle by replicating hepatitis B virus: factors contributing to hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2007; 47:325-337.

Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$ . *Nature* 2012; 485:123-127.

Chou R, Cuevas C, Fu R, Devine B, Wasson N, Ginsburg A, *et al.* Imaging Techniques for the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Ann Intern Med* 2015; 162:697.

Chua CC, Liu X, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Multiple actions of pifithrin- $\alpha$  on doxorubicin-induced apoptosis in rat myoblastic H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:2606-2613.

Clairambault J. Circadian rhythm and cell population growth. *Mathematical and Computer Modelling* 2010; 53:1558-1567.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:1075-1083.

Crespo I, San-Miguel B, Fernández A, Ortiz de Urbina J, González-Gallego J, Tuñón MJ. Melatonin limits the expression of profibrogenic genes and ameliorates the

progression of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Translat Res* 2015; 166:346-357.

Crespo I, San-Miguel B, Mauriz JL, Ortiz de Urbina JJ, Almar M, Tuñón MJ, *et al.* Protective effect of protocatechuic acid on TNBS-induced colitis in mice is associated with modulation of the SphK/S1P signaling pathway. *Nutrients* 2017; 9:e288.

Crespo I, San Miguel B, Prause C, Marroni N, Cuevas MJ, González-Gallego J, *et al.* Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS induced colitis. *PLoS ONE* 2012; 7:e50407.

Crespo I, San-Miguel B, Sánchez DI, González-Fernández B, Álvarez M, González-Gallego J, *et al.* Melatonin inhibits the sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2016; 61:168-176.

Cruz A, Padilla FJ, Torres E, Navarrete CM, Muñoz-Castañeda JR, Caballero FJ, *et al.* Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005; 39:143-150.

Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:1358-1375.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21:142-150.

Cui D, Xiong X, Zhao Y. Cullin-RING ligases in regulation of autophagy. *Cell Division* 2016; 11:8.

Cui J, Gong Z, Shen HM. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1836:15-26.

Czaja MJ, Ding W-X, Donohue TM, Friedman SL, Kim J-S, Komatsu M, *et al.* Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy* 2013; 9:1131-1158.

Czarny P, Pawlowska E, Bialkowska-Warzecha J, Kaarniranta K, Blasiak J. Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci* 2015; 23;16:2641-2662.

Dai CX, Gao Q, Qiu SJ, Ju MJ, Cai MY, Xu YF, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with inflammation, angiogenesis and MYC, is a critical prognostic factor in patients with HCC after surgery. *BMC Cancer* 2009; 9:418.

Dai Y, Hu S. Recent insights into the role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2016; 55:403-410.

Datta A, Loo SY, Huang B, Wong L, Tan SS, Tan TZ, *et al.* SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2014; 5:5920-5933.

---

Davaille J, Li L, Mallat A, Lotersztajn S. Sphingosine 1-phosphate triggers both apoptotic and survival signals for human hepatic myofibroblasts. *J Biol Chem* 2002; 277:37323-37330

De Lope CR, Tremosini S, Forner A, Reig M, Bruix J. Management of HCC. *J Hepatol* 2012; 56:75-87.

De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, Baroni GS, Benedetti A, Brenner D *et al.* Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2013; 45:450-459.

Degagné E, Pandurangan A, Bandhuvula P, Kumar A, Eltanawy A, Zhang M, *et al.* Sphingosine-1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs. *J Clin Invest* 2014; 124:5368-5384.

Delgado A, Martinez-Castro M. Therapeutic Potential of the Modulation of Sphingosine-1-Phosphate Receptors. *Curr Med Chem* 2016; 23:242-264.

Delire B, Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015; 45:609-623.

Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG, Freeman MR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease spread and epithelial Akt activation. *Cell Cycle* 2009; 8:2420-2424.

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanchez-Sanchez JJ, Kaski JC, Reiter RJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. *J Pineal Res* 2010; 49:14-22.

Donati C, Cencetti F, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate axis: a new leader actor in skeletal muscle biology. *Front Physiol* 2013; 4:338.

Dragani TA. Risk of HCC: Genetic heterogeneity and complex genetics. *J Hepatol* 2010; 52:252-257.

Dubocovich ML, Delagrangé P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 2010; 62:343-380.

Duseja A. Staging of hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* 2014; 4:S74-9.

Dutta R, Mahato RI. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy. *Pharmacol Ther* 2017; 173:106-117.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:97-132.

Edmonds Y, Milstien S, Spiegel S. Development of small-molecule inhibitors of sphingosine-1-phosphate signaling. *Pharmacol Ther* 2011; 132:352-360.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60:97-108.

El-Athman R, Genov NN, Mazuch J, Zhang K, Yu Y, Fuhr L, *et al.* The Ink4a/Arf locus operates as a regulator of the circadian clock modulating RAS activity. *PLOS Biology* 2017; 15:e2002940.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.

El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011; 365:1118-1127.

El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142:1264-1273.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557-2576.

Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla M, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A review of melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian J Med* 2016; 48:135-141.

Eskelinen EL. The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11:294-300.

Evangelisti C, Evangelisti C, Buontempo F, Lonetti A, Orsini E, Chiarini F, *et al.* Therapeutic potential of targeting sphingosine kinases and sphingosine 1-phosphate in hematological malignancies. *Leukemia* 2016; 30:2142-2151.

Fan L, Sun G, Ma T, Zhong F, Lei Y, Li X, *et al.* Melatonin reverses tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma cells and improves cytotoxic response to doxorubicin by increasing CHOP and decreasing survivin. *J Pineal Res* 2013; 55:184-194.

Faria SC, Szklaruk J, Kaseb AO, Hassabo HM, Elsayes KM. TNM/Okuda/Barcelona/UNOS/CLIP International Multidisciplinary Classification of Hepatocellular Carcinoma: concepts, perspectives, and radiologic implications. *Abdom Imaging* 2014; 39:1070-1087.

Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* 2005; 118:5675-5678.

Fayyaz SL, Kleuser B. Divergent role of sphingosine 1-phosphate on insulin resistance. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:134-147.

---

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136:e359-e386.

Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol* 2013; 23:620-633.

Fernández A, Ordóñez R, Reiter RJ, González-Gallego J, Mauriz JL. Melatonin and endoplasmic reticulum stress: relation to autophagy and apoptosis. *J Pineal Res* 2015; 59:292-307.

Fernig DG, Gallagher JT. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5:353-377.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18:4-25.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-416.

Folkman J. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:94-95.

Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379:1245-1255.

Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2018; 391:1301-1314.

Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3:350-361.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:1096-1103.

Gao Y, Gao F, Chen K, Tian ML, Zhao DL. Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:3239-3245.

Garbuz, DG. Regulation of heat shock gene expression in response to stress. *Molecular Biology* 2017; 51:352-367.

Ghielmini M, Pagani O, de Jong J, Pampallona S, Conti A, Maestroni G, *et al.* Double-blind randomized study on the myeloprotective effect of melatonin in combination with carboplatin and etoposide in advanced lung cancer. *Br J Cancer* 1999; 80:1058-1061.

Ghoury YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis* 2017; 16:1.

Gish RG, Lencioni R, Di Bisceglie AM, Raoul JL, Mazzaferro V. Role of the multidisciplinary team in the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6:173-185.

Glenister R, McDaniel K, Francis H, Venter J, Jensen K, Dusio G, *et al.* Therapeutic actions of melatonin on gastrointestinal cancer development and progression. *Transl Gastrointest Cancer* 2013; 2.

Goldbeter A, Gérard C. Entrainment of the mammalian cell cycle by the circadian clock: modeling two coupled cellular rhythms. *PLoS Computational Biology* 2012; 8:e1002516.

Gomes LC, Dikic I. Autophagy in Antimicrobial Immunity. *Mol Cell* 2014; 54:224-233.

González-Fernández B, Sánchez DI, Crespo I, San-Miguel B, Álvarez M, Tuñón MJ, *et al.* Inhibition of the SphK1/S1P signaling pathway by melatonin in mice with liver fibrosis and human hepatic stellate cells. *Biofactors* 2017; 43:272-282.

Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* 2012; 134:306-316.

Gräler MH. Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. *Cell Physiol Biochem* 2010; 26: 79-86.

Gréchez-Cassiau A, Rayet B, Guillaumond F, Teboul M, Delaunay F. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *J Biol Chem* 2008; 283:4535-4542.

Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7:a006080.

Greenhalgh DG. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:1019-1030.

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446:153-158.

Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 2000; 20:7282-7291.

Gu J, Zhuang L, Huang GC. Melatonin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced activation of rat hepatic stellate cells. *J Pineal Res* 2006; 41:275-278.

Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002; 2:167-179.

Guerrero-Vargas NN, Navarro-Espíndola R, Guzmán-Ruíz MA, Basualdo MDC, Espitia-Bautista E, López-Bago A, *et al.* Circadian disruption promotes tumor growth by



---

anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer* 2017; 17:625

Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009; 2:pe24.

Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005; 54:1024-1033.

Guillaumond F, Dardente H, Giguère V. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 2005; 20:391-403.

Gumucio JJ, Miller DL. Functional implications of liver cell heterogeneity. *Gastroenterology* 1981; 80:393-403.

Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, *et al.* Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25:460-470.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS. NFkappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; 19:5785-5799.

Guy J, Kelley RK, Roberts J, Kerlan R, Yao F, Terrault N. Multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10:354-362.

Haddad BR, Gu L, Mirtti T, Dagvadorj A, Vogiatzi P, Hoang DT, *et al.* STAT5A/B gene locus undergoes amplification during human prostate cancer progression. *Am J Pathol* 2013; 182:2264-2275.

Hadem KLH, Sharan RN, Kma L. Inhibitory potential of methanolic extracts of *Aristolochia tagala* and *Curcuma caesia* on hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in BALB/c mice. *J Carcinog* 2014; 13:7.

Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, *et al.* Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 2009; 325:1254-1257.

Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:2016-2026.

Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009; 35:183-192.

Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: Occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:2001-2018.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-357.

Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A Clockwork Web : Circadian Timing in Brain and Periphery, in Health and Disease. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:649-661.

Hatoum D, Haddadi N, Lin Y, Nassif NT, McGowan EM. Mammalian sphingosine kinase (SphK) isoenzymes and isoform expression: challenges for SphK as an oncotarget. *Oncotarget* 2017; 8:36898-36929.

Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis-the p53 network. *J Cell Sci* 2003; 116:4077-4085.

Haus EL, Smolensky MH. Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev* 2013; 17:273-284.

He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, *et al.* SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:14133-14138.

Heindryckx F, Gerwins P. Targeting the tumor stroma in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015; 7:165-176.

Heo K, Park KA, Kim YH, Kim SH, Oh YS, Kim IH, *et al.* Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *BMB Rep* 2009; 42:685-690.

Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2013; 144:512-527.

Heynen MJ, Tricot G, Verwilghen RL. Autophagy of mitochondria in rat bone marrow erythroid cells. Relation tonuclear extrusion. *Cell Tissue Res* 1985; 239:235-239.

Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, *et al.* Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 2011; 54:240-251.

Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L, *et al.* Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22:183-204.

Hill SM, Fracsh T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. *Integr Cancer Ther* 2009; 8:337-346.

---

Hirata N, Yamada S, Shoda T, Kurihara M, Sekino Y, Kanda Y. Sphingosine-1-phosphate promotes expansion of cancer stem cells via S1PR3 by a ligand-independent Notch activation. *Nat Commun* 2014; 5:4806.

Hoffman AE, Zheng T, Ba Y, Zhu Y. The circadian gene NPAS2, a putative tumor suppressor, is involved in DNA damage response. *Mol Cancer Res* 2008; 6:1461-1468.

Hong RH, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15:1452-1458.

Hong SS, Kim TK, Sung K-B, Kim PN, Ha HK, Kim AY, et al. Extrahepatic spread of hepatocellular carcinoma: a pictorial review. *Eur Radiol* 2003; 13:874-882.

Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 2007; 26:1306-1316.

Hsia C-Y, Huo T-I, Chiang S-Y, Lu M-F, Sun C-L, Wu J-C, et al. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33:208-212.

Hu ML, Yeh KT, Lin PM, Hsu CM, Hsiao HH, Liu YC, et al. Deregulated expression of circadian clock genes in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2014; 14:67.

Hu W, Fu J, Lu S-X, Liu L-L, Luo R-Z, Yun J-P, et al. Decrease of Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter in hepatocellular carcinoma indicates poor prognosis. *Am J Cancer Res* 2015; 5:1805-1813.

Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, et al. Circadian gene mPer2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer Sci* 2006; 97:589-596.

Huang G, Zhang F, Ye Q, Wang H. The circadian clock regulates autophagy directly through the nuclear hormone receptor Nr1d1/Rev-erba and indirectly via Cebpb/(C/ebpb) in zebrafish. *Autophagy* 2016; 12:1292-1309.

Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell* 2010; 1:218-226.

Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114:569-581.

IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Painting, firefighting, and shiftwork. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2010; 98:9-764.

Imamoto R, Okano J-I, Sawada S, Fujise Y, Abe R, Murawaki Y. Null anticarcinogenic effect of silymarin on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Ther Med* 2014; 7:31-38.

Imbesi M, Uz T, Dzitoyeva S, Giusti P, Manev H. Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Res* 2008; 1227:19-25.

Innominato PF, Lévi FA, Bjarnason GA. Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62:979-1001.

Innominato PF, Roche VP, Palesh OG, Ulusakarya A, Spiegel D, Lévi FA. The circadian timing system in clinical oncology. *Ann Med* 2014; 46:191-207.

Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Hamasaki K, Nakata K, *et al.* Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene. *Hepatology* 2003; 37:696-704.

Jager S. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* 2004; 117:4837-4848.

Janssens S, Pulendran B, Lambrecht BN. Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat Immunol* 2014; 15:910-919.

Jaryal AK. The Nobel Prize in physiology or medicine for the year 2002. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47:236-237.

Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, *et al.* Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol. Cell Biochem* 2012; 360:51-60.

Jiménez-Jorge S, Jiménez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, *et al.* Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res* 2005; 39:77-83.

Jouffe C, Cretenet G, Symul L, Martin E, Atger F, Naef F, *et al.* The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biology*. 2013; 11:e1001455.

Jung-Hynes B, Huang W, Reiter RJ. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *J Pineal Res* 2010; 49:60-68.

Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010; 466:869-873.

Kang T-H, Sancar A. Circadian regulation of DNA excision repair: implications for chrono-chemotherapy. *Cell Cycle* 2009; 8:1665-1667.

Karakus E, Karadeniz A, Simsek N, Can I, Kara A, Yildirim S, *et al.* Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl4). *J Hazard Mater* 2011; 195:208-213.

---

Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 5:19-39.

Kee TH, Vit P, Melendez AJ. Sphingosine kinase signalling in immune cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32:153-161.

Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett* 2014; 342:9-18.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.

Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 2010; 661:3-38.

Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, *et al.* Circadian homeostasis of liver metabolism suppresses hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* 2016; 33:909-924.

Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol* 2016; 26:6-16.

Kim BK, Kim SU, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Park MS, *et al.* Applicability of BCLC stage for prognostic stratification in comparison with other staging systems: single centre experience from long-term clinical outcomes of 1717 treatment-naïve patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012; 32:1120-1127.

Kim BK, Kim SU, Park JY, Kim DY, Ahn SH, Park MS, *et al.* Circadian disruption and breast cancer: an epigenetic link? *Oncotarget* 2015; 6:16866-16882.

Kim ES, Cho H, Lim C, Lee JY, Lee DI, Kim S, *et al.* A natural piper-amide-like compound NED-135 exhibits a potent inhibitory effect on the invasive breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2015; 237:58-65.

Kim SH, Lee SM. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008; 44:165-171.

Kim SJ, Yoon S. Activated Rac1 regulates the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and the nuclear translocation of STAT3–NF $\kappa$ B complexes in starved cancer cells. *Exp Mol Med* 2016; 48:e231.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, *et al.* The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:307-357.

Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, Goto Y, Hiraoka M, Harada H. A circadian clock gene, PER2, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 $\alpha$  to promoter regions of its downstream genes. *FEBS J* 2017; 284:3804-3816.

Kochan DZ, Kovalchuk O. Circadian disruption and breast cancer: an epigenetic link? *Oncotarget* 2015; 6:16866-16882.

Kohno M, Momoi M, Oo ML, Paik JH, Lee YM, Venkataraman K, *et al.* Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol* 2006; 26:7211-7223.

Kondo T, Ishiura M. The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays* 2000; 22:10-15.

Kondo Y, Kimura O, Shimosegawa T. Significant biomarkers for the management of hepatocellular carcinoma. *Clin J Gastroenterol* 2015 Jun; 8:109-15.

Kondratov RV, Antoch MP. Circadian proteins in the regulation of cell cycle and genotoxic stress responses. *Cell Biology* 2007; 17:311-317.

Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, van Adrichem AJ, Kuusanmäki H, Andersson EI, *et al.* Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1905-1913.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, *et al.* ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 2007; 14:230-239.

Kubatka P, Zubor P, Busselberg D, Kwon TK, Adamek M, Petrovic D, *et al.* Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 122:133-143.

Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A. Melatonin prevents cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats. *Med Princ Pract* 2009; 18:407-410.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685

Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. NPAS2 compensates for loss of CLOCK in peripheral circadian oscillators. *PLoS Genet* 2016; 12:e1005882.

Lazova R, Camp RL, Klump V, Siddiqui SF, Amaravadi RK, Pawelek JM. Punctate LC3B Expression Is a Common Feature of Solid Tumors and Associated with Proliferation, Metastasis, and Poor Outcome. *Clin Cancer Res* 2012; 18:370-379.

Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J* 1996; 10:1578-1588.

---

Lee H, Deng J, Kujawski M, Yang C, Liu Y, Herrmann A, *et al.* STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nat Med* 2010; 16:1421-1428.

Lee HC, Tian B, Sedivy JM, Wands JR, Kim M. Loss of Raf kinase inhibitor protein promotes cell proliferation and migration of human hepatoma cells. *Gastroenterology* 2006; 131:1208-1217.

Lee SH, Shin MS, Lee HS, Bae JH, Lee HK, Kim HS, *et al.* Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 250-256.

Lee TK, Man K, Ho JW, Sun CK, Ng KT, Wang XH, *et al.* FTY720 induces apoptosis of human hepatoma cell lines through PI3-K-mediated Akt dephosphorylation. *Carcinogenesis* 2004; 25:2397-23405.

Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res* 2010; 49:248-255.

Leonardi GC, Candido S, Cervello M, Nicolosi D, Raiti F, Travali S, *et al.* The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review). *Int J Oncol* 2012; 40, 1733-1747.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that tightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80:2587-2592.

Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, *et al.* Xbp1s-negative tumor B cells and preplasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2013; 24:289-304.

Lévi F, Filipski E, Iurisci I, Li X, Innominato P. Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007a; 72:465-475.

Lévi F, Focan C, Karaboué A, De la Valette V, Focan-Henrard D, Baron B, *et al.* Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2007b; 59:1015-1035.

Lewy AJ, Wehr TA, Goodwin FK, Newsome DA, Markey SP. Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 1980; 210:1267-1269.

Li H, Lu YF, Chen H, Liu J. Dysregulation of metallothionein and circadian genes in human hepatocellular carcinoma. *Chronobiol Int* 2017; 34:192-202.

Li J, Song Z, Wang Y, Yin Y, Liu Y, Yuan R, *et al.* Overexpression of SphK1 enhances cell proliferation and invasion in triple-negative breast cancer via the PI3K/AKT signaling pathway. *Tumour Biol* 2016; 37:10587-10593.

Li J, Yang B, Zhou Q, Wu Y, Shang D, Guo Y, *et al.* Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis* 2013; 34:1343-1351.

Liang C, Lee J, Inn K-S, Gack MU, Li Q, Roberts EA, *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2008; 10:776-787.

Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, *et al.* Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2013; 23:107-120.

Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:281-290.

Liedke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, *et al.* Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrog Tissue Repair* 2013; 6:19.

Lin SH, Lin YM, Yeh CM, Chen CJ, Chen MW, Hung HF, *et al.* Casein kinase 1 epsilon expression predicts poorer prognosis in low T-stage oral cancer patients. *Int J Mol Sci* 2014; 15:2876-2891.

Lin SH, Yeh CM, Hsieh MJ, Lin YM, Chen MW, Chen CJ, *et al.* Low cytoplasmic casein kinase 1 epsilon expression predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2016; 37:3997-4005.

Lissoni P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol* 2007; 55:201-204.

Lissoni P, Chilelli M, Villa S, Cerizza L, Tancini G. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res* 2003; 35:12-15.

Liu R, Fu A, Hoffman AE, Zheng T, Zhu Y. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways. *BMC Cell Biol* 2013; 14:1.

Liu SQ, Huang JA, Qin MB, Su YJ, Lai MY, Jiang HX, *et al.* Sphingosine kinase 1 enhances colon cancer cell proliferation and invasion by upregulating the production of MMP-2/9 and uPA via MAPK pathways. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27:1569-1578.

Liu Y, Poon RT, Li Q, Kok TW, Lau C, Fan ST. Both antiangiogenesis-and angiogenesis-independent effects are responsible for hepatocellular carcinoma growth arrest by tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res* 2005; 65:3691-3699.



---

Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, *et al.* Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2016; 2:16018.

Locarnini S, Hatzakis A, Chen D-S, Lok A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol* 2015; 62:S76-S86.

Lock R, Kenific CM, Leidal AM, Salas E, Debnath J. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discov* 2014; 4:466-479.

Long JS, Edwards J, Watson C, Tovey S, Mair KM, Schiff R, *et al.* Sphingosine kinase 1 induces tolerance to human epidermal growth factor receptor 2 and prevents formation of a migratory phenotype in response to sphingosine 1-phosphate in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2010; 30:3827-3841.

Lopez-Guerra JL, Verdugo-Sivianes EM, Otero-Albiol D, Vieites B, Ortiz-Gordillo MJ, De León JM, *et al.* High casein kinase 1 epsilon levels are correlated with better prognosis in subsets of patients with breast cancer. *Oncotarget* 2015; 6:30343-30356.

Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5:407-441.

Ma D, Li S, Molusky MM, Lin JD. Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23:319-325.

Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 2012; 22:50-60.

Madaro L, Marrocco V, Carnio S, Sandri M, Bouché M. Intracellular signaling in ER stress-induced autophagy in skeletal muscle cells. *FASEB J* 2013; 27:1990-2000.

Maiese K. Moving to the rhythm with clock (circadian) genes, autophagy, mTOR, and SIRT1 in degenerative disease and cancer. *Curr Neurovasc Res* 2017; 14:299-304.

Maillo C, Martin J, Sebastian D, Hernández-Alvarez M, García-Rocha M, Reina O, *et al.* Circadian- and UPR-dependent control of CPEB4 mediates a translational response to counteract hepatic steatosis under ER stress. *Nat Cell Biol* 2017; 19:94-105.

Marcolin E, San-Miguel B, Vallejo D, Tieppo J, Marroni N, González-Gallego J, *et al.* Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr* 2012; 142:1821-1828.

Martie A, Sporea I, Popescu A, Sirli R, Dănilă M, Serban C, *et al.* Contrast enhanced ultrasound for the characterization of hepatocellular carcinoma. *Med Ultrason* 2011; 13:108-113.

Martin V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, Garcia-Santos G, Antolin I, Rodriguez-Blanco J, *et al.* Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res* 2006; 66:1081-1088.

Martín-Renedo J, Mauriz JL, Jorquera F, Ruiz-Andrés O, González P, González-Gallego J. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res* 2008; 45:532-540.

Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21:1367-1381.

Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 2003; 302:255-259.

Matsu-Ura T, Dovzhenok A, Aihara E, Rood J, Le H, Ren Y, *et al.* Intercellular coupling of the cell cycle and circadian clock in adult stem cell culture. *Mol Cell* 2016; 64:900-912.

Matula K, Collie-Duguid E, Murray G, Parikh K, Grabsch H, Tan P, *et al.* Regulation of cellular sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase 1 and sphingosine-1-phosphate lyase determines chemotherapy resistance in gastroesophageal cancer. *BMC Cancer* 2015; 15:762.

Mauriz JL, Gonzalez-Gallego J. Antiangiogenic drugs: current knowledge and new approaches to cancer therapy. *J Pharm Sci* 2008; 97:4129-4154.

Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007; 42:222-230.

Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, *et al.* Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334:693-699.

McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:534-540.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1249-1259.

Mehta P, Henault J, Kolbeck R, Sanjuan MA. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr Opin Immunol* 2014; 26:69-75.

Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46:210-240.

---

Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, *et al.* Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334:1573-1577.

Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005; 39:360-366.

Min L, He B, Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. *Semin Cancer Biol* 2011; 21:10-20.

Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016; 8:227-241.

Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21:2861-2873.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; 15:1101-1111.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140:313-326.

Momma T, Okayama H, Saitou M, Sugeno H, Yoshimoto N, Takebayashi Y, *et al.* Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma. *Oncol Lett* 2017; 14:5319-5325.

Moore PC, Oakes SA. CPEB4 links the clock and the UPR to protect the liver. *Nat Cell Biol* 2017; 19:79-81.

Moreira AJ, Ordoñez R, Cerski CT, Picada JN, García-Palomo A, Marroni NP, *et al.* Melatonin Activates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Rats with Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis. *PLoS One* 2015; 10:e0144517.

Mormont M, Levi F. Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives. *Cancer* 2003; 97:155-169.

Motilva V, García-Mauriño S, Talero E, Illanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J Pineal Res* 2011; 51:44-60.

Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* 2017; 36:1619-1630.

Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, Okyar A, Lévi F. Clock gene Per2 as a controller of liver carcinogenesis. *Oncotarget* 2016; 7:85832-85847.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.

Münz C. Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol Rev* 2016; 272:17-27.

Nakagawa H, Maeda S. Inflammation-and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2012; 18:4071-4081.

Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, *et al.* ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 2014; 26:331–343.

Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 2009; 324:654-657.

Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, *et al.* Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* 2011; 31:2283-2290.

Ng ML, Wadham C, Sukocheva OA. The role of sphingolipid signalling in diabetes-associated pathologies (Review). *Int J Mol Med* 2017, 39:243-252.

Nielsen OH, Li Y, Johansson-Lindbom B, Coskun M. Sphingosine-1-phosphate signaling in inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 2017; 23:362-374.

North S, Moenner M, Bikfalvi A. Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett* 2005; 218:1-14.

Obeng E.A, Boise LH. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280:29578-29587.

Obi S, Sato S, Kawai T. Current status of hepatic arterial infusion chemotherapy. *Liver Cancer* 2015; 4:188-199.

Ogata M, Hino S-I, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, *et al.* Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Cell Biol* 2006; 26, 9220-9231.

Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, Yekeler H, Sahin S, Sarsilmaz M. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicol Ind Health* 2008; 24:201-208.

Ogretmen B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer* 2018; 18:33-50.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017a), Hepatitis B. Nota descriptiva OMS, actualización de julio de 2017. Disponible en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Consultado en julio de 2018.

---

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017b), Hepatitis C. Nota descriptiva OMS, actualización de abril de 2017. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Consultado en julio de 2018.

Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homoeostasis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:245-254.

Oshima T, Takenoshita S, Akaike M, Kunisaki C, Fujii S, Nozaki A, *et al.* Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2011; 25:1439-1446.

Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:564-573.

Pandi-Perumal SR, BaHammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, *et al.* Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotox Res* 2013; 23:267-300.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282:24131-24145.

Papagiannakopoulos T, Bauer MR, Davidson SM, Heimann M, Subbaraj L, Bhutkar A, *et al.* Circadian rhythm disruption promotes lung tumorigenesis. *Cell Metab* 2016; 24:324-331.

Park SW, Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol* 2013; 35:351-373.

Park YN, Kim YB, Yang KM, Park C. Increased expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1061-1065.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 2014; 24:90-99.

Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20:460-473.

Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2016; 8:421-438.

Patmanathan SN, Johnson SP, Lai SL, Panja Bernam S, Lopes V, Wei W, *et al.* Aberrant expression of the S1P regulating enzymes, SPHK1 and SGPL1, contributes to a migratory phenotype in OSCC mediated through S1PR2. *Sci Rep* 2016; 6:25650.

Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not by insulin. *J Biol Chem* 1990; 265:18051-18054.

Pereira ER, Liao N, Neale GA, Hendershot LM. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One* 2010; 5:e12521.

Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF- $\kappa$ B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:1433-1448.

Pluquet O, Dejeans N, Bouche-careilh M, Lhomond S, Pineau R, Higa A, *et al.* Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE $\alpha$ . *Cancer Res* 2013; 73:4732-4743.

Pluquet O, Dejeans N, Chevet E. Watching the clock: endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer. *Ann Med* 2014; 46:233-243.

Polo A, Singh S, Crispo A, Russo M, Giudice A, Montella M, *et al.* Evaluating the associations between human circadian rhythms and dysregulated genes in liver cancer cells. *Oncol Lett* 2017; 14:7353-7359.

Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 2003a; 238:9-28.

Poon RT, Lau CP, Cheung ST, Yu WC, Fan ST. Quantitative correlation of serum levels and tumor expression of vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003b; 63:3121-3126.

Prieto-Domínguez N, Méndez-Blanco C, Carbajo-Pescador S, Fondevila F, García-Palomo A, González-Gallego J, *et al.* Melatonin enhances sorafenib actions in human hepatocarcinoma cells by inhibiting mTORC1/p70S6K/HIF-1 $\alpha$  and hypoxia-mediated mitophagy. *Oncotarget* 2017; 8:91402-91414.

Prieto-Domínguez N, Ordóñez R, Fernández A, Méndez-Blanco C, Baulies A, Garcia-Ruiz C, *et al.* Melatonin-induced increase in sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib is associated with reactive oxygen species production and mitophagy. *J Pineal Res* 2016; 61:396-407.

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, *et al.* ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 2007; 129:1337-1349.

Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:489-503.

Pyne S, Adams DR, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease: recent advances. *Prog Lipid Res* 2016; 62:93-106.

---

Qin LX, Tang ZY, Li XM, Bu W, Xia JL. Effect of antiangiogenic agents on experimental animal models of hepatocellular carcinoma. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28:147-151.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112:1809-1820.

Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Chang JW, Smith JM, Walsh CT, Brown JH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated cell proliferation is mediated through sphingosine kinase-dependent Akt activation and cyclin D expression. *J Biol Chem* 2007; 282:863-870.

Rahman KMW, Sugie S, Watanabe T, Tanaka T, Mori, H. Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr Cancer* 2003; 47:148-155.

Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, *et al.* Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 2008; 44:273-279.

Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms* 2010; 8:3.

Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79:153-158.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:376-386.

Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29:363-372.

Reiter RJ, Mayo JC, Tan D-X, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 2016; 61:253-278.

Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322:1536-1538.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002; 418:935-941.

Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:753-763.

Rondanelli M, Faliva MA, Perna S, Antonielli N. Update on the role of melatonin in the prevention of cancer tumorigenesis and in the management of cancer correlates,

such as sleep-wake and mood disturbances: review and remarks. *Aging Clin Exp Res* 2013; 25:499-510.

Rossi L, Zoratto F, Papa A, Iodice F, Minozzi M, Frati L, *et al.* Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2:348-359.

Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Semin Liver Dis* 2008; 28:167-174.

Sabbadini RA. Sphingosine-1-phosphate antibodies as potential agents in the treatment of cancer and age-related macular degeneration. *Br J Pharmacol* 2011; 162:1225-1238.

Saeed U, Waheed Y, Ashraf M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. *Asian Pacific J Trop Dis* 2014; 4:88-96.

Sahar S, Sassone-corsi P. Metabolism and cancer : the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:886-896.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6230-6234.

Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 2010; 51:246-254.

Samarin J, Laketa V, Malz M, Roessler S, Stein I, Horwitz E, *et al.* PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2016; 63:813-826.

Sánchez DI, González-Fernández B, San-Miguel B, Ortiz de Urbina J, Crespo I, González-Gallego J, *et al.* Melatonin prevents deregulation of the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling pathway in a mice model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *J Pineal Res* 2017; 62:e12369.

Sánchez T. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial disorders. *Curr Atheroscler Rep* 2016; 18:31.

Sánchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem* 2004; 92:913-922.

Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Reiter RJ. Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21:819-831.



---

San-Miguel B, Crespo I, Sánchez DI, González-Fernández B, Ortiz de Urbina JJ, Tuñón MJ, *et al.* Melatonin inhibits autophagy and endoplasmic reticulum stress in mice with carbon tetrachloride-induced fibrosis. *J Pineal Res* 2015; 59:151-162.

Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833:3460-3470.

Savvidis C, Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Mol Med* 2012; 18:1249-1260.

Schernhammer ES, Feskanich D, Liang G, Han J. Rotating night-shift work and lung cancer risk among female nurses in the United States. *Am J Epidemiol* 2013; 178:1434-1441.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, *et al.* Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1563-1568.

Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, *et al.* Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:825-828.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms* 2003; 18:250-260.

Schrader J, Iredale JP. The inflammatory microenvironment of HCC - the plot becomes complex. *J Hepatol* 2011; 54:853-855.

Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine-1-phosphate: a Janus-faced mediator of fibrotic diseases. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:239-250.

Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 2005; 19:1-13.

Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:437-444.

Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41:864-880.

Senovilla L, Vitale I, Martins I, Tailler M, Pailleret C, Michaud M, *et al.* An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* 2012; 337:1678-1684.

Sephton S, Spiegel D. Circadian disruption in cancer: a neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun* 2003; 17:321-328.

Sewlall S, Pillay V, Danckwerts MP, Choonara YE, Ndesendo VMK, Toit LC. A timely review of state-of-the-art chronopharmaceuticals synchronized with biological rhythms. *Curr Drug Deliv* 2010; 7:370-388.

Shajari S, Laliena A, Heegsma J, Tuñón MJ, Moshage H, Faber KN. Melatonin suppresses activation of hepatic stellate cells through ROR $\alpha$ -mediated inhibition of 5-lipoxygenase. *J Pineal Res* 2015; 59:391-401.

Shen B, Chu ESH, Zhao G, Man K, Wu C-W, Cheng JTY, *et al.* PPAR $\gamma$  inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *Br J Cancer* 2012; 106:1486-1494.

Shiloh R, Bialik S, Kimchi A. The DAPK family: a structure–function analysis. *Apoptosis* 2014; 19:286-297.

Shin J, Lee HJ, Jung DB, Jung JH, Lee HJ, Lee EO, *et al.* Suppression of STAT3 and HIF-1 $\alpha$  mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *PLoS One* 2011; 6:e21492.

Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:900-911.

Siddique O, Yoo ER, Perumpail RB, Perumpail BJ, Liu A, Cholankeril G, *et al.* The importance of a multidisciplinary approach to hepatocellular carcinoma. *J Multidiscip Healthc* 2017; 10:95-100.

Singal AG, El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma from epidemiology to prevention: translating knowledge into practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13:2140-2151.

Singh M, Jadhav HR. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today* 2014; 19:1410-1418.

Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ* 2001; 322:1538-1539.

Smolensky MH, Peppas NA. Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:828-851.

Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 2012; 485:62-68.

Song J, Guo X, Xie X, Zhao X, Li D, Deng W, *et al.* Autophagy in hypoxia protects cancer cells against apoptosis induced by nutrient deprivation through a Beclin1-dependent way in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2011; 112:3406-3420.

Spiegel, S., Milstien, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:397-407.

---

Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 2000; 476:55-57.

Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:403-415.

Springer MZ, Macleod KF. In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease. *J Pathol* 2016; 240:253-255.

Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, *et al.* The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:7037-7040.

Sternberger LA, Hardy PH,Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigenantibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315-333.

Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, *et al.* Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2:1361-1366.

Subramanian P, Mirunalini S, Dakshayani KB, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. *J Pineal Res* 2007; 43:305-312.

Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62:904-917.

Sulli G, Rommel A, Wang X, Kolar MJ, Puca F, Saghatelian A, *et al.* Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence. *Nature* 2018; 553:351-355.

Sun CM, Huang SF, Zeng JM, Liu DB, Xiao Q, Tian WJ, *et al.* Per2 inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Pathol Oncol Res* 2010; 16:403-411.

Sun HC, Tang ZY. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130:307-319.

Samarin J, Laketa V, Malz M, Roessler S, Stein I, Horwitz E, *et al.* PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding proteins in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2016; 63:813-826.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7:880-885.

Tahan G, Akin H, Aydogan F, Ramadan SS, Yapicier O, Tarcin O, *et al.* Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *Can J Surg* 2010; 53:323-318.

Tahan V, Atug O, Akin H, Eren F, Tahan G, Tarcin O, *et al.* Melatonin ameliorates methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *J Pineal Res* 2009; 46:401-407.

Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, Aydin S, Yildirim B, *et al.* Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2004; 37:78-84.

Takabe K, Kim RH, Allegood JC, Mitra P, Ramachandran S, Nagahashi M, *et al.* Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCG1 and ABCG2. *J Biol Chem* 2010; 285:10477-10486.

Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2008; 9:764-775.

Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25:795-800.

Takuwa N, Du W, Kaneko E, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa Y. Tumor-suppressive sphingosine-1-phosphate receptor-2 counteracting tumor-promoting sphingosine-1-phosphate receptor-1 and sphingosine kinase 1-Jekyll Hidden behind Hyde. *Am J Cancer Res* 2011; 1:460-481.

Tallóczy Z, Jiang W, Virgin HW, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, *et al.* Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2002; 99:190-195.

Tan D-X, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, and Reiter RJ. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res* 2013; 54:127-138.

Tan Q, Wang M, Yu M, Zhang J, Bristow RG, Hill RP, *et al.* Role of autophagy as a survival mechanism for hypoxic cells in tumors. *Neoplasia* 2016; 18:347-355.

Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14:2201-2214

Terada T, Maruo H. Unusual extrahepatic metastatic sites from hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:816-820.

Thudichum JLW. A treatise on the chemical constituents of the brain (a facsimile edition of the original). 1962

- 
- Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:663-674.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J Clin* 2015; 65:87-108.
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, Mizushima N. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 2008; 321:117-120.
- Túnez I, Muñoz MC, Medina FJ, Salcedo M, Feijóo M, Montilla P. Comparison of melatonin, vitamin E and L-carnitine in the treatment of neuro- and hepatotoxicity induced by thioacetamide. *Cell Biochem Funct* 2007; 25:119-127.
- Uranbileg B, Ikeda H, Kurano M, Enooku K, Sato M, Saigusa D, *et al.* Increased mRNA Levels of sphingosine kinases and S1P lyase and reduced levels of S1P were observed in hepatocellular carcinoma in association with poorer differentiation and earlier recurrence. *PLoS One* 2016; 11:e0149462.
- Van Dycke KCG, Rodenburg W, Van Oostrom CTM, Van Kerkhof LWM, Pennings JLA, Roenneberg T, *et al.* Chronically alternating light cycles increase breast cancer risk in mice. *Curr Biol* 2015; 25:1932-1937.
- Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 2010; 15:5-13.
- Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, *et al.* p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2007; 39:750-758.
- Verma D, Hashim OH, Jayapalan JJ, Subramanian P. Effect of melatonin on antioxidant status and circadian activity rhythm during hepatocarcinogenesis in mice. *J Cancer Res Ther* 2014; 10:1040-1044.
- Vijayalaxmi, Thomas CR, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002; 20:2575-2601.
- Volkova MS, Jensen KC, Lozinskaya NA, Sosonyuk SE, Proskurnina MV, Mesecar AD, *et al.* Synthesis of novel MT3 receptor ligands via an unusual Knoevenagel condensation. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22:7578-7581.
- Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:275-283.
- Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:537-549.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malini NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:331-67.

Wang RH, Zhao T, Cui K, Hu G, Chen Q, Chen W, *et al.* Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging. *Sci Rep* 2016; 6:28633.

Wang X, Dai Y, Ding Z, Khaidakov M, Mercanti F, Mehta JL. Regulation of autophagy and apoptosis in response to angiotensin II in HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440:696-700.

Wang XH, Liu BR, Qu B, Xing H, Gao SL, Yin JM, *et al.* Silencing STAT3 may inhibit cell growth through regulating signaling pathway, telomerase, cell cycle, apoptosis and angiogenesis in hepatocellular carcinoma: potential uses for gene therapy. *Neoplasma* 2011; 58:158-71.

Wang Y, Kojetin D, Burris TP. Anti-proliferative actions of a synthetic REV-ERB $\alpha/\beta$  agonist in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2015; 96:315-322.

Watson C, Long JS, Orange C, Tannahill CL, Mallon E, McGlynn LM, *et al.* High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am J Pathol* 2010; 177:2205-2215.

Watters RJ, Wang HG, Sung SS, Loughran TP, Liu X. Targeting sphingosine-1-phosphate receptors in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11:810-817.

Wegrzyn LR, Tamimi RM, Rosner BA, Brown SB, Stevens RG, Eliassen AH, *et al.* Rotating night shift work and risk of breast cancer in the nurses' health studies. *Am J Epidemiol* 2017; 186:532-540.

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:95-107.

White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:401-410.

Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat Res* 2000; 462:381-393.

Won C, Kim BH, Yi EH, Choi KJ, Kim EK, Jeong JM, *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015; 62:1160-1173.

---

Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN, Saliba D, *et al.* Extensive characterization of NF- $\kappa$ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol* 2011; 12:R70.

Wong ES, Le Guezennec X, Demidov ON, Marshall NT, Wang ST, Krishnamurthy J, *et al.* p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age. *Dev Cell* 2009; 17:142-149.

Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 2013; 9:124-137.

Wood PA, Yang X, Taber A, Oh E-Y, Ansell C, Ayers SE, *et al.* Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2008; 6:1786-1793.

Wu H, Wei L, Fan F, Ji S, Zhang S, Geng J, *et al.* Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis. *Nat Commun* 2015; 6:6239.

Wu SD, Ma YS, Fang Y, Liu LL, Fu D, Shen XZ. Role of the microenvironment in hepatocellular carcinoma development and progression. *Cancer Treat Rev* 2012a; 38:218-225.

Wu WK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FK, *et al.* The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* 2012b; 31:939-953.

Wu X, Xin Z, Zhang W, Zheng S, Wu J, Chen K, *et al.* A missense polymorphism in ATF6 gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering ATF6 level. *Int J Cancer* 2014; 135:61-68.

Wu X, Yang Y, Xu Z, Li J, Yang B, Feng N, *et al.* Raf kinase inhibitor protein mediated signaling inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860:384-391.

Wurtman RJ, Axelrod J. The formation, metabolism, and physiologic effects of melatonin in mammals. *Prog Brain Res* 1965; 10:520-529.

Xia JL, Yang BH, Tang ZY, Sun FX, Xue Q, Gao DM. Inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123:383-387.

Xia P, Wadham C. Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22:45-53.

Xiang S, Mao L, Duplessis T, Yuan L, Dauchy R, Dauchy E, *et al.* Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: regulation by melatonin. *Breast Cancer (Auckl)* 2012; 6:137-150.

Xie T-X, Xia Z, Zhang N, Gong W, Huang S. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncol Rep* 2010; 23:725-732.

Xie Z, Liu H, Geng M. Targeting sphingosine-1-phosphate signaling for cancer therapy. *Sci China Life Sci* 2017; 60:585-600.

Xu W, Lu C, Zhang F, Shao J, Zheng S. Dihydroartemisinin restricts hepatic stellate cell contraction via an FXR-S1PR2-dependent mechanism. *IUBMB Life* 2016; 68:376-387.

Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, *et al.* Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 2005; 434:640-644.

Xun C, Chen MB, Qi L, Tie-Ning Z, Peng X, Ning L, *et al.* Targeting sphingosine kinase 2 (SphK2) by ABC294640 inhibits colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34:94.

Yamamoto S, Yako Y, Fujioka Y, Kajita M1, Kameyama T3, Kon S, *et al.* A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in epithelial defense against cancer (EDAC). *Mol Biol Cell* 2016; 27:491-499.

Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2011a; 21:35-43.

Yang M, Xu Z, Wang Q, Zhang AQ, Min J. A hyposensitive anticancer drug induces higher surface expression and release of heat shock proteins in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Mol Med Rep* 2015; 12:2879-2885.

Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011b; 25:717-729.

Yang SL, Liu LP, Jiang JX, Xiong ZF, He QJ, Wu C. The correlation of expression levels of HIF-1alpha and HIF2alpha in hepatocellular carcinoma with capsular invasion, portal vein tumor thrombi and patients' clinical outcome. *Jpn J Clin Oncol* 2014; 44:159-167.

Ye CP, Qiu CZ, Huang ZX, Su QC, Zhuang W, Wu RL, *et al.* Relationship between survivin expression and recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13:6264-6268.

Yu C, Yang SL, Fang X, Jiang JX, Sun CY, Huang T. Hypoxia disrupts the expression levels of circadian rhythm genes in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* 2015; 11:4002-4008.

Yu EA, Weaver DR. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging (Albany NY)* 2011; 3:479-493.



---

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27:5497-5510.

Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and BclXL. *Autophagy* 2009; 5:720-722.

Zamani M, Taher J, Adeli K. Complex role of autophagy in regulation of hepatic lipid and lipoprotein metabolism. *J Biomed Res* 2017; 31:377-385.

Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; 61:383-410.

Zephy D, Ahmad J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonin and oxidative stress. *Diabetes Metab Syndr* 2015; 9:127-131.

Zhang C, He H, Zhang H, Yu D, Zhao W, Chen Y, *et al.* The blockage of Ras/ERK pathway augments the sensitivity of SphK1 inhibitor SKI II in human hepatoma HepG2 cells. *Biochem Biohys Res Commun* 2013b; 434:35-41.

Zhang L, Urtz N, Gaertner F, Legate KR, Petzold T, Lorenz M, *et al.* Sphingosine kinase 2 (Sphk2) regulates platelet biogenesis by providing intracellular sphingosine 1-phosphate (S1P). *Blood* 2013a; 122:791-802.

Zhang SL, Liu L. microRNA-148a inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1. *Exp Ther Med* 2015; 9:579-584.

Zhao Q, Zheng G, Yang K, Ao YR, Su XL, Li Y, *et al.* The clock gene PER1 plays an important role in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget* 2016; 7:70290-70302.

Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, inflammation, and immunity: a troika governing cancer and its treatment. *Cell* 2016; 166:288-298.

Zhou D, Wang Y, Chen L, Jia L, Yuan J, Sun M, *et al.* Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology. *Oncotarget* 2016; 7:8625-8639.



