



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Estudio integral de cirrosis y carcinoma hepatocelular

Integral study of cirrhosis and hepatocellular carcinoma

Chagoya de Sánchez, Victoria^{1*}; Pérez-Carreón, Julio Isael¹; Velasco-Loyden, Gabriela¹; Rodríguez-Aguilera, Jesús Rafael¹; Pérez-Cabeza de Vaca, Rebeca¹; Domínguez-López, Mariana¹; Lozano-Rosas, María Guadalupe¹ y Chávez, Enrique¹

1. Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

*Correspondencia. Circuito Exterior, Zona de Investigación Científica. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, CP 04510

Tel. +52 (55) 5622-5614, vchagoya@ifc.unam.mx.

Resumen

La cirrosis es una enfermedad degenerativa caracterizada por daño crónico e irreversible del tejido hepático: distorsión de su arquitectura, pérdida de funciones e inestabilidad cromosómica. Por otro lado, el carcinoma hepatocelular está asociado a procesos de dediferenciación y proliferación descontrolada; de los cuales el 80% de los casos están relacionados con cirrosis. Dichos padecimientos, son dos problemas de salud pública en lo que no se dispone de métodos de detección temprana ni un tratamiento efectivo. Estudios previos con adenosina señalan su efecto al prevenir y revertir la cirrosis, destacando la regulación del estado energético, redox y metilaciones. Por lo cual, en nuestro grupo de trabajo desarrollamos un derivado del nucleósido, IFC-305 más efectivo a menor dosis. El estudio del transcriptoma revela que el tratamiento con este compuesto permite la recuperación de la expresión de 150 genes entre ellos: fibrogénicos, adipogénicos, inmunológicos y funcionales. Estudios sobre la regulación de la expresión génica indican efectos epigenéticos dados por IFC-305 como son la metilación del promotor de Col1 y la desacetilación del promotor de PPAR γ . Al estudiar el proceso inmunológico en cirrosis se encontró que el IFC-305 tiene un efecto antiinflamatorio y promueve la reparación del tejido al aumentar los macrófagos M2. En el hepatocarcinoma se vio que el compuesto tiene un efecto antiproliferativo al inhibir la timidilato sintasa, la ruta HGF/c-Met, aumenta el inhibidor de la proliferación p27 y de manera muy importante,

Abstract

Cirrhosis is a degenerative disease characterized by chronic and irreversible liver tissue damage, distortion of architecture, loss of liver function and chromosomal instability. Hepatocellular carcinoma is associated with processes of de-differentiation and uncontrolled proliferation and 80% resulting from cirrhosis. They are two public health problems because there is no early detection or effective treatment. Previous studies with adenosine indicate its effect by preventing and reversing cirrhosis, highlighting its regulation of energy status, redox and methylation. A derivative of the nucleoside, IFC-305, was prepared, more effective at a lower dose. The study of the transcriptome shows with the treatment the recovery of the expression of 150 genes among them fibrogenic, adipogenic, immunological and functional. Studies on the regulation of gene expression indicate epigenetic effects, methylation of the Col1 promoter and deacetylation of the PPAR γ promoter by IFC-305. When studying the immunological process in cirrhosis, it was found that IFC-305 has an anti-inflammatory effect and promotes tissue repair by increasing M2 macrophages. In hepatocellular carcinoma, it was found that the compound has an antiproliferative effect by inhibiting thymidylate synthase, the HGF/c-Met pathway, increases the p27 proliferation inhibitor and, in a very important way, reverses the integral damage of the mitochondria induced in hepatocellular cancer. All these results support the therapeutic potential of IFC-305 in the treatment of

reverte el daño integral de la mitocondria inducido en el cáncer hepatocelular. Todos estos resultados apoyan el potencial terapéutico del IFC-305 en el tratamiento de cirrosis y del cáncer hepatocelular.

Palabras clave: hepatoprotector, epigenética, inflamación, cáncer de hígado, reparación mitocondrial.

cirrhosis and hepatocellular cancer.

Key words: hepatoprotector, epigenetic, inflammation, liver cancer, mitochondrial reparation.

Introducción

El hígado es el órgano más grande del organismo. Está constituido por cuatro lóbulos y tiene un papel central en la homeostasis metabólica desempeñando un gran número de funciones en las transformaciones metabólicas de los alimentos y el metabolismo energético, por lo que se le considera como el laboratorio del organismo. El hígado procesa los nutrientes de la dieta para obtener energía, y distribuye los sustratos energéticos tales como la glucosa, cuerpos cetónicos, purinas, pirimidinas y lipoproteínas a los tejidos extrahepáticos; para ayudar al mantenimiento energético del organismo.

Composición del hígado

Es un tejido heterogéneo, anatómicamente organizado en acinos que representan la unidad estructural, circulatoria y funcional hepática. Posee diferentes tipos de células tales como: a) los hepatocitos, que representan el 70-80% de las células y constituyen el parénquima hepático en donde se desarrollan un número importante de las funciones hepáticas, así como por las b) células endoteliales, que representan el otro 20% y que forman parte de los vasos sanguíneos. Otros tipos celulares presentes son las células de Kupffer (CK) que son los macrófagos estacionarios hepáticos, células estelares (CE), que se localizan en el mesénquima hepático y células ovales que son las células madres del hígado localizadas en el canal de Hering [1]. Por otro lado, el tejido libre de células constituye el 20% del volumen hepático y está constituido por la matriz extracelular (ME) localizada en el espacio de Disse, que contiene proteínas estructurales, siendo la más abundantes la colágena tipo I y en menor cantidad la colágena tipo III, V, VI y VII [2] que, junto con otras proteínas estructurales como laminina, tenacina y fibronectina, mantienen la arquitectura hepática y su organización [3].

Metabolismo hepático

El metabolismo hepático, principalmente a nivel de los hepatocitos, es muy activo ya que debe cubrir sus propias funciones y las de otros órganos. El

metabolismo de carbohidratos es un importante regulador de los niveles de glucosa sanguínea debido a que capta la glucosa y sintetiza glucógeno, a la par de ser el principal responsable de llevar a cabo la gluconeogénesis. En el metabolismo de proteínas, la deaminación e interconversión de los aminoácidos es muy activa, el amonio es eliminado a través del ciclo de la urea en los hepatocitos periportales mientras que también puede incorporarlo a la glutamina en los hepatocitos pericentrales. Adicionalmente, este órgano es muy activo en la síntesis de proteínas del suero como albúmina, factores de coagulación, apolipoproteínas, entre otras. El metabolismo de lípidos, sintetiza principalmente colesterol, fosfolípidos, triglicéridos, cuerpos cetónicos, lipoproteínas, ácidos biliares y presenta una gran actividad en la β -oxidación mitocondrial. El hígado también genera purinas y pirimidinas para su propio uso o para otros tejidos en forma de adenosina, inosina e hipoxantina [4]. El hígado es el único órgano que posee la capacidad de detoxificar eliminando compuestos tóxicos endógenos (como el amonio) ó exógenos y posee mecanismos de defensa contra el estrés oxidante como el glutatión, superóxido dismutasa y catalasa.

El metabolismo hepático está regulado bioquímicamente por el sistema endócrino y neural, algunos metabolitos como citocinas, factores de crecimiento y en forma importante por el estado energético y de óxido-reducción. Todo esto contribuye a mantener la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, regulando la expresión genética responsable de una fisiología hepática normal.

La cirrosis

La cirrosis es la condición patológica más importante y severa del hígado. Se trata de una enfermedad degenerativa caracterizada por daño crónico e irreversible del parénquima hepático el cual atraviesa por un proceso inflamatorio que genera una fibrosis difusa, lo que resulta en un tejido cicatrizal que separa los nódulos de regeneración produciendo una distorsión de la arquitectura lobular y vascular del tejido que resulta en una pérdida de la masa

funcional hepática. La cirrosis resulta de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz extracelular, principalmente de la colágena tipo I que es la proteína más abundante y que se acumula por una disminución de su degradación por inhibición de las colagenasas. Esto causa una disminución del parénquima funcional que con el tiempo cambia el ambiente celular y causa una inestabilidad cromosómica [5-7].

El origen de la enfermedad es muy diverso, siendo el más frecuente la exposición crónica al etanol o a otros tóxicos, la hepatitis viral crónica tipo “C” o “B”, enfermedades autoinmunes, padecimientos de tipovascular congestivo, alteraciones de las vías biliares y metabólicas (como el síndrome metabólico).

Los mecanismos que originan la cirrosis no se conocen completamente, pero se han encontrado algunas características de esta patología: a) daño tisular por estrés oxidante [8] b) movilización de células inflamatorias que liberan citocinas reguladoras de la respuesta y contribuyen a la activación de las CE [9]; c) una vez activadas las CE adquieren un fenotipo colagénico en el que aumenta la biosíntesis de colágena y los inhibidores específicos de las colagenasas (TIMP-1 y TIMP-2) [10]. Las manifestaciones clínicas son múltiples como la encefalopatía, ascitis, varices esofágicas, hipertensión portal y esplenomegalia. Ocurre una disminución de: a) la síntesis de proteínas en general y de albúmina en especial, b) de los factores de coagulación originando una coagulación anormal, así como c) de los mecanismos de desintoxicación endógena, como es el ciclo de la urea, que induce acumulación de amonio y encefalopatía y desactivación de drogas y hormonas.

La cirrosis representa la catorceava causa de muerte en el mundo y constituye un problema importante de salud. Esta situación se complica si consideramos que el 80% del carcinoma hepatocelular (CHC) se origina de la cirrosis. El CHC es una patología compleja asociada a procesos de desdiferenciación y proliferación descontrolada, siendo esta neoplasia la quinta con mayor incidencia a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública. La mortalidad de este tipo de cáncer va en aumento en países asiáticos y africanos, siendo China el país con mayor incidencia, mientras que en México aumentó hasta en un 30% en el periodo de 1998-2006 [11,12]. La transición de un hígado cirrótico a un hígado con CHC es un proceso complejo poco conocido en el que hemos sugerido que la inestabilidad cromosómica característica de la

cirrosis juega un papel importante. La principal problemática de estas dos patologías es que no hay una detección temprana y su tratamiento está enfocado a las múltiples manifestaciones de la enfermedad como ascitis, encefalopatías, etc. En el caso del CHC, existen métodos no invasivos para su detección como el ultrasonido abdominal y la α -fetoproteína (AFP). Las posibilidades de tratamiento son muy pocas como trasplante hepático ortotópico, resección quirúrgica y terapias paliativas como son la embolización del tumor, quimioterapia arterial y sistémica, radiación con yodo-131 e inmunoterapia.

Fisiología de la adenosina

La adenosina es un compuesto derivado de las purinas formado posiblemente en las primeras etapas de la evolución, en las que el calor y la energía radiante pudieron favorecer la condensación de HCN, CO, CO₂, H₂, NH₃, y CH₄ para formar la base adenina la cual se condensó con la α -D-ribosa por síntesis abiótica para formar la adenosina, la cual no sufrió cambios posteriores a través de la evolución [13]. Es una molécula vital que existe en todas las células. Su síntesis biológica ocurre mediante vías metabólicas que forman las bases púricas usando como intermediarios aminoácidos como glutamina, aspartato, glicina, diez enzimas y cinco moléculas de alta energía. El hígado es muy activo en la síntesis de adenosinas, pero no todas las células tienen la capacidad de sintetizar *de novo* a las purinas, por lo que recurren a la reutilización de sus productos de degradación. La adenosina puede ser transportada o liberada en las células (Fig. 1) a través de transportadores y posee cuatro tipos de receptores (A1, A2a, A2b y A3). Adicionalmente, tiene un metabolismo muy activo lo que con lleva a una vida media muy corta: a) se degrada por la adenosina deaminasa generando como producto final el ácido úrico, b) se fosforila por la adenosina quinasa formando AMP, c) el ATP y la metionina pueden generar s-adenosilmetionina (SAM) que es el agente metilante de la célula, d) se puede generar adenosina intracelular por la degradación de AMP por la 5' nucleotidasa y la S-adenosilmetionina hidrolasa actuando en la S-adenosilhomocisteína [14].

Adenosina como regulador metabólico

Estudios previos de nuestro laboratorio revelaron que la adenosina actúa como modulador metabólico de carbohidratos y lípidos en el hígado y en el tejido adiposo, así como la capacidad de regular *in vivo* la carga energética en el hígado [15]. Existe un amplio consenso en la literatura así como en nuestros resultados que nos llevan a concluir que la adenosina

tiene efectos multifisiológicos en diferentes tejidos del sistema nervioso central y del sistema cardiovascular, al modular la respuesta inmune y actuar como un modulador metabólico. Su acción puede ser autócrina, parácrina y endócrina, mientras que su metabolismo es muy activo con un alto recambio y una vida media corta. Una importante característica fisiológica es que presenta variaciones circádicas en la rata. Estas variaciones en diversos órganos (hígado, sangre, cerebro, corazón), están conectadas con importantes funciones como el mantenimiento de la homeostasis energética de la célula, la modulación de la estructura y función de las membranas, la proliferación celular y la expresión genética regulando las metilaciones fisiológicas [16]. En conjunto, ésto nos llevó a proponer que la adenosina puede ser un oscilador metabólico de los ritmos circádicos [14].

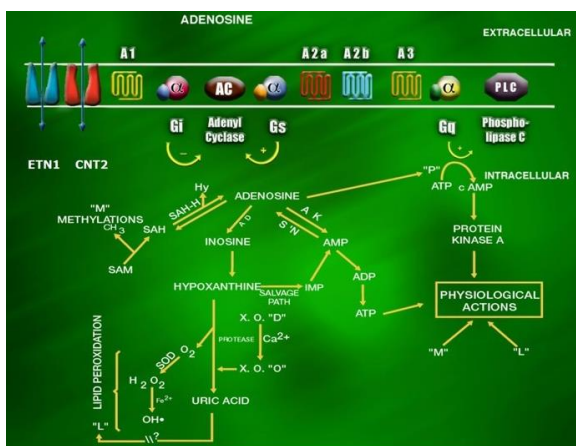


Figura 1. Transportadores, receptores y metabolismo de adenosina.

Efectos farmacológicos de la adenosina

Estos efectos se encontraron al administrar por vía intraperitoneal una dosis de adenosina y evaluar algunas vías metabólicas que comentaremos brevemente a continuación (Fig. 2). La carga energética del sistema de adenilato (AMP, ADP, y ATP) en el tejido hepático después de la administración intraperitoneal de adenosina, induce un aumento de la poza de ATP simultáneo a una disminución de la concentración de ADP y AMP, aumentando la carga energética de 0.86 a 0.9. Simultáneamente, en el hígado de ratas ayunadas se observa un aumento en la síntesis de glucógeno [17] y una inhibición en la oxidación de ácidos grasos al inhibir la activación de los ácidos grasos como consecuencia de la inhibición de la acilCoA sintasa extramitocondrial, lo que disminuye el aporte de

cuerpos cetónicos en el plasma [18]. Es decir, la administración del nucleósido favorece la síntesis de compuestos almacenadores de energía disminuyendo la vía generadora de energía en un animal ayunado. Estos resultados nos permitieron demostrar *in vivo* la hipótesis de Atkinson, sobre la regulación del metabolismo por la carga energética [19].

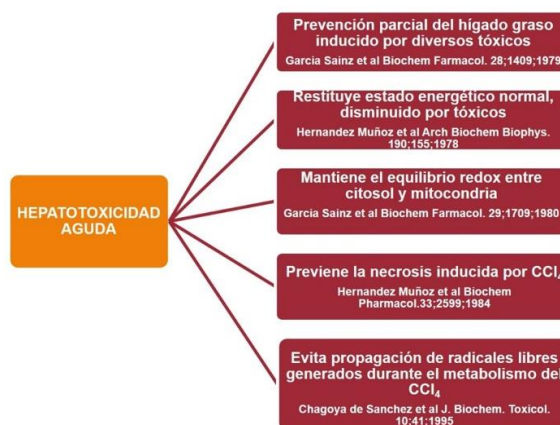


Figura 2. Efecto de la adenosina en la hepatotoxicidad aguda en ratas. La información detallada se encuentra en las referencias: Hernández Muñoz *et al.* 1978, 1984; García-Sáinz *et al.* 1979, 1980; Chagoya de Sánchez *et al.* 1995.

Otro parámetro importante en la regulación del metabolismo es el estado de óxido-reducción o estado redox representado por la relación de nicotinadeninucleótido oxidado y reducido $NAD^+/NADH$ en diferentes compartimentos celulares como el citosol y la mitocondria [20]. La administración de la adenosina induce las oxidaciones mitocondriales dependientes de esas coenzimas, favoreciendo el estado oxidado en el citosol y en la mitocondria en presencia de la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos [18]. Se ha reportado que la adenosina modula la vasodilatación y vasoconstricción de los vasos hepáticos controlando el flujo sanguíneo de la arteria hepática [21]. Un aspecto muy interesante que llamó nuestra atención es que muchos de los cambios metabólicos observados coincidían con cambios observados en los ritmos circádicos, por ejemplo la elevación de adenosina a las 4 AM en la rata coincidía con la mayor cantidad de energía en la célula y con la mayor síntesis de glucógeno.

Adenosina y la hepatotoxicidad aguda

El estudio del efecto hepatoprotector de la adenosina se inició en tres modelos de hepatotoxicidad aguda en ratas: 1) inducida con la administración de etanol, 2) con cicloheximida

(CHN) y 3) con tetracloruro de carbono (CCl_4). Cabe señalar que, aunque los mecanismos tóxicos son diferentes, en los tres casos el resultado fue similar al generar hígado graso. En el caso del etanol al metabolizarse induce un cambio en el estado redox citosólico (NAD^+/NADH) producido al metabolizarse y una disminución en ATP, mientras que la administración de adenosina previene y revierte el hígado graso al aumentar los niveles de ATP y estimular las oxidaciones en la mitocondria [19].

En el segundo modelo con CHM, un inhibidor de la síntesis de proteínas, aumenta la cantidad de triacilglicéridos en el hígado al aumentar la captación de los ácidos grasos. En este caso, la adenosina evita dicho efecto al inhibir a la sintetasa de la acilCoA *in vivo* e *in vitro* [22].

En el tercer modelo inducido con CCl_4 [23] se encontró que el hígado graso es generado al inhibir la liberación de triglicéridos del hígado y aumentar la lipoperoxidación de las membranas [24,25], impidiendo la liberación de las lipoproteínas así como su síntesis. En presencia de adenosina se inhibe la lipoperoxidación y se inhibe la propagación de los radicales liberados por el tóxico a través del ácido úrico generado en su catabolismo [23,26]. De esta manera, el nucleósido protege al hígado contra la toxicidad aguda (Fig. 2), a través de diferentes mecanismos.

Cirrosis y adenosina

Si la hepatotoxicidad aguda continua se genera un efecto crónico que genera la cirrosis, la cual está caracterizada por la acumulación de las proteínas de la ME, principalmente colágena tipo I, acompañada de una degradación deficiente [27,28], lo que induce una alteración de la estructura del hígado y pérdida de su función. Para estudiar el efecto de la adenosina en esta patología se utilizó un modelo de cirrosis experimental inducido con CCl_4 administrado por vía intraperitoneal tres veces por semana (0.25 ml CCl_4 , diluido 1:6 en aceite de cacahuate) durante 8 semanas para generar la cirrosis. Para probar el efecto del nucleósido en un modelo de prevención se administró a un grupo de animales después de administrar la toxina en una dosis de 200mg/kg de peso corporal (Fig. 3) [29]. Para el modelo de reversión, el nucleósido se administró tres veces por semana a la misma dosis después de las 10 semanas de tratamiento con el tóxico cuando la cirrosis estaba establecida (Fig. 4) [30]. En el modelo de prevención, el aumento en la síntesis de colágena y su acumulación por inhibición de las colagenasas es

inhibido por la administración simultánea de adenosina que bloquea parcialmente la síntesis de colágena inducida por tóxico y mantiene la actividad de la colagenasa evitando su acumulación [29]. El nucleósido también previene el desbalance energético, así como el cambio del estado redox y el estrés oxidante generado en la cirrosis al prevenir el daño mitocondrial. En ese momento no se conocía el mecanismo molecular de los efectos del nucleósido, pero si se observó una disminución del 50% de la fibrosis en los animales tratados con CCl_4 y adenosina. El efecto benéfico del nucleósido también se observó claramente en el modelo de reversión de la cirrosis ya establecida siendo este el modelo observado en los pacientes que desarrollan cirrosis y es diagnosticada hasta que se manifiestan las alteraciones de la función hepática. El hígado cirrótico generado por la administración del tóxico por 10 semanas se manifestó por aumento de colágena tipo I, III y fibronectina, una disminución de la actividad de las colagenasas y un aumento de los inhibidores de las colagenasas TIMPs y del estrés oxidante.

Modelo de prevención: Efecto de la adenosina en la cirrosis experimental

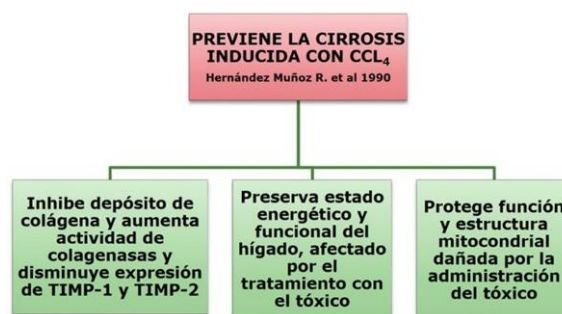


Figura 3. Prevención de la fibrosis hepática inducida con CCl_4 por la adenosina. Tomado de Hernández-Munoz *et al.* 1990).

Modelo de reversión: Efecto de la adenosina en la cirrosis experimental

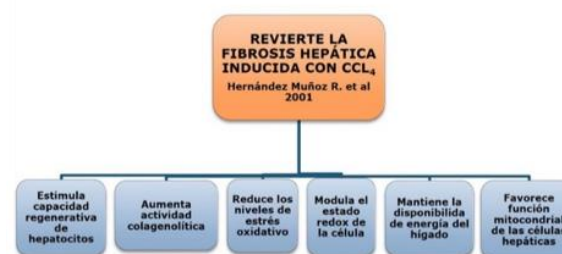


Figura 4. Reversión de la fibrosis hepática inducida con CCl_4 por la adenosina. Tomado de Hernández-Muñoz *et al.* 1990.

De forma importante, todos estos efectos coincidieron con la disminución de la capacidad regenerativa del hígado. Los animales cirróticos

tratados con adenosina mostraron, disminución de la fibrogénesis, aumento en la degradación de la colágena y disminución de los TIMPs (Fig. 3). De manera clara, el hígado recuperó su capacidad regenerativa acelerando la recuperación de la función hepática mostrando que la adenosina puede ser una posible terapia para enfermedades crónicas del hígado como la fibrosis/cirrosis [30].

Desarrollo clínico de la adenosina

De este hallazgo tan interesante surgió la inquietud de probar la acción del nucleósido en un desarrollo clínico. Al ser la adenosina una sustancia fisiológica era difícil considerar este desarrollo por lo que en colaboración con el Dr. Francisco Hernández Luis, de la Facultad de Química de la UNAM, se preparó una familia de derivados de adenosina los cuales fueron evaluados en el modelo de cirrosis inducida por CCl_4 . El aspartato de adenosina, llamado IFC-305, mostró resultados interesantes que mencionaremos a continuación. El efecto hepatoprotector del IFC-305 se detectó a una dosis cuatro veces menor, adenosina o IFC-305 (ambos marcados con C^{14}), con la misma actividad específica, resultaron con diferente permanencia en el hígado. La adenosina alcanzó su máxima absorción a los 20 minutos de su administración y rápidamente declinó a niveles no detectables, mientras que el IFC-305 se continuaba absorbiendo a los 40 minutos de su administración y permaneció con concentraciones significativas a los 120 minutos de su administración demostrando que la desaparición del derivado es mucho más lenta que la de la adenosina, este efecto se puede explicar por una disminución de la actividad de la adenosina deaminasa en un 20% y permite observar el efecto hepatoprotector a 50 mg/kg en vez de 200 mg/kg de adenosina [31] tales como: disminución de colágena, aumento de las colagenasas, recuperación de la actividad proliferativa, y de la función hepática (Fig. 5). Con base en estos experimentos, los siguientes estudios se realizaron con el derivado de adenosina. Para considerar la potencialidad clínica de este derivado, era necesario realizar estudios preclínicos realizados por especialistas autorizados:

I. *Estudios de toxicidad aguda.* Se realizaron por el Dr. Efraín Campos Sepúlveda, jefe del Laboratorio de Toxicología del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina. Con el esquema de dosis empleada en las diferentes vías de administración no se indujo letalidad por lo que no fue posible calcular dosis letal cincuenta (DL_{50}). Por lo anterior se puede considerar que el

IFC-305 es una sustancia muy segura (atóxica) hasta la dosis de 2000mg/kg.

II. *Estudios de toxicidad subaguda.* No se detectaron cambios significativos en peso corporal, consumo de alimentos, de agua y peso de los distintos órganos.

III. *Estudios de genotoxicidad in vitro.* Estos estudios se llevaron a cabo por el Dr. Javier Espinosa Aguirre, en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Ninguna de la dosis del compuesto probada tuvo efecto mutagénico.

IV. *Estudios de genotoxicidad in vivo.* Este estudio se iba a realizar por la Dra. Libia Vera del Departamento de Toxicología del CINVESTAV, IPN. No se pudo continuar al detectar la elevada inestabilidad cromosómica de cada paciente, así como la diversidad de medicamentos requeridos para controlar las manifestaciones clínicas adversas y que eran mutagénicos.

V. *Estudios de teratogenicidad.* Estos estudios se realizaron por el Dr. German Chamorro, Investigador responsable en el Laboratorio de Toxicología Preclínica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. No hubo toxicidad en las hembras mientras que en los productos no hubo malformaciones.

VI. *Estudios de carcinogenicidad.* Estos estudios se realizaron por el Dr. Saúl Villa Treviño, del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV del IPN. Los resultados muestran que el IFC-305 no induce cáncer, previene su desarrollo y si ya está lo revierte.

Los resultados de estos estudios preclínicos nos estimularon a continuar la investigación sobre posibles mecanismos de acción del compuesto IFC-305, tanto en la cirrosis como en CHC y cuyos resultados comentaremos más adelante.

Efecto hepatoprotector del IFC-305

Continuando los estudios del derivado de adenosina IFC-305 en la reversión y prevención de la fibrosis inducida por el tóxico CCl_4 mediante un análisis de microarreglos, que se llevó a cabo en un experimento en el que se demostraron los efectos descritos previamente: reversión de la cirrosis establecida al disminuir los niveles de colágena y aumentar la actividad de las colagenasas;

recuperando la función hepática al disminuir las transaminasas marcadoras de daño hepático y los niveles de bilirrubina y aumentar los niveles de albúmina.

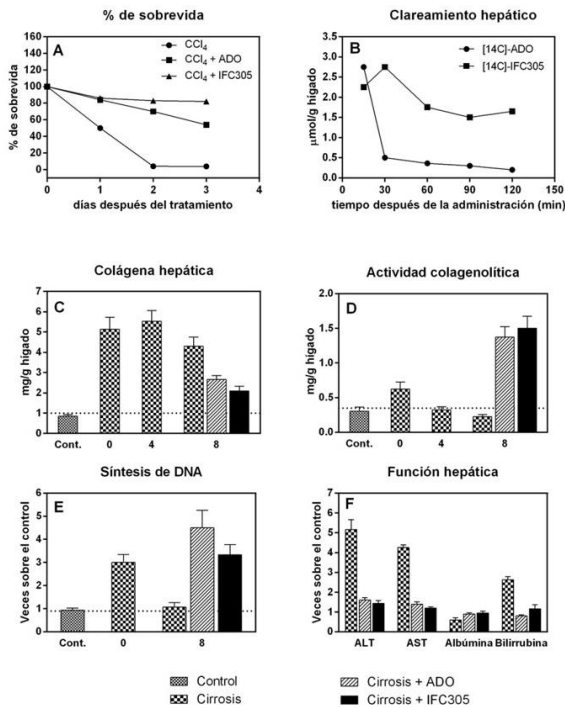


Figura 5. Efectos comparativos de la adenosina con el IFC-305. A) Efectos de la administración de adenosina comparada con la del IFC-305 en la mortalidad inducida con CCl₄. B) Curso temporal del aclaramiento hepático. C) y D) Efecto de la administración crónica de adenosina o de IFC-305 en el contenido de colágena y en la actividad de colagenasa en ratas cirróticas. E) Efecto de la adenosina y del IFC-305 en la capacidad proliferativa en hígados de ratas cirróticas. F) Función hepática.

Considerando el importante papel que tienen las CE en el desarrollo de la cirrosis, se evaluó el efecto del IFC-305 en la activación de estas células a través de la marca de α -actina de músculo liso detectadas por inmunohistoquímica y se observó una disminución del 50%, al compararlas con las ratas cirróticas tratadas con solución salina. Este efecto se comprobó con análisis morfológico de células teñidas con toluidina (que tiñe a las CE en estado quiescente) con abundantes gotas de grasa que disminuyen en la cirrosis y se recuperaron con el tratamiento de IFC-305 *in vivo* [32]. El análisis bioinformático de los microarreglos nos indica la expresión de 413 genes diferenciales en las muestras de cirrosis en relación a los controles y que tienden a normalizarse con el tratamiento de IFC-305 (Fig. 6). Algunos de estos genes eran profibrogénicos, inmunológicos y adipogénicos por lo que se investigó la expresión de algunos de ellos mediante la técnica de qRT-PCR usando el método SYBR Green. Se encontró que los

genes profibrogénicos Fn1, Col 1, TGF β 1 estaban sobreexpresados en cirrosis y al tratamiento con IFC-305 disminuía su expresión. Por el contrario, la alta expresión de Complemento C9 y de ApoA1 se reduce por la administración del compuesto. El gen adipogénico PPAR γ regulador de la adipogénesis de los fibroblastos, disminuido en cirrosis, aumenta su expresión tras la administración del compuesto, lo que apoya el papel de este receptor en la reversión de las células estelares a su estado quiescente.

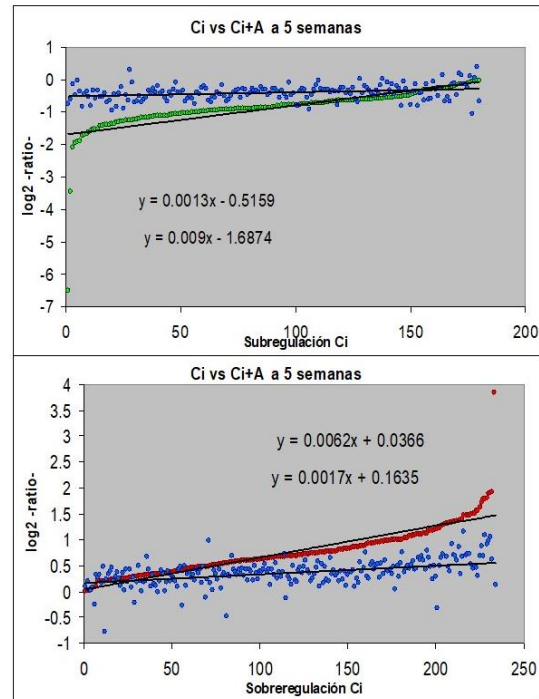


Figura 6. Efecto del tratamiento con IFC-305 sobre el perfil de expresión génica global en hígados cirróticos.

Este estudio reveló que tres genes participantes en el metabolismo de la ornitina y la urea, bajorregulados en cirrosis, normalizan su expresión: (ass1) sintetasa del ácido argininosuccínico y (cps1) carbamil fosfato sintetasa. Previamente, se comentó que en la cirrosis está inhibida la capacidad proliferativa la cual es un medio importante de reparación del parénquima hepático dañado por lo que se investigó si el IFC-305 tiene la capacidad de reparar el potencial proliferativo del hígado cirrótico. Se encontró que este compuesto promueve la reparación del DNA dañado a través del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y de p53, así como un aumento de la energía y la preservación de la función mitocondrial [33]. Otro aspecto que era interesante fue conocer el mecanismo de preservación de la quiescencia de las CE, evitando su diferenciación a miofibroblastos. Para investigarlo se usaron CE en

cultivo primario las cuales sufren una activación espontánea y diferenciación a miofibroblastos, proceso que no se observa en presencia del IFC-305 al inhibir la expresión del RNAm de la colágena y favorecer la expresión de 3 genes antifibrogénicos tales como MMP-13, SDMAD 7 y PPAR γ . Paralelamente, se encontró que este compuesto también reprime la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que induce proliferación de las CE [34]. Estos resultados nos llevaron a investigar los mecanismos genéticos de reparación de la expresión genética inducidos por el IFC-305.

Efecto epigenético del IFC-305

Con base en los antecedentes señalados (inestabilidad cromosómica presente en la cirrosis, sugiriendo daño al DNA [35], la recuperación parcial por el tratamiento con el derivado de adenosina), así como el efecto previamente descrito de la adenosina como regulador de las metilaciones dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), planteamos el estudio de proceso de metilaciones del DNA y de las histonas. Recientemente encontramos que el IFC-305 modula la expresión de HDAC3 por lo que también decidimos estudiar la acetilación de histonas a nivel epigenético, como posible mecanismo de la recuperación de la expresión genética normal y de la reversión de la cirrosis. Este proyecto se realizó con la colaboración del Dr. Félix Recillas Targa, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se utilizó el modelo de inducción de cirrosis con CCl $_4$ durante 10 semanas, se suspendió el tóxico y posteriormente se trató con IFC-305 ó solución salina por cinco semanas. Se observaron claramente los resultados de cirrosis previamente descritos y la participación de mecanismos epigenéticos evaluados mediante los niveles de: 1) SAM, 2) la metilación global del DNA (5mc), 5-hydroximetilcitosina (5hmc) y 3) acetilación de la histona H4 (H4ac). Considerando que los genes de Col1a1 y Pparg estaban desregulados en cirrosis y se normalizaron con el IFC-305, se estudió adicionalmente, 4) la marca de histona H4ac y H3K27me3 en el gen promotor de Pparg y 5) el estado de metilación de Col1a1 del gen promotor [36] (Fig. 7). Donde se encontró:

- 1) Que los niveles de SAM disminuyen en cirrosis y que el compuesto restablece los niveles fisiológicos.
- 2) Al evaluar la metilación global del DNA, se observó una disminución de metilación (5mC) y desmetilación (5hmc) del DNA los cuales fueron restaurados en presencia del

IFC-305. Al analizar estas muestras por ELISA se encontró un aumento al doble de la metilación global del DNA (Fig.7).

- 3) En el estudio de microarreglos [32] se encontró que la desacetilasa de histonas HDAC3 estaba sobreexpresada en cirrosis y que el tratamiento con IFC-305 por cinco semanas la regresaba a su nivel normal, sugiriendo que el compuesto también actuaba regulando la expresión de las histonas. Este resultado se validó midiendo la proteína HDAC3, encontrando que aumenta al doble en cirrosis y recupera su valor normal en presencia del compuesto. Se repitió el experimento con la proteína nuclear y el anticuerpo de la histona acetilada H4, encontrando que disminuye en cirrosis y recupera su valor normal en presencia del IFC-305, demostrando que el compuesto modula la metilación del DNA (5mc y 5hmc) y la acetilación de histonas, que también regulan epigenéticamente la expresión de los genes (Fig. 7).
- 4) La sobreexpresión del Pparg por IFC-305 está mediada por la generación de cromatina abierta en el promotor del gen al aumentar la acetilación de la histona H4. Se desarrollaron inmunoprecipitaciones de la cromatina (ChIP) observándose una disminución a la deposición de H4 acetilada en cirrosis mientras que en las ratas tratadas con IFC-305 la marca regresa a los niveles del control. Una vez analizada la marca de cromatina abierta, se realizó un CHIP contra H3K27me3, marca depositada por el complejo Polycomb y que está relacionada con cromatina compacta, al encontrarse una reducción de esta marca se comprueba que en el promotor de Pparg hay un contexto cromatínico abierto en las ratas cirróticas tratadas con IFC-305.
- 5) La represión del gen Col1a1 por IFC-305 está mediada por un aumento en la metilación del DNA en donde se inicia el sitio de transcripción. Estudios previos de Tsukamoto [37] demostraron que el Pparg suprime el área próxima del promotor de Col1a1 en las CE. Se encontró que en el primer exón del promotor del gen Col1a1, las islas CpG de las posiciones 1, 11 y 17 perdieron la metilación del DNA en cirrosis y al ser tratadas con el compuesto la

recuperan mostrando una correlación inversa con el estado de metilación del DNA.

En resumen, proponemos que los cambios en la expresión genética observados durante el tratamiento con el hepatoprotector IFC-305 se realizan por mecanismos epigenéticos como metilación de DNA, y acetilación de la histona H4 a nivel global y en

genes específicos como *Pparg* y *Coll1a1*. Estos hallazgos nos permiten proponer que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la cirrosis y que el derivado de adenosina tiene un papel importante en su prevención. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer la regulación de los otros genes alterados durante la cirrosis.

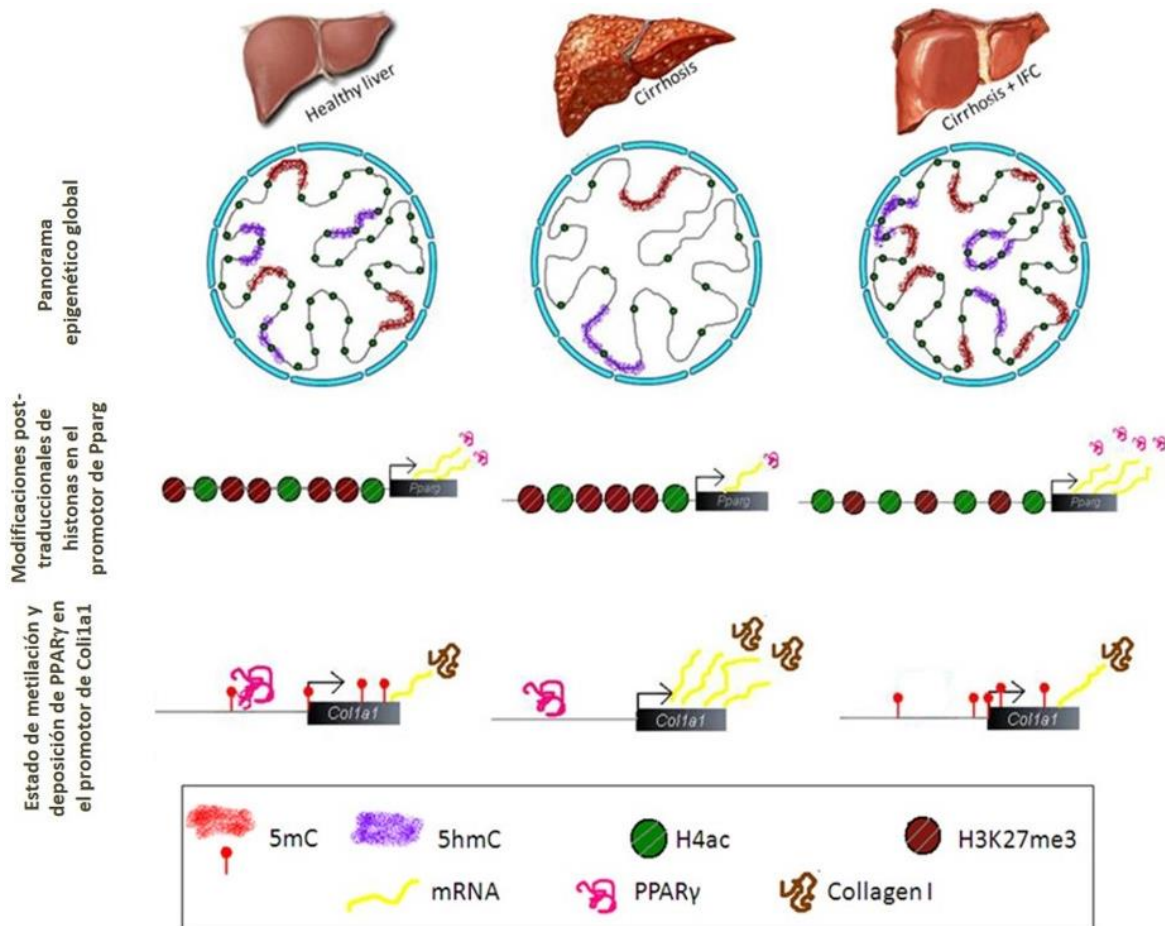


Figura 7. Representación esquemática de los efectos del hepatoprotector IFC-305 en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Panel superior: Cambios epigenéticos globales. Panel medio: Cambios en el promotor del gen *Pparg*. Panel inferior: Cambios en el promotor para *Coll1a1*. Figura modificada de Rodríguez-Aguilera et al. 2017.

Efecto modulador del IFC-305

En el primer estudio del transcriptoma [32] cerca de 30 genes inmunológicos se encontraron desregulados y se normalizaron con el tratamiento del derivado de adenosina por lo que se planteó la evaluación a nivel inmunológico del efecto del IFC-305 en la reversión de la cirrosis inducida por CCl₄ en ratas. Independientemente de la etiología, la cirrosis es precedida por fibrosis e inflamación y con elementos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las células de Kupffer (CK), macrófagos residentes del hígado, son los efectores iniciales del desarrollo

de la cirrosis [38]. Presentan diversos fenotipos de activación: a) M1, relacionado a procesos inflamatorios y b) M2, relacionado a procesos antiinflamatorios [39]. Ambos son regulados por señales extracelulares como la adenosina [40] y su activación se relaciona con la inflamación y la resolución de la inflamación [41, 42]. Las CK activadas regulan la activación de las CE asociadas al establecimiento de la cirrosis. Al realizar la caracterización inmunológica tanto molecular como celular en este modelo, se encontró que durante la cirrosis hay un aumento de las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ así como de la citocina

quimioatrayente y activadora de monocitos MCP-1, mientras que el tratamiento con IFC-305 disminuye los niveles de IL-1 β , IL6 y MCP-1 a niveles fisiológicos. La citocina anti-inflamatoria IL-10, disminuye en la cirrosis y con el tratamiento se recuperan los valores similares a los del hígado sano. La caracterización celular mostró que en cirrosis hay un aumento significativo de macrófagos proinflamatorios M1, así como una disminución del fenotipo anti-inflamatorio M2.

Mientras que tras la administración del IFC-305 a ratas cirróticas, disminuye la población de macrófagos M1 a niveles semejantes a los encontrados en el hígado sano y se incrementa la población M2. Estos resultados muestran que parte del mecanismo de acción del IFC-305 involucra un papel inmunomodulador favoreciendo un proceso anti-inflamatorio que permite la resolución de la cirrosis [43] (Fig 8A-F). Adicionalmente, se evaluaron otras dos citocinas inflamatorias TNF- α , IFN- γ que fueron significativamente elevadas en cirrosis y que disminuyeron al valor control con la administración de solución salina sin efecto adicional del derivado de adenosina.

Al evaluar los niveles de citocinas en suero se observó que el efecto inmunomodulador del IFC-305 se observa principalmente en el hígado. También se evaluó el efecto de esta sustancia en el equilibrio entre las actividades de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y arginasa ya que hay una relación cercana entre la liberación de óxido nítrico (NO) y de las citocinas inflamatorias. Estos resultados concuerdan con el aumento de los niveles de NO en suero durante la cirrosis y su regreso a niveles normales a las 5 y 10 semanas de tratamiento con solución salina y con IFC-305. La arginasa es una enzima del ciclo de la urea que compete con iNOS, productora de NO en los procesos inflamatorios. La actividad de la arginasa aumenta con el tratamiento de IFC-305 sugiriendo que restituye la función del ciclo de la urea en cirrosis pero no en presencia de solución salina. La deficiencia de arginasa está relacionada con la activación de las CK hacia la formación de los M1 proinflamatorios. Los mecanismos regulatorios están mediados por niveles altos de IL-10 para mantener la homeostasis de la respuesta inmune después de un proceso inflamatorio. Como ha sido descrito por otros autores [40], la modulación de los macrófagos M1 y M2 puede ser regulada por los receptores de adenosina y cambios epigenéticos como la regulación de la cromatina y metilación de ADN [44], mecanismos en los cuales el IFC-305 también puede participar y debe estudiarse en más detalle. En conclusión, el efecto anticirrótico del IFC-305 está mediado por una respuesta inmunomoduladora a través de regular la inflamación.

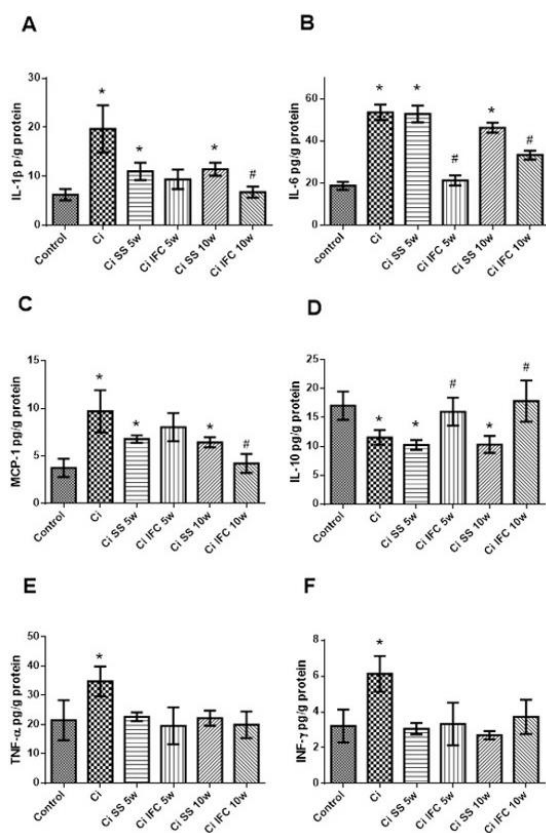


Figura 8. Contenido de citocinas en homogenados de hígado de ratas cirróticas tratadas con IFC-305. A) Niveles de IL-6, B) IL-1 β , C) MCP-1, D) IL-10, E) TNF- α , F) INF- γ . Figura tomada de Pérez-Cabeza de Vaca et al. 2017.

Efecto del IFC-305 en hepatocarcinoma

Estos estudios los iniciamos en un modelo secuencial de cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) descrito por Schiffer [45], al considerar que era una situación semejante a la observada en los pacientes en los que como mencionamos previamente: el 80% de los hepatocarcinomas se derivan de una cirrosis y, por otra parte, el conocimiento previo del efecto del IFC-305 en esta patología así como los resultados preclínicos de este compuesto en carcinogenicidad realizados por el Dr. Villa Treviño. El CHC se indujo en ratas tratadas con dietilnitrosamina (DEN) en donde el cáncer multinodular estaba precedido por cirrosis. Las ratas fueron tratadas con DEN (50 mg/kg) una vez por semana durante 12 semanas para inducir cirrosis, mientras que el otro grupo fue tratado durante 16 semanas para inducir el CHC, sacrificándolas a las 18 semanas para eliminar el tóxico. Un tercer grupo fue tratado con IFC-305 (50mg/kg) tres veces por

semana desde el inicio de la administración de DEN hasta las 12 semanas, y mientras que otro grupo recibió IFC-305 por 18 semanas y DEN por 16, y un último grupo tratado con DEN por 16 semanas recibió el IFC-305 de las 12 a 18 semanas. Los resultados fueron [46]:

1. *Efecto del IFC-305 en fibrogénesis:* las ratas tratadas con DEN tuvieron un aumento en la expresión de (Col1a1) mRNA, mientras que los animales tratados simultáneamente con el derivado a las 12 y 18 semanas mostraron una expresión reducida de Col1a1 mRNA, no así el grupo que recibió el tratamiento de las 12 a las 18 semanas, sugiriendo que el derivado de adenosina solo disminuye la fibrogenesis si se administra desde el inicio de la administración de DEN.
2. *Efecto del IFC-305 en lesiones preneoplásicas.* Estas lesiones se evaluaron por la expresión de dos enzimas del metabolismo del glutatión y del estrés oxidante comúnmente usadas como marcadores tumorales en carcinogénesis hepática: gamaglutamil transpeptidasa (GGT) y glutatión-S-transferasa (GSTP). El aumento del área de GGT en cirrosis aumentó 5% y en CHC 38% mientras que la administración del compuesto indujo una disminución significativa en cirrosis, CHC de 12-18 semanas. La mayor expresión de GSTP corresponde al grupo de DEN 18 semanas y aunque la administración del derivado muestra tendencia a disminuir, la diferencia no es significativa. Los resultados obtenidos con GGT sugieren un efecto quimiopreventivo del IFC-305 en la carcinogénesis química (Fig. 9).
3. *Efecto del IFC-305 en apoptosis.* Para determinar si la disminución del área tumoral se debía a una inducción de apoptosis, se evaluó el número de hepatocitos apoptóticos por la técnica de TUNEL, y se encontró que los grupos tratados con DEN tenían un mayor número de hepatocitos apoptóticos en comparación al control, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los grupos tratados con IFC-305. Para comprobar estos resultados se evaluó la presencia de proteínas apoptóticas mediante Western blot en los homogenados (caspasa 3 y PARP) y se encontraron disminuidas por el IFC-305, comprobando que la apoptosis no participa en disminuir el área tumoral.
4. *Efecto del IFC-305 en la proliferación inducida por DEN.* La proliferación se evaluó analizando la inmunotinción de PCNA en los hepatocitos, encontrando que en las áreas GSTP-positivas del grupo 18-DEN aumentó en el número de hepatocitos con núcleos PCNA positivos marcando células proliferantes que en presencia de IFC-305 se reducen significativamente. Se midió la expresión total en el homogenado de hígado para evaluar todas las células y se observó una disminución importante en presencia del compuesto. Esto fue comprobado al medir la expresión de la timidilatosintasa (TymS) enzima necesaria para la síntesis de DNA que se encuentra disminuida en presencia del IFC-305, mostrándonos que la disminución del proceso tumoral se debe a un efecto antiproliferativo del compuesto en las células tumorales.
5. *Efecto del IFC-305 en la vía HGF/c-Met.* Para entender qué camino participaba en este efecto antiproliferativo, se estudió la expresión del factor de crecimiento hepático (HGF) el cual es el principal mitógeno hepático y que juega un importante papel en la carcinogénesis hepática y de su receptor c-Met. El grupo 18-DEN tiene la más alta expresión del RNAm de HGF mientras que es significativamente reducida por el IFC-305. La expresión de c-Met aumenta en los grupos de DEN significativamente y disminuye en presencia del compuesto indicándonos que la inhibición de la ruta HGF/c-Met es importante para la tumorigénesis hepática.
6. *Efecto del IFC-305 en las proteínas del ciclo celular.* Para profundizar en el efecto antiproliferativo del compuesto se estudió la expresión de las proteínas del ciclo celular. La Ciclina D1 y E2F1 aumentan importantemente con DEN, la primera no se afecta por el compuesto, pero la segunda disminuye significativamente, la Ciclina A disminuye significativamente con DEN. El cambio más importante en la expresión inducida por IFC-305 en los grupos tratados con DEN fue el aumento significativo del inhibidor del ciclo p27, mientras que la proteína p21 aumenta en los grupos tratados con DEN pero no se modifica por el compuesto. Se evaluaron otras proteínas relacionadas con el ciclo celular como la oncoproteína gankirina que aumenta con DEN y disminuye con el compuesto y la Mdm2 que aumenta en presencia de DEN, el efecto de estas proteínas en el grupo 18-DEN se acompaña de una disminución significativa de la expresión de p53. Este efecto no se observa en presencia del IFC-305 en que su expresión es igual a la del grupo control. Los efectos más importantes del compuesto en este modelo de CHC son el aumento en la expresión de p27 y la recuperación

de los niveles de p53 disminuidos por DEN. Estos efectos asociados a la supresión de la vía HGF/c-Met y la reducción en Tyms apoyan el efecto antiproliferativo del compuesto.

7. *Efecto del IFC-305 en la expresión de los receptores de adenosina.* Los receptores de adenosina A2a y A3 han sido muy implicados en cirrosis y en cáncer de hígado por lo que era muy importante conocer la situación de los mismos en presencia del derivado de adenosina IFC-305. En el hígado control no se observa el receptor A2a, mientras que en el grupo de 12DEN hay una presencia fuerte de los receptores que disminuyen en presencia del IFC-305 y en el grupo de 18-DEN se expresa marcadamente este receptor en los hepatocitos tumorales y su expresión se reduce en presencia del compuesto. En el caso del receptor A3 se observa claramente en las células endoteliales y en los septos fibrosos y disminuyen en presencia del compuesto. En las regiones tumorales del grupo 18-DEN se hacen evidentes los receptores A3 y disminuyen con el tratamiento.

Estudios previos demostraron que el IFC-305 previene y revierte la cirrosis experimental inducida con CCl₄ mientras que los estudios preclínicos de carcinogenicidad sugirieron la posibilidad de que tuviera también un efecto anticarcinogénico. Para explorar esta posibilidad se estudió en un modelo secuencial de cirrosis-hepatocarcinoma, que es como normalmente se presenta en los pacientes. El efecto antifibrótico del compuesto en este modelo no fue tan evidente, posiblemente porque el inductor DEN es más tóxico y sus mecanismos son diferentes. En relación con la carcinogénesis su efecto fue más claro al disminuir el número de nódulos de CHC. Este efecto se puede explicar a través de la disminución de la proliferación estimulada por DEN, y que este efecto se asocia con cambios en la expresión de Tyms, HGF, c-Met y del inhibidor del ciclo celular p27. Tyms es un blanco terapéutico para el cáncer hepático de drogas como el 5-Fluorouracilo, también es blanco del factor de transcripción E2F1 [47]. El HGF/c-Met está asociado con CHC y promueve la transición epitelio-mesénquima importante para las metástasis tumorales, al estar inhibida en este estudio previene estos efectos. La pérdida de control del ciclo celular es muy importante en CHC, el efecto del IFC-305 aumentando la expresión de p27 inhibe el ciclo celular uniéndose a la Cyclina E-Cdk2 durante la transición G1-S [48] recientemente se ha considerado a p27 como blanco en distintos cánceres humanos. El papel de los receptores de adenosina en cáncer es controversial, y el efecto del IFC-305

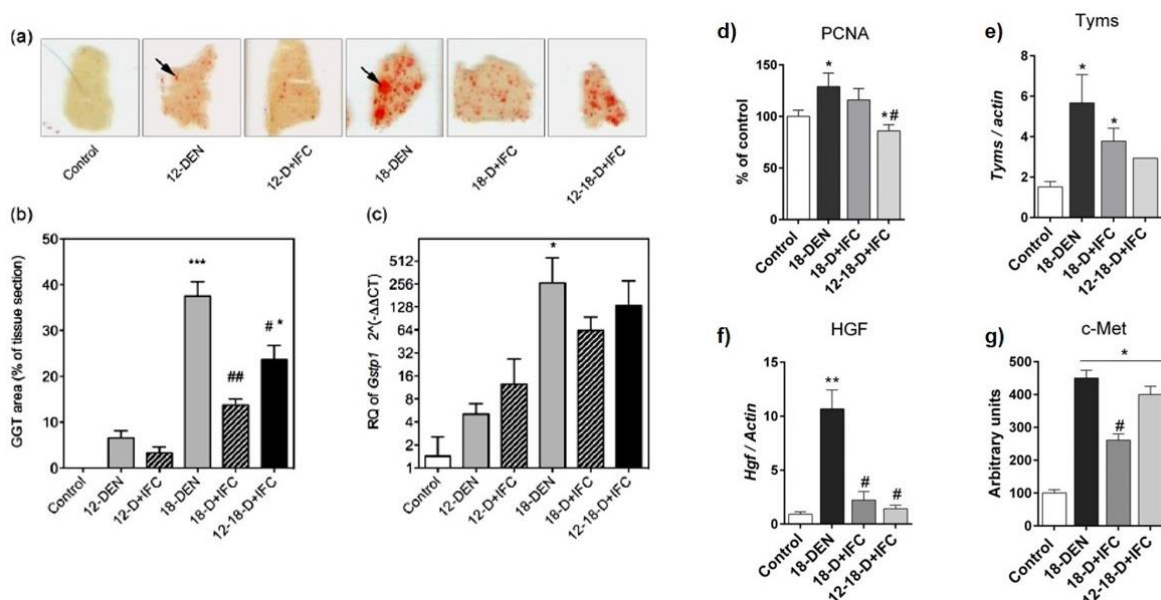
disminuye su expresión. La reducción del receptor A2a puede aumentar el transporte de la adenosina y aumentar sus efectos metabólicos entre los que se encuentra la biosíntesis de SAM, un conocido anticarcinógeno. Los mecanismos moleculares por los que disminuye HGF, Timps o aumento de p27 requieren estudios subsecuentes. Los estudios presentados sugieren que este compuesto tiene un potencial terapéutico como agente quimioprotector contra el CHC.

Efecto protector del IFC-305 de los cambios en función, metabolismo y dinámica mitocondrial en un modelo de cirrosis-carcinoma hepatocelular

Las mitocondrias son organelos responsables del metabolismo energético en las células eucariotas, generan ATP a través de la fosforilación oxidativa, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), dona electrones a la cadena transportadora de electrones (CTE), formada por cinco complejos (I-V), el NADH entra al complejo I y genera NAD⁺, y el complejo V forma el ATP. La mitocondria regula el estado energético, estado redox y el metabolismo de las células pudiendo generar los intermediarios epigenéticos convirtiéndose en el blanco terapéutico principal de diversas enfermedades incluyendo el cáncer [49]. En enfermedades hepáticas como la cirrosis se ha demostrado deficiencia energética [50, 51], Otto Warburg sugirió que las mitocondrias de las células tumorales abastecen la demanda energética a través del flujo glucolítico por falta de oxígeno o alteraciones genéticas-epigenéticas que afectan el metabolismo oxidante [52]. Las alteraciones metabólicas pueden disminuir los niveles de acetyl-CoA que también tiene un papel importante como modulador de la expresión genética [53, 54]. El estrés oxidante disminuye el flujo metabólico incluyendo las enzimas del CAT como la deshidrogenasa isocítrica (DIC), deshidrogenasa málica (DHM). Se han identificado mutaciones de la DIC que generan oncometabolitos en algunos tumores [55]. La relación NAD/NADH refleja el estado redox y es regulado por CTE. Previamente nuestro grupo demostró la habilidad de la adenosina de mantener el estado energético y el estado redox de la célula [19, 56]. La sirtuina-1 (Sirt-1) depende de NAD⁺ y es miembro de las desacetilasas de histonas III y actúa sobre PGC-1 α , las cuales están sobreexpresadas en CHC y están relacionada con la acumulación de mitocondrias defectuosas [49, 57]. Otra enzima dependiente de NAD⁺ es la PARP, poli ADP ribosa que modula la transcripción y reparación del DNA y la cual tiene aumentada su actividad en cáncer [58]. La mitocondria no es un organelo estático, su dinamismo depende de dos procesos

fusión y fisión de los cuales depende su forma. La fusión requiere polarización de la membrana mitocondrial y las mitofusina 1 y 2 (MFN 1, 2) promoviendo la formación de las crestas mitocondriales y fosforilación oxidativa. La fisión

mitocondrial se origina por diversos tipos de estrés y requiere la participación de la dinamina (DRP1), y la depolarización de la membrana; las mitocondrias que la presentan son candidatas a autofagia.



En general, las mitocondrias de las células tumorales presentan deficiencia de estos dos procesos. El esquema experimental comprende 5 grupos, el control tratado con salina por 16 semanas, el de CHC tratado con DEN 50mg/kg por vía intraperitoneal y solución salina una vez por semana o IFC-305 (50mg/kg), tres veces por semana, por 16 semanas y dos de desintoxicación. El grupo de progresión de cáncer (CP) recibieron DEN (50 mg/Kg de peso) una vez por semana durante 16 semanas y después recibieron salina o IFC-305 (50mg/Kg), tres veces por semana durante seis semanas. Los animales se sacrificaron con una dosis letal de pentobarbital sódico [59] (Fig. 10):

1. *Evaluación de la función mitocondrial.* a) El cociente respiratorio se evaluó midiendo el consumo de oxígeno con glutamato como sustrato en ausencia de ADP (estado 4) y en presencia de ADP (estado 3) resultando una disminución importante en el grupo de CHC que se recuperó parcialmente con el IFC-305 y en el grupo CP fue menor la disminución y la recuperación muy casi completa; b) este efecto se reflejó en la síntesis de ATP en el que se observa una importante

recuperación con el IFC-305 en el grupo de CHC y en el CP. c) Se midió la actividad del complejo I en el que se observa una reducción significativa en CHC y en CP con una reversión al valor control en el grupo CP+IFC-305. d) El potencial de membrana es un indicador importante de la función mitocondrial encontrándose disminuciones importantes en el CHC y CP grupos observándose una tendencia a la recuperación en los grupos tratados con IFC-305. e) Se evaluó el complejo V, se aisló el complejo F1F0 en la semana 22 y se evaluó la hidrólisis de ATP, su actividad es menor que en los controles y el IFC-305 recupera su actividad que llega a ser mayor que en los controles. Se sabe que la forma activa del complejo es dimérica, y no se observa en presencia de DEN ni en el grupo CP, pero sí se observa en el grupo CP con IFC-305. Estos resultados nos permiten evidenciar su efecto benéfico, la función mitocondrial se daña en el grupo de CHC y de CP, en el que no es suficiente suprimir el tóxico para recuperar la función mitocondrial por lo que es importante la administración del IFC-305 para mantener la integridad funcional de la mitocondria.

2. *Evaluación del metabolismo mitocondrial.* a) Actividad del intercambiador malato-aspartato, este es el mecanismo de entrada del NAD^+ a la mitocondria, su actividad se ve disminuida en CHC y en el grupo CP, los animales tratados con IFC-305 inhibieron este efecto del DEN y normalizaron su actividad al nivel de los controles. b) El NAD^+/NADH de la mitocondria se calculó midiendo los niveles del ácido 3-hidroxiacetato y del acetoacetato, las mitocondrias de los grupos CHC y CP tuvieron una disminución muy marcada de esta relación redox, el grupo de CHC, y el CP en presencia del IFC-305 el grupo de CHC tuvo una pequeña protección y el CP+IFC-305 recupero el valor control. c) Se evaluaron las actividades de dos enzimas dependientes de NAD^+ que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la deshidrogenasa isocítrica (DIC) y la deshidrogenasa málica (DHM). La DIC disminuyó discretamente en CHC y CP y aumentaron ligeramente su actividad con el tratamiento de IFC-305, la DHM no se afectó en CHC y tuvo un pequeño aumento con el IFC-305 pero en el grupo CP disminuyó importantemente

y tuvo un pequeño aumento con el compuesto. La disminución de la actividad de estas enzimas sugiere un mal funcionamiento de CAT por la administración de DEN, detectándose una recuperación con el compuesto. d) Como se comentó previamente la disfunción mitocondrial en cáncer induce un aumento en el nivel de lactato, como una medida adaptativa, el grupo de CHC y CP aumentaron los niveles de lactato en el hígado el IFC-305 lo disminuyó significativamente sugiriendo adaptación metabólica en respuesta a la recuperación del metabolismo mitocondrial. e) Otro metabolito importante de la mitocondria es la acetil CoA, la administración de DEN no modificó sus niveles pero la presencia del IFC-305 aumentó significativamente los niveles de acetil CoA en los grupos de CHC y CP. Estudios previos demostraron la habilidad del compuesto de modular algunas modificaciones epigenéticas como la acetilación de histonas [36], por lo que se probó si es cofactor de la histonas acetiltransferasa en este modelo, demostrando que en CHC y CP se observa un aumento significativo de la histona H4 acetilada.

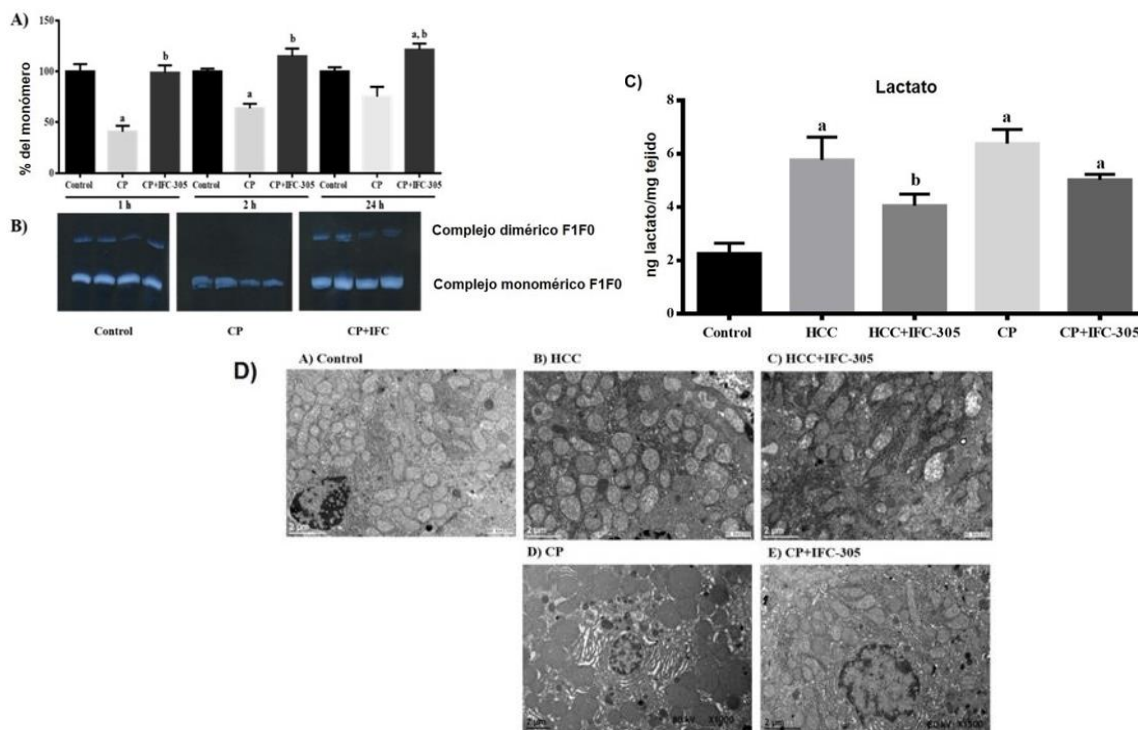


Figura 10. Evaluación de la función, metabolismo y dinámica mitocondrial. A) Cambios en la actividad de la ATPasa cuantificada a las 1, 2 y 24 h extractos mitocondriales con digitonina en geles nativos azules y B) determinación de la presencia de los complejos monomérico y dimérico de la subunidad F1F0 de la ATPasa a las 24 h. C) Determinación de los niveles de lactato hepático, como marcador de la adaptación metabólica. D) Cambios morfológicos evaluados a través de microscopía electrónica. Modificada de Chávez *et al.* 2017.

3. *Alteraciones de la dinámica mitocondrial inducidas por DEN.* Las interrelaciones entre mitocondria y núcleo son muy importantes en la regulación de la respuesta mitocondrial al estrés siendo PGC-1 α y Sirt-1 las proteínas nucleares que participan en este proceso. El tratamiento con DEN en CHC y en CP aumentan estas proteínas en el núcleo y disminuyen con el tratamiento con IFC-305, sugiriendo que hay una disminución del estrés mitocondrial inducido con DEN. El ciclo de fisión y fusión mitocondrial se puede evaluar a través del nivel de las proteínas participantes. DRP-1 es necesaria para la fisión en pequeños fragmentos de mitocondria que se induce en CHC y en CP y se previene por el hepatoprotector. La proteína MFN-2 tiene una tendencia a aumentar en CHC pero al sacar la relación DRP-1/MFN-2 aumenta mucho en el grupo CP reflejando un aumento importante de la fisión que no se observa en presencia del IFC-305. También se evaluó los niveles de Sirt-3, que es una desacetilasa dependiente de NAD⁺ y se observó una disminución en el grupo CP que aumentó a un nivel superior al control cuando se trató con IFC-305, posiblemente relacionado con el aumento en el redox mitocondrial. Las mejoras observadas en la función, metabolismo y

dinámica mitocondrial nos sugirieron estudiar cambios en la morfología mitocondrial por microscopía electrónica en la que se pudo observar las mitocondrias de los grupos controles alargadas, en los grupos CHC y CP las mitocondrias eran circulares y muy abundantes y en los grupos tratados con IFC-305 se recuperó la forma elongada y una disminución de mitocondrias llamó la atención que en este último grupo eran evidentes las crestas mitocondriales y se observaban una gran cantidad de ribosomas sugiriendo que la recuperación de la función mitocondrial es integral y que se refleja en el metabolismo, su función celular y fisiológica [59].

En los estudios iniciales con adenosina y en daño hepático agudo y crónico encontramos que el nucleósido reparaba el estado energético de la célula y el estado redox y no visualizamos en ese tiempo que esos cambios son fundamentales en diversas enfermedades, al correlacionar la recuperación mitocondrial con cambios genético y epigenéticos en el estudio de padecimientos más complejos como lo son el cáncer y la cirrosis.

Referencias

- Muriel, P. (2017) The Liver: General Aspects and Epidemiology. in *Liver Pathophysiology* (P., M. ed.), Academic Press, London, United Kingdom. pp 3-22
- Rescan, P. Y., Loreal, O., Hassell, J. R., Yamada, Y., Guillouzo, A., and Clement, B. (1993) *Am J Pathol* **142**, 199-208
- Rojkind, M., Rojkind, M. H., and Cordero-Hernandez, J. (1983) *Coll Relat Res* **3**, 335-347
- Chagoya, V. (1986) Interrelaciones metabólicas entre tejidos. Adaptación metabólica al ayuno y al ejercicio. in *Bioquímica* (Castillón, E. H. ed.), EMALSA, S.A., España. pp 1183-1194
- Gressner, A. M., and Bachem, M. G. (1995) *Digestion* **56**, 335-346
- Maher, J. J., and McGuire, R. F. (1990) *J Clin Invest* **86**, 1641-1648
- Van Eyken, P., Geerts, A., De Bleser, P., Lazou, J. M., Vrijssen, R., Scot, R., Wisse, E., and Desmet, V. J. (1992) *Hepatology* **15**, 909-916
- Wyler, D. J., Stadecker, M. J., Dinarello, C. A., and O'Dea, J. F. (1984) *J Immunol* **132**, 3142-3148
- Wyler, D. J., Wahl, S. M., and Wahl, L. M. (1978) *Science* **202**, 438-440
- Arthur, M. J. (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G245-249
- Uribe-Esquivel Misael, G.-S. d. S. M., Chávez-Tapia Norberto, Román-Sandoval José de Jesús. (2010) *Revista de Gastroenterología de México* **2**, 168-176
- Mendez-Sanchez, N., Villa, A. R., Chavez-Tapia, N. C., Ponciano-Rodriguez, G., Almeda-Valdes, P., Gonzalez, D., and Uribe, M. (2005) *Ann Hepatol* **4**, 52-55
- Calvin M. (1969) *Chem Br* **5**, 22-28
- Chagoya de Sanchez, V. (1995) *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 339-355
- Chagoya de Sanchez, V., Brunner, A., and Pina, E. (1972) *Biochem Biophys Res Commun* **46**, 1441-1445
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Sanchez, L., Vidrio, S., Yanez, L., and Suarez, J. (1991) *Int J Biochem* **23**, 1439-1443
- Chagoya de Sanchez, V., Brunner, A., Sanchez, M. E., Lopez, C., and Pina, E. (1974) *Arch Biochem Biophys* **160**, 145-150
- Chagoya de Sánchez V, Alvarez-Grau. P., Jiménez B, Villalobos-M R, Piña E. (1977) *Biochem Biophys Res Commun* **76**, 804-812
- Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., Garcia-Sainz, J. A., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1978) *Arch Biochem Biophys* **190**, 155-162
- Hohorst, H. J., Kreutz, F. H., Reim, M., and Huebener, H. J. (1961) *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 163-168
- Lautt, W. W., Legare, D. J., and d'Almeida, M. S. (1985) *Am J Physiol* **248**, H331-338
- Garcia-Sainz, J. A., Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., and de Sanchez, V. C. (1979) *Biochem Pharmacol* **28**, 1409-1413
- Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Diaz Munoz, M., Adolfo, J., Garcia-Sainz, J. A., and Chagoya de Sanchez, V. (1984) *Biochem Pharmacol* **33**, 2599-2604
- Recknagel, R. O., and Ghoshal, A. K. (1966) *Lab Invest* **15**, 132-148
- Recknagel, R. O. (1967) *Pharmacol Rev* **19**, 145-208
- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Yanez, L., Vidrio, S., and Diaz-Munoz, M. (1995) *J Biochem Toxicol* **10**, 41-50
- Friedman, S. L. (2008) *Toxicology* **254**, 120-129

28. Rojkind, M., and Perez-Tamayo, R. (1983) *Int Rev Connect Tissue Res* **10**, 333-393
29. Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Suarez, J., and Chagoya de Sanchez, V. (1990) *Hepatology* **12**, 242-248
30. Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., Suarez-Cuenca, J. A., Trejo-Solis, C., Lopez, V., Sanchez-Sevilla, L., Yanez, L., and De Sanchez, V. C. (2001) *Hepatology* **34**, 677-687
31. Chagoya de Sánchez V, H.-L. F., Díaz-Muñoz M, Hernández-Muñoz R. (2011) Role of the Energy State of Liver Cells in Cirrhosis Development and Treatment. in *Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis and Treatment*. (L., M. M. ed.), Nova Science Publisher. pp 31-59
32. Perez-Carreón, J. I., Martínez-Pérez, L., Loredo, M. L., Yanez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J. A., Hernández-Munoz, R., and de Sanchez, V. C. (2010) *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 287-296
33. Chagoya de Sanchez, V., Martínez-Pérez, L., Hernández-Munoz, R., and Velasco-Loyden, G. (2012) *Int J Hepatol* **2012**, 212530
34. Velasco-Loyden, G., Perez-Carreón, J. I., Agüero, J. F., Romero, P. C., Vidrio-Gómez, S., Martínez-Pérez, L., Yanez-Maldonado, L., Hernández-Munoz, R., Macías-Silva, M., and de Sanchez, V. C. (2010) *Biochem Pharmacol* **80**, 1690-1699
35. Michalopoulos, G. K. (1990) *FASEB J* **4**, 176-187
36. Rodríguez-Aguilera, J. R., Guerrero-Hernández, C., Pérez-Molina, R., Cadena-Del-Castillo, C. E., de Vaca, R. P., Guerrero-Celis, N., Domínguez-López, M., Murillo-de-Ozores, A. R., Arzate-Mejía, R., Recillas-Targa, F., and de Sanchez, V. C. (2018) *J Cell Biochem* **119**, 401-413
37. Yavrom, S., Chen, L., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R. A., and Tsukamoto, H. (2005) *J Biol Chem* **280**, 40650-40659
38. Muriel, P., and Escobar, Y. (2003) *J Appl Toxicol* **23**, 103-108
39. Wan, J., Benkdane, M., Teixeira-Clerc, F., Bonnafous, S., Louvet, A., Lafdil, F., Pecker, F., Tran, A., Gual, P., Mallat, A., Lotersztajn, S., and Pavoine, C. (2014) *Hepatology* **59**, 130-142
40. Hasko, G., and Cronstein, B. (2013) *Front Immunol* **4**, 85
41. Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., and Nagy, L. E. (2013) *Compr Physiol* **3**, 785-797
42. Ramachandran, P., and Iredale, J. P. (2012) *J Hepatol* **56**, 1417-1419
43. Pérez-Cabeza de Vaca R, Domínguez-López. M., Guerrero-Celis N, Rodríguez-Aguilera JR, Chagoya de Sánchez V. (2017) *Int Immunopharmacol* **54**, 12-23
44. Takeuchi, O., and Akira, S. (2011) *Eur J Immunol* **41**, 2490-2493
45. Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., and Rosmorduc, O. (2005) *Hepatology* **41**, 307-314
46. Velasco-Loyden, G., Perez-Martinez, L., Vidrio-Gomez, S., Perez-Carreón, J. I., and Chagoya de Sanchez, V. (2017) *Tumour Biol* **39**, 1010428317691190
47. Lam, S. K., Mak, J. C., Zheng, C. Y., Li, Y. Y., Kwong, Y. L., and Ho, J. C. (2014) *Int J Oncol* **44**, 2093-2102
48. Chu, I. M., Hengst, L., and Slingerland, J. M. (2008) *Nat Rev Cancer* **8**, 253-267
49. Boland, M. L., Chourasia, A. H., and Macleod, K. F. (2013) *Front Oncol* **3**, 292
50. Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Diaz-Munoz, M., Suarez, J., Lozano, J., and Chagoya de Sanchez, V. (1991) *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 500-503
51. Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., and Chagoya de Sanchez, V. (1994) *Biochim Biophys Acta* **1200**, 93-99
52. Wallace, D. C., and Fan, W. (2010) *Mitochondrion* **10**, 12-31
53. Yi, C. H., Pan, H., Seebacher, J., Jang, I. H., Hyberts, S. G., Heffron, G. J., Vander Heiden, M. G., Yang, R., Li, F., Locasale, J. W., Sharfi, H., Zhai, B., Rodriguez-Mias, R., Luithardt, H., Cantley, L. C., Daley, G. Q., Asara, J. M., Gygi, S. P., Wagner, G., Liu, C. F., and Yuan, J. (2011) *Cell* **146**, 607-620
54. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., and Kroemer, G. (2015) *Cell Metab* **21**, 805-821
55. Dang, L., Yen, K., and Attar, E. C. (2016) *Ann Oncol* **27**, 599-608
56. Hernandez-Munoz, R., Diaz-Munoz, M., and Chagoya de Sanchez, V. (1987) *Biochim Biophys Acta* **930**, 254-263
57. Chen J, Z. B., Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, Ng MH, Ho CY, Cheng SH, Lai PB, Yu J, Ng HK, Ling MT, Huang AL, Cai XF, Ko BC. (2012) *Cancer Res* **72**, 4138-4149
58. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) *Cell* **144**, 646-674
59. Chavez, E., Lozano-Rosas, M. G., Domínguez-López, M., Velasco-Loyden, G., Rodríguez-Aguilera, J. R., Jose-Nunez, C., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Chagoya de Sanchez, V. (2017) *J Pharmacol Exp Ther* **361**, 292-302



DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOZA HAZAS

Estudió la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo y el Doctorado en Bioquímica en Facultad de Química de la UNAM. Realizó estudios de posgrado en el Departamento de Química Fisiológica de la Universidad de Wisconsin E.U.A.

(1959) y en el Departamento de Microbiología de la Universidad de San Louis Missouri E.U.A. (1962-1963).

Es Investigadora Emérita en la UNAM (1996) y en el Sistema Nacional de Investigadores (2015) y Nivel D en el Programa de Estímulos de la UNAM.

Su amplia experiencia profesional la ha llevado a ocupar diversos cargos como son: Ayudante de Investigador División de Investigación Biológica de la Industria Nacional Químico Farmacéutica (1954-1957). Profesor Titular Definitivo de Bioquímica, Facultad de Medicina 1966. Profesor de Tiempo Completo Adjunto B Facultad de Medicina 1966-1971. Profesor de Tiempo Completo Titular B Facultad de Medicina 1972-1973. Investigador de Tiempo Completo C Instituto de Biología Experimental 1974-1979. Investigador de Tiempo Completo Titular C Instituto de Fisiología Celular

1984-1996. Investigadora Emérita 1996 a la fecha. Jefe del Departamento de Biología Celular 2001-2009.

Ha participado en la formación de recursos humanos a nivel licenciatura, Especialidad, Maestría, Doctorado y Podoctorado, así como Servicio Social.

Ha registrado 7 Patentes: 4 nacionales y 3 internacionales.

Sus líneas de investigación son: la Remodelación hepática, cirrosis y cáncer hepatocelular, así como la remodelación estructural

y funcional del corazón y los ritmos circádicos. A lo largo de su carrera ha sido distinguida con numerosas distinciones, entre las que destacan el Premio de la Academia Nacional de Medicina Dr. Eduardo Liceaga 1974, Premio Fundación Glaxo 1996, Premio Canifarma 1996, Premio Sor Juana Inés de la Cruz 2004, Premio de las Mujeres Mexicanas Inventoras e Innovadora 2007, Premio Julieta Fierro 2007, Reconocimiento 50 años en la UNAM, 2009, Medalla Omecihuatl, 2009, Premio PROFOPI Fomento al Patentamiento y la Innovación 2012, Presea Mujer del Tiempo 2015, Premio Canifarma 2015, Simposium Homenaje 50 años de Adenosina en México septiembre 2016, Estímulo Miguel Alemán 2016.
