



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFEECTO PROTECTOR DE LA SINCRONIZACIÓN POR ALIMENTO DURANTE
LA INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE HEPATOCARCINOMA EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

BIOL.CHRISTIAN MOLINA AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

TUTOR: CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

TUTOR: VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

JURIQUILLA, QUERÉTARO. Noviembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de neurobiología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Mauricio Díaz Muñoz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Neurobiología (No. de cuenta 512008169). Así mismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 409145). También se agradece el financiamiento de la Dirección General Asuntos del Personal Académico / Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN200815).

A los doctores Raúl Aguilar Roblero, Daniela Robles Espinoza, Ivette Caldelas Sánchez y Lorena Aguilar Arnal por su apoyo en el mejoramiento de la redacción del presente trabajo.

Agradezco también a la Dra. Olivia Vázquez Martínez, María de Jesús Guerrero Carrillo, Julieta Berenice Rivera Zavala, Fernando López-Barrera, María Lourdes Palma Tirado, Michael C. Jeziorski, Raúl Calderón Aguilera, Sandra Luz Hernández-Ojeda, Martín García Servín, Leonor Casanova, Osiel Ledesma Juárez, María de Lourdes Lara Ayala, Elsa Nydia Hernández Ríos, Erika Lizbeth Solorio García, Alejandra Guillén García, Norma Leticia Pescador Lona, Jorge Vázquez Carpizo and Jessica M. González Norris por su apoyo en la realización de técnicas y experimentos realizados para este estudio.

La ciencia está llena de oportunidades de reiniciar, de aprender y de mejorar, aunque te pone a prueba día a día y te lleva de la máxima frustración, a la incontenible alegría.

DEDICATORIAS

A mis padres Cristina Aguilar Hurtado y Juan Molina Ávila de quienes aprendí el poder de la perseverancia y el trabajo duro, de que la elección de lo que te gusta aunado a la constancia te lleva al éxito y satisfacción personal. Porque a través de sus sacrificios y paciencia logré comprender que siempre llegará lo que buscas y por lo que luchas. Porque no existió un día que no me brindaran su confianza y apoyo, especialmente en permitirme estudiar la carrera de Biología.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz que con el tiempo de conocernos me permitió ser amigo y después alumno. Por permitirme soñar y hacer realidad mis ideas y proyectos. A mi amiguilla la Dra. Olivia Vázquez que junto con el Dr. Mauricio me regresaron el amor a la ciencia y me mostraron la otra cara de la moneda. La gente normal enamora con flores y canciones y Oli me enamoró con una micro-pipeta.

Ya que el orden de los factores no altera el producto, quiero dedicar este esfuerzo a Julieta Berenice Rivera Zavala, la mujer que se convirtió en mi musa, en un pilar muy importante que me permitió continuar haciendo lo que me gusta. Porque sin su apoyo muchos de mis logros habrían sido diferentes. Porque cuando nos retroalimentamos temas de ciencia es la más aguerrida de las críticas, que incluso el reñir por la evolución del hombre durante tres horas es una intensa batalla. A Sophie Maureen Molina Rivera (mi hija) a la que le debo muchas horas de juego pero que siempre entendió que mi ausencia

era parte del esfuerzo que como familia estábamos realizando y que siempre con su beso y abrazo compartió su apoyo.

Juan Pablo, Cesar Rodrigo, Claudia Elizabeth, Mozerrat y primos, tías, tíos por todo su apoyo en los momentos difíciles y su alegría en los amenos.

A la familia Rivera Zavala por todo su apoyo incondicional.

A la familia Ledesma Juárez cuyo apoyo me permitió llegar a Querétaro siendo las primeras personas en brindarme su apoyo, en especial a Osiel y su esposa Alondra.

Un sincero agradecimiento a mis compañeros y amigos el INB que me permitieron aprender lo mejor que cada uno pudo brindarme (la vieja y la nueva escuela): Vania Carmona, Francisco Vázquez, Adrián Báez, Braulio Ayala, Dalia Luna, Moisés Pérez, Elvira Arrellanes, Dalia de Ita, Thania Castro, Erika Solorio, Fernando López, Irma Gonzales Luna, Sofía Martínez, Erandi Velázquez, Carolina Castañeda, Héctor Valente, Patricia Juárez y seguro me faltaron muchos pero mil gracias.

RESUMEN

El hepatocarcinoma (HCC) es el tumor primario hepático más frecuente y ocupa el cuarto lugar de causa de muerte por cáncer en nuestro país. Cerca del 90% de casos clínicos con HCC están vinculados con el desarrollo de cirrosis hepática, considerándose como el principal factor de riesgo (sin importar su etiología) para desarrollar HCC. Estudios epidemiológicos han demostrado que la alteración de los ritmos circadianos incrementa la incidencia y potencializa el desarrollo carcinogénico.

Los ritmos circadianos son oscilaciones ubicuas de parámetros biológicos con una duración de ~24 h y abarcan desde procesos conductuales y fisiológicos hasta la transcripción de genes. Se sabe que en el hígado ~20% del transcriptoma presenta ritmicidad circadiana reflejado en procesos celulares como el metabolismo, actividad desintoxicante, apoptosis, remodelación de cromatina, proliferación y la respuesta al estrés.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que el horario de restricción calórica (HRC) tiene sobre la ritmicidad circadiana del hígado y su repercusión en la progresión del HCC.

El desarrollo de cirrosis-HCC (replicando la secuencia clínica) se realizó usando un tratamiento crónico con Dietilnitrosamina (DEN) (50 mg/kg, i.p.). Se usaron ratas macho Wistar (180-220 g). Se contó con 4 grupos: Grupo AL, ratas con acceso al alimento *Ad-Libitum*; Grupo HRC, ratas con acceso restringido al alimento (acceso de 12:00 a 14:00 h). Grupo AL+DEN, ratas tratadas con DEN y alimentación *Ad-Libitum* (acceso las 24 h). Grupo HRC+DEN, ratas con DEN y con HRC. El tratamiento con DEN implica desarrollo de fibrosis hepática a las 8 semanas de tratamiento, a las 12 semanas una cirrosis bien establecida y a las 16 semanas el desarrollo de HCC con tumores bien definidos.

Las ratas que tuvieron HRC ingirieron menor cantidad de alimento (-30% en ratas sanas y -46% en las tratadas con DEN) implicando una restricción calórica (RC) sin malnutrición. El daño cirrótico provocado por el DEN mostró las características patológicas convencionales en el grupo AL+DEN. El grupo HRC+DEN, presentó

depósitos de colágena elevados; sin embargo, las pruebas de funcionamiento hepático y las características histológicas resultaron normales. De manera interesante, el protocolo de HRC evitó el establecimiento de inflamación crónica.

Fue notorio que en la evaluación histopatológica el HRC retrasó la transformación neoplásica de las masas tumorales de HCC, mientras que en el grupo con alimentación AL los tumores presentaron estadios más des-diferenciados. Estos resultados compaginan con los altos niveles del antígeno carcinoembrionario en sangre observados en el grupo AL+DEN, mientras que en el grupo HRC+DEN se detectaron niveles similares a los animales control.

El metabolismo y bioactivación del DEN dependiente del citocromo Cyp2e1 que disminuyó en las zonas cirróticas y tumorales de ambos grupos tratados con DEN comparados con sus grupos control sanos, pero sin presentarse cambios entre condiciones de alimentación. Estos resultados sugieren que los cambios (mencionados con anterioridad) en el grupo HRC+DEN en las zonas cirróticas y en el HCC no están relacionados con alteraciones en el metabolismo del DEN.

Por último se exploraron las “proteínas reloj”, las cuales son responsables de la sincronización circadiana de todas a las células del cuerpo. El HRC preservó la sincronización tanto en las zonas cirróticas como en las tumorales del grupo HRC+DEN, además de incrementar la expresión de la proteína-reloj BMAL1, que tiene actividad de supresor tumoral.

En conclusión, nuestros resultados experimentales muestran que el protocolo de HRC evitó la transformación neoplásica mediante un mecanismo que implicó la preservación de la sincronización circadiana del hígado.

APORTACIONES DEL PRESENTE TRABAJO

-Por un lado los protocolos que han estudiado la relación entre los procesos carcinogénicos y los ritmos circadianos, usan inoculación de masas tumorales o líneas celulares, en cambio nuestras muestras de masas tumorales tuvieron un proceso carcinogénico similar a la de los pacientes comenzando por fibrosis, seguido de cirrosis y HCC; esta fortaleza del tratamiento con DEN nos permite tener un mayor acercamiento a lo que en realidad sucede en los pacientes.

-De forma similar sucede con la cirrosis. Generalmente se estudia esta enfermedad como un inductor de HCC y produciéndose de forma rápida con dosis muy elevadas de CCl4 y/o DEN, lo que le quita el componente crónico a la enfermedad. Sin embargo, en nuestro estudio la inducción de cirrosis es gradual, por lo que tiene una ventaja sobre protocolos usados por otros grupos de investigación.

- Son escasos los estudios que ponen a prueba la sincronización por un horario de restricción calórica tanto para la cirrosis como el HCC, si bien el presente estudio no abarcó procesos y mecanismos, sí brinda una plataforma sólida para estudiar el efecto de la restricción calórica y/o la sincronización por alimento en ambas patologías.

- En los últimos años, la tendencia de la medicina es de disminuir las dosis y/o los efectos de los tratamientos contra el cáncer; en el presente estudio se genera un precedente del efecto parcialmente anticancerígeno del horario de restricción calórica. Sería posible evaluar un posible papel coadyuvante en el tratamiento del cáncer al combinarlo con tratamientos farmacológicos.

ABREVIATURAS

ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO
AFP	α-FETOPROTEÍNA
aHSC	CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS activadas
AL	AD LIBITUM
ALAT	ALANINO AMINO TRANSFERASA
AML	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA
AP	FOSFATASA ALCALINA
ARNm	ÁCIDO RIBONUCLEICO mensajero
ASAT	ASPARTATO AMINOTRANSFERASA
BMAL1	BRAIN AND MUSCLE ARNT-LIKE PROTEIN 1
CaCu	CÁNCER CERVICOUTERINO
CCG	CLOCK-CONTROLLED GENES
CDK5	CINASA DEPENDIENTE DE CICLINA
CEA	ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO
CRY1	CRYPTOCROME 1
CRY2	CRYPTOCROME 2
CYP450	CITOCROMO P450
DC	DIENOS CONJUGADOS
DEN	DIETILNITROSAMINA
EGF	FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL
EGFR	RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO
ERO's	ESPECIES REACTIVAS DE OXÓGENO
GGT	γ-GLUTAMILTRANSFERASA
H&E	HEMATOXILINA & EOSINA
HCC	HEPATOCARCINOMA, CÁNCER HEPATOCELULAR
HCM	HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA
HK2	HEXOKINASA 2
HNF-1α	FACTOR NUCLEAR HEPÁTICO-1α
HRA	HORARIO DE RESTRICCIÓN AL ALIMENTO

HRC	HORARIO DE RESTRICCIÓN CALÓRICA
HSC	CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS
INEGI	INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA
LCS	CÉLULAS TRONCALES LEUCÉMICAS
LNH	LINFOMAS NO HODGKIN
MEC	MATRÍZ EXTRACELLULAR
NAFLD	HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO
NSQ	NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO
OSA	OSCILADOR SINCRONIZADO POR ALIMENTO
OSL	OSCILADOR SINCRONIZADO POR LUZ
PAR bZIP	PAR-DOMAIN BASIC LEUCINE ZIPPER
PBS	BUFFER SALINO DE FOSFATOS
PCNA	ANTÍGENO NUCLEAR DE CÉLULASS EN PROLIFERACIÓN
PDGF	FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS
PER1	PERIOD 1
PER2	PERIOD 2
RB	RETINOBLASTOMA
RC	RESTRICCIÓN CALÓRICA
RER	RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO
RM	RELOJ MOLECULAR
RT-qPCR	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, EN TIEMPO REAL
TBARs	ESPECIES REACTIVAS DE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
TGF-α	FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE α
TGF-β	FACTOR DE CRECIMIENTO TUMORAL β
TGFβ1	FACTOR DE CRECIMEINTO TRANSFORMANTE β1
TRH	TRÁCTO RETINOHIPOTALÁMICO

Contenido

1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Los ritmos circadianos	4
1.1.1 Oscilador sincronizado por luz.....	5
1.1.2 Reloj molecular.....	6
1.3 Oscilador sincronizado por alimento	8
1.4 Efectos del horario de restricción calórica.....	9
1.5 Alteración de los ritmos circadianos y el cáncer.....	11
1.6 Cáncer	13
1.6.1 Marcas distintivas del cáncer (Hallmarks por sus siglas en inglés) ..	13
1.6.2 Epidemiología.....	15
1.7 Hígado	18
1.7.1 Estructura del hígado	18
1.7.2 Funciones del hígado	19
1.7.3 Progresión de fibrosis a cirrosis	20
1.7.4 Cirrosis.....	22
1.7.5 Hepatocarcinoma.....	23
1.8 Protocolo de inducción de fibrosis, cirrosis y HCC por tratamiento con DEN. 25	
1.9 Ritmicidad circadiana de los CYP450	26
1.10 Relación entre el reloj molecular y el cáncer	27
2 ANTECEDENTES.....	30
3 HIPÓTESIS.....	32
4 OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivos particulares	33
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 Animales	34
5.2 Diseño experimental	34
5.3 Tratamiento con Dietilnitrosamina (DEN).	35
5.4 Somatometría e ingesta de alimento	35
5.5 Pruebas sanguíneas	35

5.6 Evaluación macroscópica.....	36
5.6.1 Evaluación macroscópica de la cirrosis y HCC	36
5.7 Evaluación histológica	39
5.7.1 Histopatología.....	39
5.8 Metabolismo del DEN	41
5.8.1 Análisis del RT-qPCR	41
5.8.2 Lipoperoxidación.....	41
5.9 Western blot	41
5.10 Imágenes	42
5.11 Estadística	43
6 RESULTADOS.....	44
6.1 Somatometría.....	44
6.1.1 Influencia del HRC en la ganancia de peso en ratas sanas	44
6.1.2 El tratamiento con DEN promueve una reducción de peso	44
6.1.3 El HRC protege parcialmente la hepatomegalia	44
6.2 Química sanguínea y prueba de funcionamiento hepático	46
6.2.1 El HRC preserva normales los niveles en sangre	46
6.2.2 El DEN promueve un estado de cirrosis compensado	46
6.2.3 El grupo HRC+DEN muestra mayores niveles de hiperbilirrubinemia	47
6.2.4 El HRC protege del estado inflamatorio crónico.....	48
6.3 Evaluación del estado cirrótico.....	49
6.3.1 El grupo HRC presentó mayor alteración fibrótica a nivel macroscópico.....	49
6.3.2 La evaluación histológica muestra incremento en los depósitos de colágena en el grupo HRC+DEN.....	49
6.4 Evaluación del desarrollo de HCC.....	52
6.4.1 Marcadores séricos de HCC.....	52
6.4.2 Evaluación macroscópica del HCC	52
6.5 Evaluación histopatológica.....	55
6.5.1 Áreas cirróticas.....	55
6.5.2 Tumores de HCC	55
6.5.3 Hemangiomas cavernosos.....	58

6.6 Evaluación por microscopía electrónica	58
6.6.1 Microscopía electrónica de áreas cirróticas	59
6.6.2 Microscopía electrónica en tumores de HCC.....	59
6.7 Bio-activación del DEN y reacciones pro-oxidantes	60
6.7.1 Bioactivación del DEN.....	61
6.7.2 Reacciones pro-oxidantes	61
6.8 Reloj molecular	63
6.8.1 Proteína CLOCK	64
6.8.2 Proteína PER1	64
6.8.3 Proteína BMAL1	64
6.9 Resumen de resultados obtenidos	66
7 DISCUSIÓN.....	67
7.1 HRC como sincronizador	67
7.2 El HRC previene la progresión de la fibrosis	69
7.3 Efecto anti-inflamatorio del HRC.....	69
7.4 El HRC preservó las características histopatológicas en hígado y evitó su transformación neoplásica.....	71
7.5 Estado nutricional	71
7.6 Metabolismo del DEN	73
7.7 Regulación circadiana como represor de la transformación neoplásica.....	74
7.8 Extensión del presente estudio a otros organismos	75
7.8.1 Efectos de la alteración de los ritmos circadianos en la inducción y desarrollo del cáncer en humanos	76
7.8.2 Efectos de la sincronización por alimento en humanos	77
8 CONCLUSIONES.....	79
9 PERSPECTIVAS	80
10 REFERENCIAS	81
11 ARTÍCULO PUBLICADO EN FORMATO OFICIAL	91

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Los ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son oscilaciones periódicas de variables biológicas con una duración cercana a las 24 h; estos, surgieron evolutivamente como una forma de anticiparse y responder a estímulos del medio ambiente (1). Algunos ejemplos son: periodos de descanso y actividad, la temperatura corporal, la presión arterial, el gasto cardiaco, el consumo de oxígeno, el equilibrio de los fluidos, la secreción de glándulas endocrinas, transcripción génica e incluso la duración del ciclo celular (2).

Dependiendo del tejido, la técnica usada y los horarios de toma de muestras se ha evidenciado que del 4-25% del genoma humano presenta oscilación circadiana (3). En roedores, los órganos que presentan mayor cantidad de genes con expresión circadiana son el hígado, riñón, pulmones, tejido adiposo, glándulas adrenales, corazón, algunas áreas cerebrales, entre otros (4).

Los ritmos circadianos pueden sincronizarse por diferentes estímulos del medio ambiente como los periodos de luz/oscuridad, los horarios de alimentación, el ejercicio, la temperatura, entre otros (5). Existen osciladores biológicos en los seres vivos que les permiten sincronizarse a estos cambios diurnos del medio ambiente y mantener la homeostasis. En mamíferos los osciladores más estudiados son: El oscilador sincronizado por luz (OSL) y el oscilador sincronizado por alimento (OSA).

Se ha evidenciado que la alteración de ritmos circadianos puede inducir y/o favorecer el desarrollo de diversas patologías cerebrales (6), metabólicas (7,8) e incluso el cáncer (9–12). De aquí la importancia de conocer mejor los efectos de la alteración y los mecanismos de regulación circadiana.

1.1.1 Oscilador sincronizado por luz

En mamíferos el sistema de sincronización por periodos de luz/oscuridad consta de una estructura hipotalámica conocida como núcleo supraquiasmático (NSQ) o “reloj central” y osciladores periféricos que se encuentran en la mayoría de los órganos como el corazón, páncreas, hígado y tejido adiposo (13) que son sincronizados por el NSQ a través de señalización humoral y neuronal (**Fig. 1**) (5,14,15).

El NSQ está constituido de ~20 000 neuronas y es sincronizado por estímulos luminosos a través del tracto retino-hipotalámico (TRH) (16). Las células ganglionares en la retina traducen la señal lumínica en estímulo neuronal incrementando la síntesis de melanopsina, este estímulo viaja a través del TRH (que tiene enervación directa al NSQ) para sincronizar al NSQ al estímulo lumínico (5,14,17) (**Fig. 1**).

El NSQ es considerado “reloj central” o “reloj maestro” por su capacidad de medir el tiempo de forma auto-sostenida, ya que en condiciones de oscuridad constante sigue oscilando, e incluso sus neuronas mantienen el ritmo de 24h por algunos días en condiciones *in vitro* hasta por 9 días (2). Cuando el NSQ es lesionado en roedores, se pierde la ritmicidad circadiana de la actividad locomotriz, también a nivel fisiológico y las funciones endócrinas (18).

Otra evidencia de que el NSQ es autosostenido, es que la implantación de tejido del NSQ fetal o de roedores adultos en animales arrítmicos por una lesión del NSQ, induce la recuperación de los patrones rítmicos de actividad locomotriz, aunque no se recupera al 100% la función del NSQ (19,20).

A nivel celular la capacidad de medir el tiempo y sincronizarse a diferentes estímulos, es a través de una maquinaria a nivel molecular basada en la transcripción/traducción de una serie de genes y sus proteínas conocida como reloj molecular (RM).

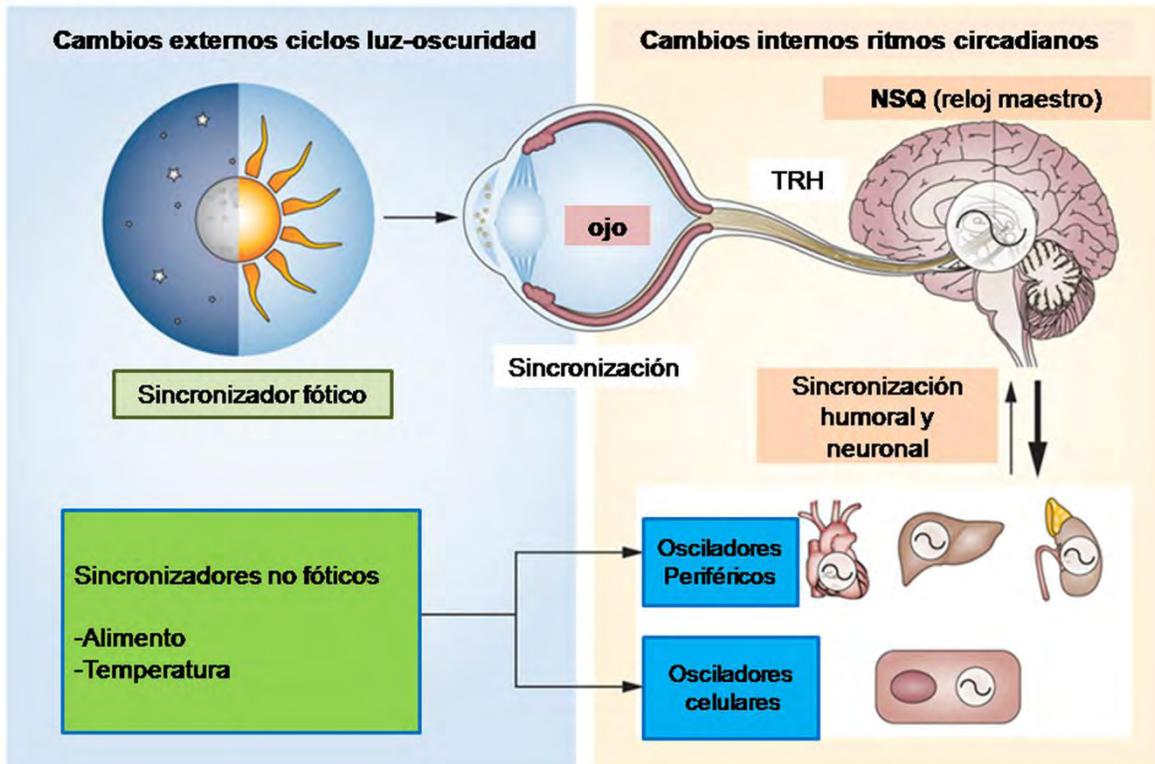


Figura 1: Sincronización circadiana en mamíferos. Los periodos de luz/oscuridad (cuadro azul) dan sincronizan al NSQ, que a su vez sincroniza los órganos periféricos, incluso a nivel celular. Existen estímulos no-fóticos como el alimento y la temperatura que sincronizan a los órganos periféricos y en algunas ocasiones pueden retroalimentar al NSQ y cambiar su fase. Modificado de Buttgeriet, F. y col., (2015) (21). Tracto retinohipotalámico (TRH).

1.1.2 Reloj molecular

El RM que existe en la mayoría de las células de nuestro organismo, está conformada principalmente por los genes reloj: *brain and muscle arnt-like protein1* (*Bmal1*), *clock*, *period 1* (*Per1*), *period 2* (*Per2*), *cryptochrome 1* (*Cry1*) y *cryptochrome 2* (*Cry2*) y sus proteínas correspondientes. Su transcripción genera dos asas de retroalimentación (una positiva y una negativa) con un periodo cercano a las 24 h. La inducción de la expresión de los componentes de la familia *Per* y *Cry* que forman el asa de transcripción negativa, son activados por la heterodimerización de los factores de transcripción *BMAL1* y *CLOCK* que forman el asa de transcripción positiva (16,22–24) (**Fig. 2**).

La regulación transcripcional de los genes reloj se basa en una región promotora conocida como caja E (25). El heterodímero BMAL1-CLOCK (asa de transcripción positiva) es desplazado de la caja E al heterodímero PER-CRY (asa de transcripción negativa) deteniendo así su propia transcripción. Ambas asas se presentan en anti-fase (una en el día y otra en la noche) y esta relación es la que da el periodo cercano a 24h en la transcripción tanto de genes reloj como de genes regulados por el RM (CCG por sus siglas en inglés “circadian clock-genes”) (Fig. 2) (26).

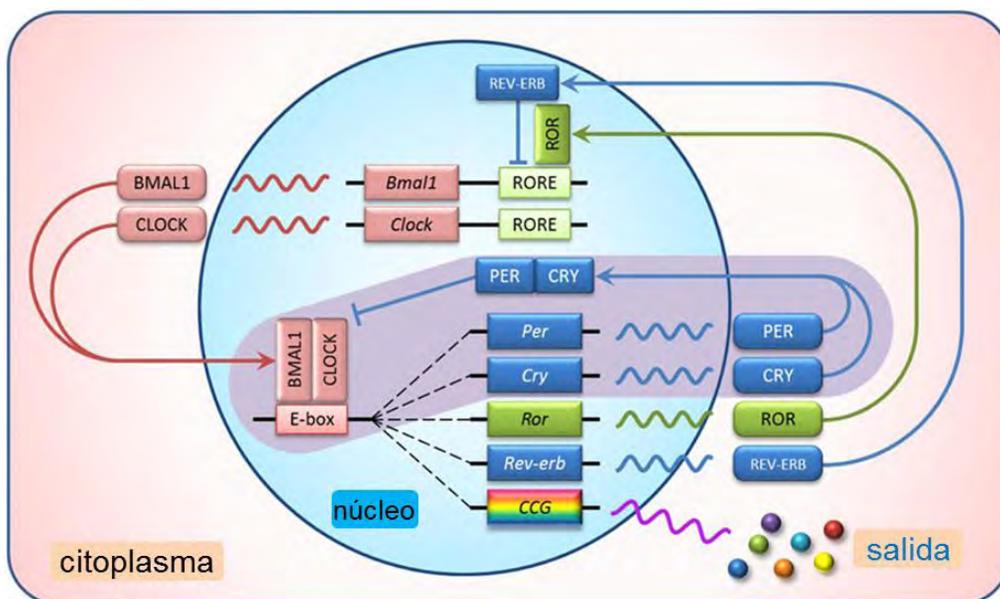


FIGURA 2: Reloj molecular. El reloj molecular está formado por dos asas de transcripción-traducción de genes. Por un lado el asa de transcripción positiva formada por la formación del heterodímero de las proteínas BMAL1 y CLOCK que se unen a la caja E de la región promotora de genes reloj como Per, Cry y Rev-Erv; además existen genes relacionados con procesos como proliferación celular, reparación de ADN y metabolismo, llamados genes controlados por el reloj (CCG por sus siglas en inglés). El asa de transcripción negativa (en sombra morada) inducida por el heterodímero de las proteínas PER y CRY que inhiben su propia transcripción(27).

Además de los genes reloj, muchos otros genes presentan caja E en su región promotora lo que los hace susceptibles a regulación circadiana. Estos CCG incluyen genes que participan en el ciclo celular (28), proliferación celular (29), metabolismo (30), reparación de ADN (31), respuesta al estrés (32), desintoxicación de xenobióticos (7) y autofagia (27).

1.3 Oscilador sincronizado por alimento

En las últimas décadas se ha explorado la capacidad que tienen los horarios y tipo de alimentación en la sincronización conductual, fisiológica y a nivel molecular en mamíferos y otras especies. En contraste con el OSL, en el que se conoce que el NSQ es el centro que controla la sincronización por luz; el oscilador sincronizado por alimento (OSA) es un sistema formado por la comunicación entre órganos periféricos como el hígado, tejido adiposo, intestino, músculo esquelético y algunas glándulas endocrinas y con diferentes áreas del cerebro como el hipotálamo dorsomedial y ventromedial que se sincronizan a los horarios de acceso al alimento y que es independiente del OSL (34).

El protocolo para evidenciar la expresión del OSA en ratas consiste en permitirles el acceso al alimento solo 2h al día, conocido como horario de restricción al alimento (HRA); este acceso se permite en el periodo de luz (en su periodo de descanso) para evitar enmascaramiento con el OSL. Bajo estas condiciones el alimento adquiere relevancia como principal sincronizador de algunos ritmos biológicos como la actividad, conducta, temperatura y expresión de algunos genes que persisten por varios ciclos bajo condiciones de ayuno (34–36).

En los primeros esfuerzos por evidenciar el poder sincronizador del alimento, se observó que en ratas a las que se les lesionó el NSQ perdieron el ritmo circadiano de la ingesta de alimento (37), actividad locomotriz y consumo de agua (38). Cuando estos roedores fueron sujetos a un HRA, se sincronizaron al horario de alimentación y siguieron sincronizadas por días o hasta semanas aun cuando el NSQ estaba lesionado, lo que estableció claramente que el OSA es un oscilador independiente del NSQ (17,39).

Los horarios de alimentación en periodos de luz/oscuridad u oscuridad constante sincronizan el RM de los órganos periféricos pero no mueve la fase en el NSQ (40), esta observación se realizó en roedores a los que se les permitió el acceso al alimento durante 12h en el periodo de luz o de oscuridad. Por otro lado, en los últimos años se observó que los roedores que se tenían bajo un HRA solo consumen cerca de un 70-80% del alimento, comparado con ratas que tienen

acceso *Ad Libitum* (AL) (las 24h) y bajo esta condición si se presentan cambios de fase en el NSQ (41,42). Entonces, se ha demostrado que la ingesta calórica puede también modificar el proceso de sincronización.

1.4 Efectos del horario de restricción calórica

Como ya fue mencionado, el protocolo que permite evidenciar la actividad del OSA implica dos características que convergen, por un lado una restricción calórica y por otro lado el efecto circadiano del horario de alimentación; de aquí que en adelante nos referiremos como horario de restricción calórica (HRC). En los últimos años se ha puesto a prueba si los efectos del HRC son por la restricción calórica o por el horario de acceso al alimento; cabe señalar que para fines del presente trabajo no se tomo un enfoque que aclarara esta discusión (**Fig. 3**).

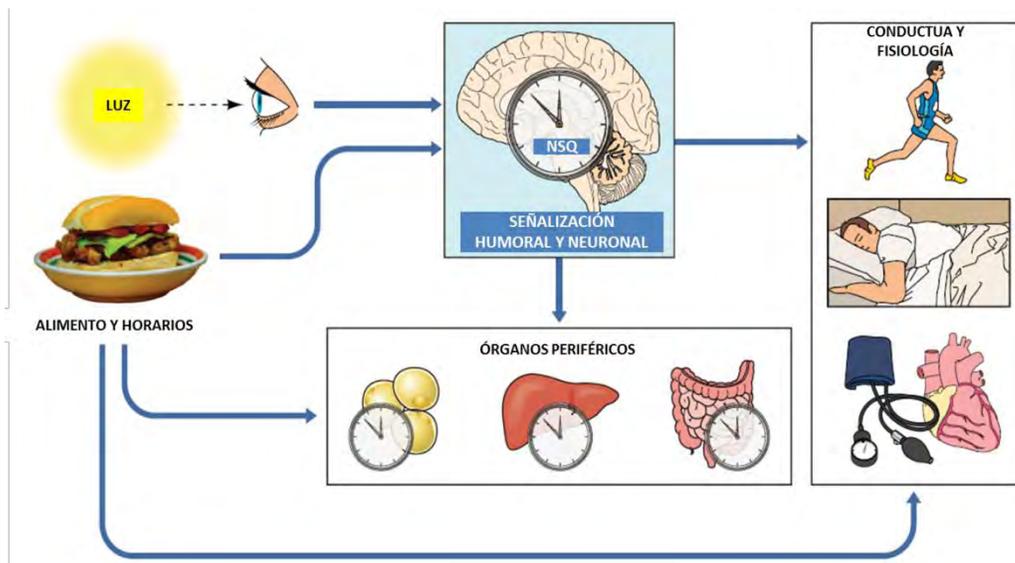


FIGURA 3: Sincronización por luz y por alimento. Señales sincronizadoras del reloj central y osciladores periféricos. El NSQ sincroniza órganos periféricos, ciclos de sueño/vigilia, presión arterial y ritmo cardiaco. La luz, el alimento y los regímenes de alimentación pueden modificar la sincronización del NSQ y órganos periféricos (43).

Los cambios diurnos resultantes en la disponibilidad y demanda de nutrientes deben ser manejados principalmente por el tracto gastrointestinal y el hígado,

donde los nutrientes son absorbidos, procesados y dirigidos a otros órganos del cuerpo (44).

El hígado es un centro metabólico importante. Las funciones hepáticas como el metabolismo de los nutrientes, la desintoxicación y la síntesis de los componentes esenciales del suero deben adaptarse a un entorno sistémico rítmicamente cambiante. Al igual que muchos otros órganos en el cuerpo, el hígado tiene un sistema de tiempo interno basado en la actividad del RM, que ajusta los procesos fisiológicos a su hora relevante del día relacionada principalmente con la ingesta de alimento. El hígado utiliza este sistema para anticipar cambios sistémicos y ambientales recurrentes y funcionar de manera óptima (41,45,46).

Bajo el protocolo de HRC en ratas, el RM del hígado se sincroniza al horario de alimentación; la proteína PER1 presenta su máxima concentración en el horario de alimentación (12-14h) (**Fig. 4A**) (46) y la proteína BMAL1 presenta su máxima concentración en el periodo de oscuridad (47) (**Fig. 4B**).

Mediante un mapa de fases publicado por Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz en el año 2010 (34) se observó que la acrofase de los ritmos circadianos de procesos como oxidación lipídica, catabolismo de carbohidratos, el estado de oxido/reducción, liberación de hormonas, procesos inflamatorios, señalización de receptores nucleares e incluso la relación entre apoptosis y ciclo celular en hígado se ven modificados por el HRC, presentándose en diferentes horas compadras con ratas AL, sugiriendo así un cambio de fase.

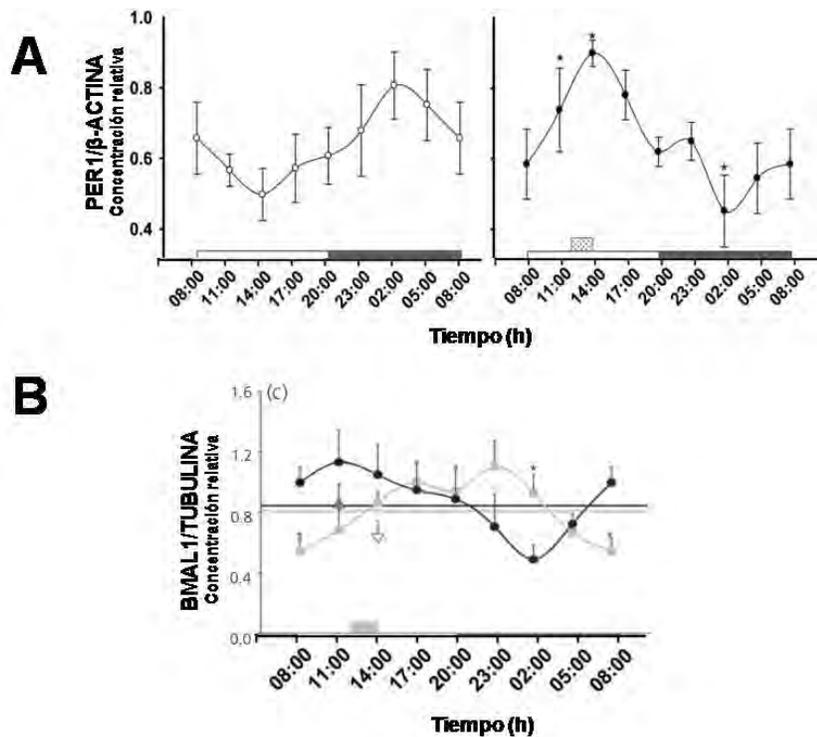


FIGURA 4: Sincronización del reloj molecular en hígado inducida por alimento. El HRC induce el cambio de fase de las proteínas PER1 y BMAL1. **(A)** Concentración relativa de la proteína PER1 en hígado de ratas del grupo *Ad Libitum* (izquierda) representado por los círculos blancos (○); su acrofase (pico de máxima concentración) se presenta en el periodo de oscuridad. El grupo HRC (derecha) representado por círculos negros (●); su acrofase tiene un cambio de fase presentándose en el periodo de luz. **(B)** Concentración relativa de la proteína BMAL1 en hígado de ratas del grupo *Ad Libitum* representado por círculos negros (●); su acrofase se presenta en el periodo de luz. El grupo HRC representado por los cuadros grises (■); su acrofase tiene un cambio de fase presentándose en el periodo de oscuridad. En el eje de las X y el perfil de 24h marcado en el eje de las Y. (modificado de Luna-Moreno y col., 2009 y Arellanes-Licea y col., 2012) (41,46).

1.5 Alteración de los ritmos circadianos y el cáncer

Estudios epidemiológicos recientes sugieren que trastornos del sistema circadiano constituyen un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. En un estudio realizado con pilotos y asistentes de vuelo de diversas líneas aéreas, quienes sufren trastornos frecuentes del ritmo circadiano de tipo jet-lag, se encontró que presentan una mayor incidencia de cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer de colon, en comparación con la población normal (sin alteraciones de los periodos de luz/oscuridad) (48).

Otros estudios han sugerido que las mujeres que trabajan de noche o que se ven sometidas a rotaciones frecuentes en el turno de trabajo muestran una mayor

incidencia de cáncer de mama en comparación con las mujeres que trabajan sólo durante el día (49).

Otro estudio realizado durante un periodo de 10 años, con la participación de más de 78,000 mujeres, se evaluó la relación entre el riesgo de padecer cáncer de mama y el trabajo en turnos nocturnos. En este período se diagnosticaron 2,400 casos con esta patología que mostró una correlación con el número de años de trabajo en ese turno. Estos resultados sugieren que las alteraciones de los ritmos circadianos podrían ser igual de importantes que la historia familiar en la determinación del riesgo a padecer cáncer de mama (50).

Por otro lado se ha puesto particular interés en conocer los efectos de la re-sincronización circadiana en personas que padecen alguna enfermedad. Una revisión realizada por Sunderram y col., en 2014 (51) pone de manifiesto que las personas que se encuentran en las unidades de cuidados intensivos están bajo condiciones de luz constante y sin horarios de alimentación (alimentación parenteral y/o intragástrica). Se ha experimentado la capacidad re-sincronizadora de los HRA sobre los órganos periféricos, teniendo un efecto potencializador del sistema inmune y permitiendo el restablecimiento de los ritmos circadianos (**Fig. 5**).

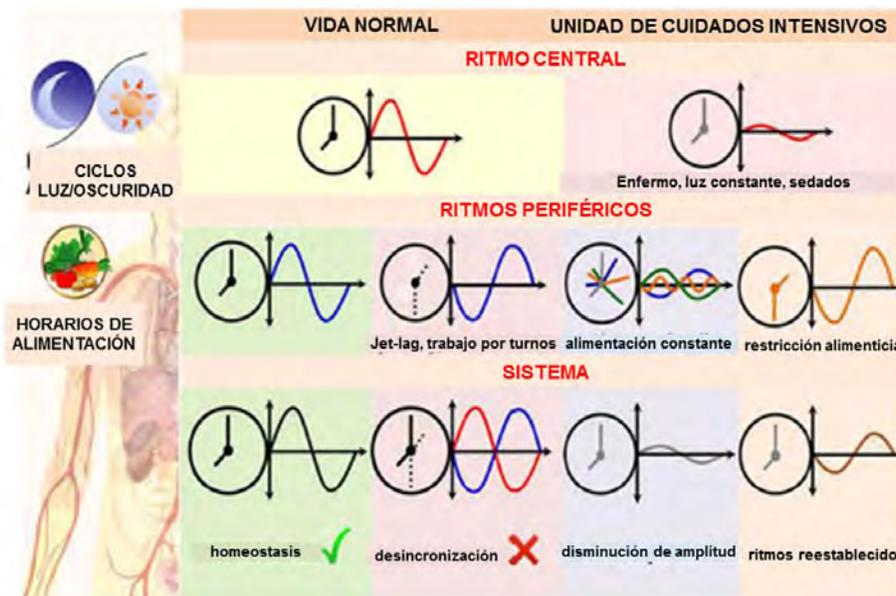


FIGURA 5: Sincronización circadiana. Características homeostáticas de la sincronización circadiana y desincronización inducida por estímulos estresantes (como ejemplo: pacientes de unidades de cuidados intensivos) (51).

Antes de abordar las relaciones existentes entre la alteración de la ritmicidad circadiana y el cáncer, discutiremos las bases para el estudio del Hepatocarcinoma.

1.6 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de etiología múltiple que se caracterizan por una pérdida de la diferenciación y el control del crecimiento celular más allá de los límites homeostáticos, generando masas tumorales (52). El cáncer puede surgir de una célula o de un grupo de células. Para convertirse en cancerosas estas células deben adquirir cambios (pueden ser pocos o numerosos) en genes llamados supresores tumorales y oncogenes que le darán a las células la capacidad de proliferar más allá de los límites normales. Si éstas células logran ser toleradas por el organismo y no se presentan perturbaciones, pasarán estas alteraciones a las siguientes generación formando una clona diferente (53) (**Fig. 6**).

1.6.1 Marcas distintivas del cáncer (Hallmarks por sus siglas en inglés)

El proceso de carcinogénesis tiene 3 fases principales: Iniciación, promoción y progresión. La etapa de promoción es un estado pre-neoplásico caracterizado por que puede ser reversible; por el contrario, el proceso de progresión es irreversible (52) (**Fig. 6**).

En células normales de tejidos adultos, la proliferación es contrarestanda por el limitado número de veces en el que las células se pueden dividir (diferenciación terminal) y la eliminación de células dañadas (apoptosis). El proceso oncogénico involucra la alteración en la regulación entre dos principales grupos de genes, por un lado los oncogenes y por otro los supresores tumorales (54) (**Fig. 6**).

En células normales los proto-oncogenes regulan las funciones de proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las mutaciones en estos genes o su activación por virus, inducen la pérdida en la regulación de sus funciones,

considerandose como oncogenes ya que favorecen la transformación celular y malignidad tumoral (55) (Fig. 6).

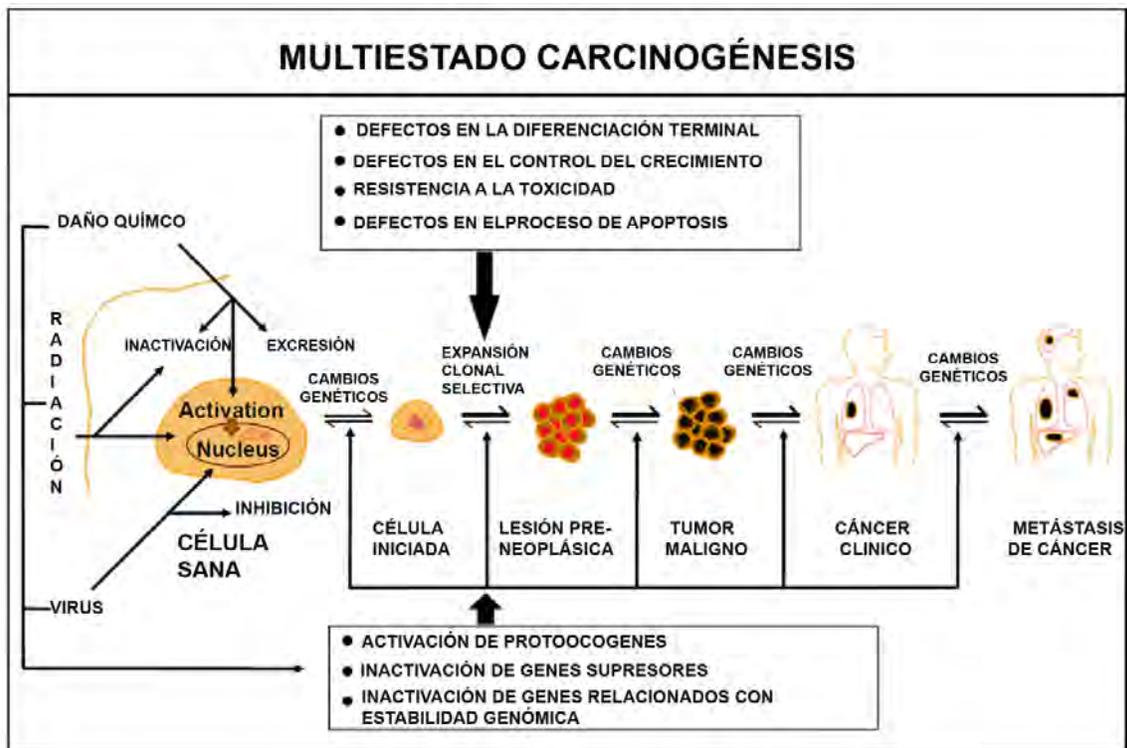


FIGURA 6: Multiestado de la carcinogénesis. Representación esquemática del proceso multiestado de la carcinogénesis (56).

Los supresores tumorales son genes cuya función es regular la inducción de la proliferación celular. Existen dos tipos de genes supresores: a) Los genes guardianes o “gatekeepers” cuya función es regular directamente la proliferación celular y son limitantes de la velocidad tumorigénica, un ejemplo es el gen retinoblastoma (Rb). b) Los genes guardianes o “Caretakers” no regulan directamente la proliferación, pero están relacionados con el mantenimiento de la integridad genómica y cuando se mutan conducen a la conversión acelerada de una célula normal a una célula neoplásica (57).

El proceso de transformación de una célula sana a una neoplásica aún es poco claro. Se han propuesto una serie de condiciones características del proceso multiestado del cáncer conocido como hallmarks (marcas). Hanahan y Weinberg

en el 2011 publicaron cambios a su primer modelo del 2000 que incluían 6 hallmarks: Señales sostenidas de proliferación, evasión de supresores de crecimiento, activación de invasibilidad y metástasis, replicación sostenida, inducción de angiogénesis y resistencia a muerte. En los cambios se agregaron dos hallmaks emergentes: Uno se refiere a la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular y otro a la evasión de la muerte inmunológica; además de dos llamados facilitadores: uno referido a las mutaciones e inestabilidad genómica y el otro a estados de inflamación crónicos (58) (Fig. 7).

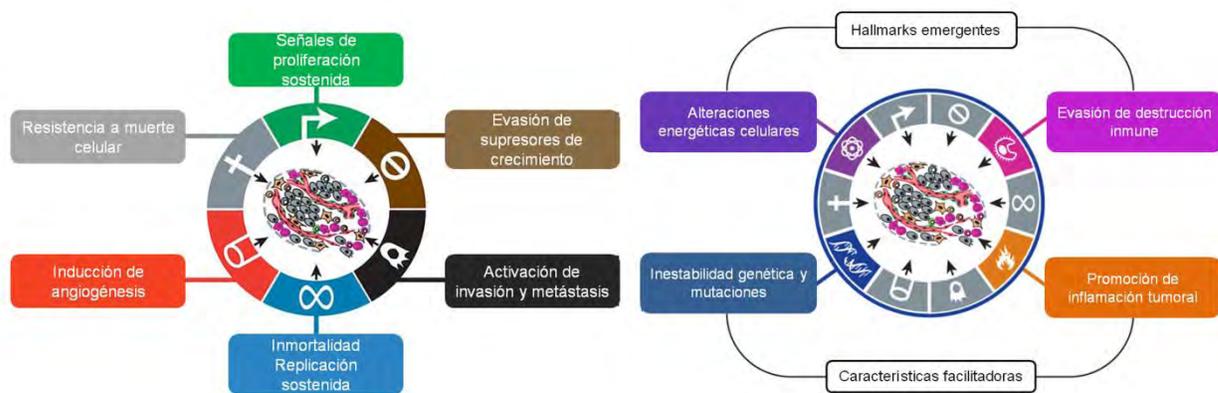


FIGURA 7: Hallmarks del cáncer. (A) Se ilustran los 6 hallmarks del cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg en el año 2000. (B) Se ilustran los hallmarks emergentes y facilitadores anexados por Hanahan y Weinberg en su versión del año 2011. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011 (58).

1.6.2 Epidemiología

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, ~7.6 millones de personas murieron de cáncer durante el 2007 a nivel global. La OMS prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de ~7.9 a ~11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; y durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de ~11.3 a ~15.5 millones.

En las últimas décadas México ha presentado grandes cambios en la dinámica poblacional, las enfermedades y mortalidad. De acuerdo a los registros históricos vivimos una transición epidemiológica que está impactando y presionando a los

sistemas de salud del país. El cáncer ha emergido de forma importante como un problema de salud nacional; datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) del año 2007 ubican a los tumores malignos como la segunda causa de muerte en el país (algunos reportes refieren al cáncer como la tercera), por debajo de la diabetes mellitus y por encima de las enfermedades isquémicas del corazón. En México, la tasa de defunción asociada a procesos cancerosos tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 58 a 67 por cada 100,000 habitantes (59). Estadísticas del 2008 del INEGI muestran que los tumores malignos se asocian aproximadamente al 13% de las defunciones.

De acuerdo a los resultados, se reporta en el año 2010 un total de 74,685 muertes por cáncer, lo cual corresponde a un incremento del 35% comparado con el año 1998 (mortalidad total por cáncer de 55,236) con un incremento promedio del 2.91% anual (59) (**Fig. 8**).

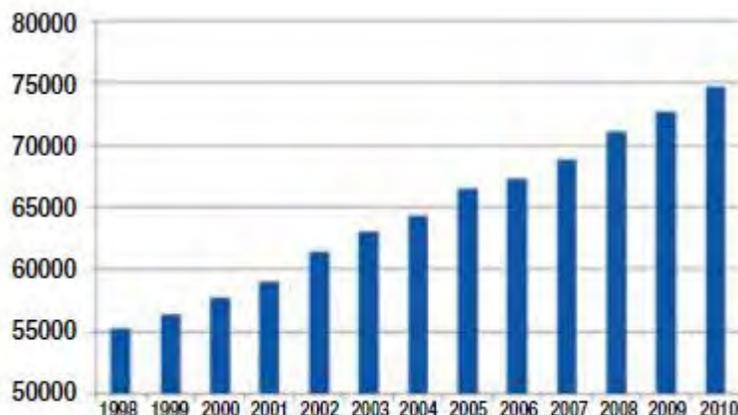


FIGURA 8: Gráfica de la mortalidad global por cáncer en México entre el año 1998 y 2010. En el eje de las X se observa el periodo de evaluación que va de 1998 al 2010. En el eje de las Y se observa el número de personas que murieron a causa del cáncer (59).

En lo que se refiere al número total de casos/mortalidad por cáncer en el país, en el periodo 2000-2010 las dos primeras causas de muerte se mantienen sin modificaciones (1° pulmón, 2° estómago), sin embargo, los cambios más notables

se observan en el cáncer cervicouterino (CaCu), el cual pasó del lugar tres en el 2000 (con el 7.9% del total de muertes por cáncer en México) al lugar siete (con el 5.3% del total de muertes por cáncer en México) en el año 2010 (59).

El cáncer colorrectal pasó del lugar nueve en el 2000 (con el 4.5% del total de muertes por cáncer en México) al lugar seis (con el 5.4% del total de muertes por cáncer en México) en el año 2010. El cáncer de próstata pasó del lugar cinco en el 2000 (con el 6.6% del total de muertes por cáncer en México) al lugar tres (con el 7.3% del total de muertes por cáncer en México) en el año 2010. El cáncer de mama paso del lugar seis en el 2000 (con el 6% del total de muertes por cáncer en México) al lugar cinco (con el 6.8% del total de muertes por cáncer en México) en el año 2010. La mortalidad por tumores de hígado y vías biliares, páncreas y linfomas no Hodgkin (LNH) se mantuvieron en el 4 lugar en la tabla de las primeras 10 causas de muerte por cáncer en (59) (**Tabla 1**).

	Porcentaje muertes 2010*	Porcentaje muertes 2000*	Lugar año 2010
Pulmón	9%	10.8%	1
Estómago	7.4%	8.6%	2
Próstata	7.3%	6.6%	5
Hígado y VB	7.2%	7.4%	4
Mama	6.8%	6%	6
Colorrectal	5.4%	4.5%	9
CaCu	5.3%	7.9%	3
Leucemias	5.3%	5.7%	7
Páncreas	4.8%	4.5%	8
LNH	2.8%	2.7%	10

TABLA 1: Principales causas de muerte por cáncer en México en el periodo de 2000-2010. VB: vías biliares; CaCu: cáncer cervicouterino; LNH; linfoma no Hodgking. Modificado de Aldaco-Servide y col., 2010 (59).

Es pertinente para el presente proyecto, señalar que el cáncer de hígado, conocido como Hepatocarcinoma (HCC) se encuentra en la 4 causa de muerte por cáncer y continua incrementando (59) principalmente porque es una enfermedad relacionada con el desarrollo crónico de cirrosis. Otra posibilidad es que las personas que recibieron una transfusión de sangre o derivados de ella antes de 1995 presentan altos niveles de incidencia de hepatitis C, ya que antes de esta fecha la norma mexicana de transfusión de sangre no incluía la detección de anticuerpos de este virus (60).

1.7 Hígado

El hígado es el órgano visceral más grande en humanos y otros vertebrados, generalmente comprende del 2-5% del peso corporal en la mayoría de las especies (61).

1.7.1 Estructura del hígado

Los hepatocitos constituyen cerca del 60% del parénquima del hígado, pero por su tamaño representa aproximadamente el 90% de la masa total. Las células de los conductos biliares representan un 5% del parénquima (61–63).

Las demás células son de origen mesenquimal que incluyen: 1) células endoteliales que se encuentran en el espacio vascular del hígado. 2) células de Kupffer que son macrófagos residentes del hígado. 3) células estelares que son peri-sinusoidales (se explicará más adelante) que en condiciones fisiológicas almacenan retinoides pero cuando hay muerte celular, se activan como fibroblastos y se encargan de la producción de citoquinas, factores de crecimiento y colágena. 4) linfocitos asociados al hígado conocidos como células de pit, que generalmente son células natural killer (61–63).

La unidad estructural del hígado es conocido como lobulillo hepático (acino) con forma hexagonal o en algunos casos pentagonal. El hígado cuenta con un doble sistema de circulación sanguínea, por un lado la aportación de la vena porta y

arteria hepática (que se ubican en los vértices del lobulillo) en la zona llamada periportal del lobulillo y por otro lado en la zona central del lobulillo hay circulación de la vena central (61–63) (**Fig. 9**).

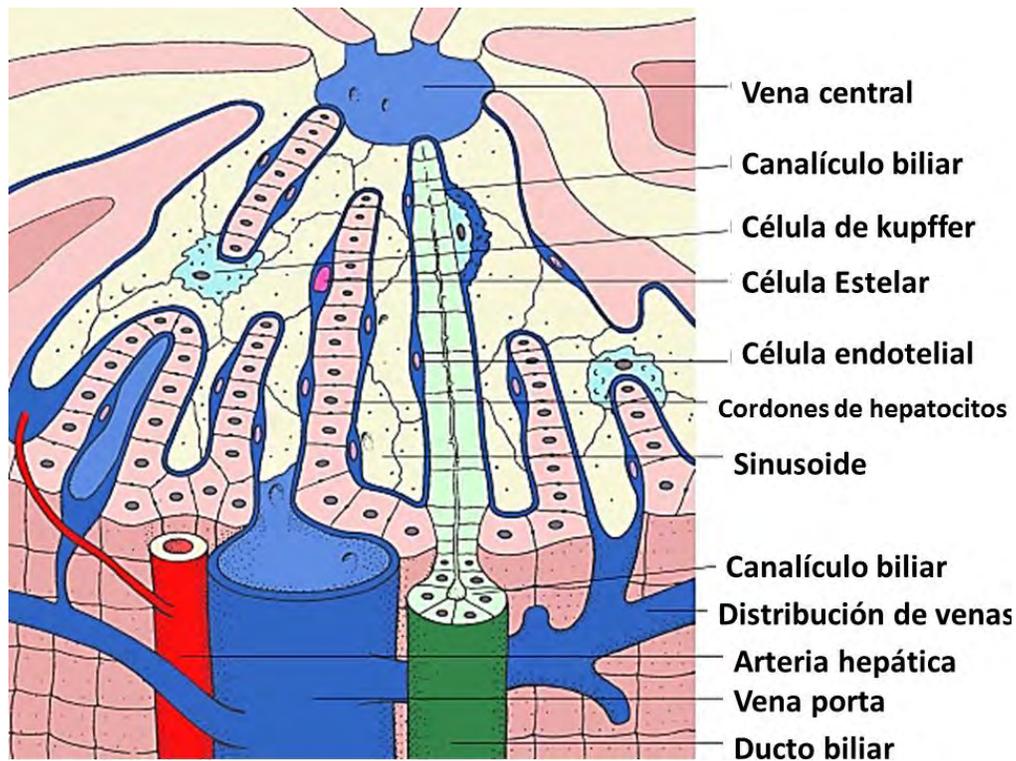


FIGURA 9: Componentes del lobulillo hepático. Los hepatocitos que son las células más abundantes del hígado están ubicadas a modo de cordones, separados células endoteliales (espacio sinusoidal) en donde se encuentran las células de Kupffer y estelares. El flujo de sangre va de la zona portal a la zona central del lobulillo. El sistema de colección biliar viaja de la zona central a la zona portal (Fausto, 2002) (62).

1.7.2 Funciones del hígado

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas. Juega un papel importante en la digestión, en el metabolismo del azúcar y las grasas e incluso en el sistema inmunitario. Procesa prácticamente todo lo que comemos, respiramos o absorbemos a través de la piel. Alrededor del 90% de los nutrientes del organismo procedentes de los intestinos pasan por el hígado. El hígado convierte los alimentos en energía, almacena nutrientes y produce proteínas sanguíneas y

factores de coagulación. Además, actúa como filtro para eliminar patógenos y toxinas de la sangre (64,65).

El hígado tiene la peculiaridad como tejido de contar con mecanismos propios para regenerarse en respuesta a una amplia gama de estímulos, incluyendo agentes tóxicos, hepatectomía parcial y otros mitógenos (66).

1.7.3 Progresión de fibrosis a cirrosis

Más del 80% de los casos de HCC están relacionados con un estado cirrótico previo, considerándose como una condición pre-maligna (67–69). La hepatitis es un estado patológico del hígado caracterizado por daño al parénquima hepático y asociado a un estado de inflamación crónica a nivel celular y tisular (64,69). La afección puede remitir espontáneamente o evolucionar hacia una fibrosis (cicatrización), una cirrosis o cáncer de hígado (**Fig. 10**).

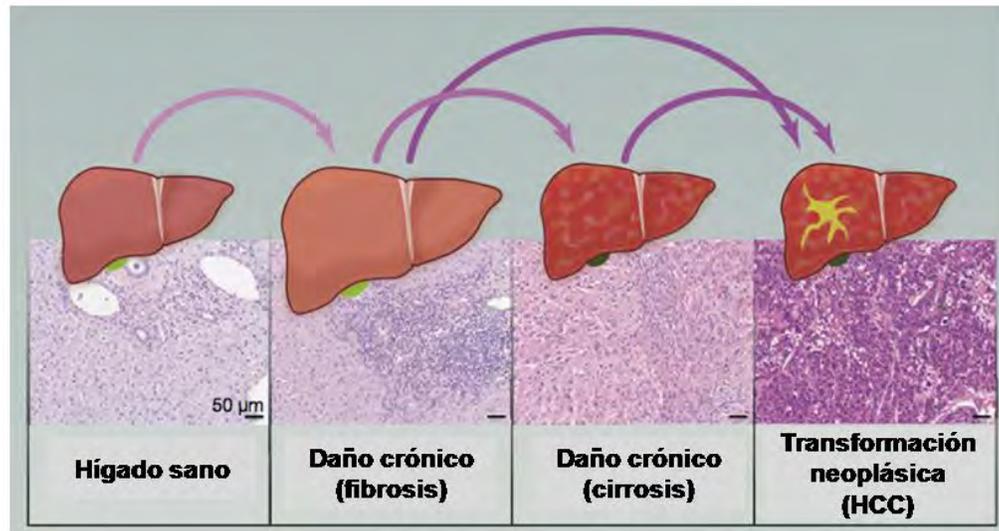


FIGURA 10: Secuencia del proceso crónico de la fibrosis, cirrosis y HCC. Se observa en la parte superior una representación de los cambios macroscópicos del hígado en un estado fibrótico, cirrótico y de HCC. En la parte inferior se observan los cambios citológicos con tinción de hematoxilina y eosina. Marquardt y col., 2014

La fibrosis (reversible) y cirrosis (irreversibles) son enfermedades graduales hepáticas que se caracterizan por una alteración de la arquitectura hepática y una exacerbada acumulación de fibrosis, donde las células parenquimatosas del hígado son sustituidas al morir por tejido de tipo cicatricial (principalmente

colágena) formado a partir del tejido estromal del propio órgano. Se produce también una desestructuración del lobulillo hepático inducido por un estado mantenido de regeneración y un estado crónico inflamatorio que deriva en daño oxidativo provocando insuficiencia hepática progresiva (70–72) (**Fig.10**).

La etiología de la cirrosis es multifactorial y se produce principalmente por infección viral (Hepatitis B y C), ingesta de alcohol, aflatoxinas, obesidad y esteatosis no-alcohólica (72,73).

Los inicios del proceso fibrogénico tienen lugar en el espacio subendotelial o espacio de Disse (un estrecho espacio perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos) (**Fig. 11**), en donde los actores principales son las células estelares hepáticas (HSC) que, tras un daño ocasionado por liberación de radicales libres (estrés oxidativo) entran en un proceso de activación (aHSC) que las estimula a sintetizar una gran cantidad de proteínas fibrogénicas (principalmente colágena I, III y VI) (73).

También hay una gran liberación de factores de crecimiento celular que inducen a las aHSC para que proliferen activamente. Todos estos procesos ocasionan que haya un gran depósito fibrilar en las fenestraciones endoteliales (capilarización del sinusoides) que impide el libre intercambio de moléculas entre el plasma sanguíneo y los hepatocitos, perdiéndose así las funciones vitales del órgano (73).

La fibrosis hepática se considera en la actualidad un proceso de reparación tisular que puede ser reversible y que es altamente complejo como resultado de un daño hepatocelular mantenido y en el que intervienen de manera activa diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas. Ante una necrosis hepática autolimitada (ejemplo: una hepatitis aguda), el hígado tiene una gran capacidad de regeneración hepatocitaria que sustituye en poco tiempo el tejido necrótico, restableciendo la arquitectura hepática normal (74).

Sin embargo, si la necrosis hepática es mantenida, este proceso de reparación se perpetúa. Con el tiempo, la capacidad de regeneración hepática disminuye, mientras que aumenta considerablemente la producción de matriz extracelular (MEC), que se deposita de manera desorganizada en el lobulillo hepático (74).

En fases avanzadas, la población normal de hepatocitos es parcialmente sustituida por abundante MEC formada por colágeno fibrilar y otras proteínas como la fibronectina y diversos aminoglicanos; las bandas de colágeno son muy evidentes y unen a varios espacios porta, que se denominan “puentes de fibrosis”. Esta condición precede a la formación de nódulos de regeneración y por tanto, al desarrollo de cirrosis (74) (**Fig. 11**).

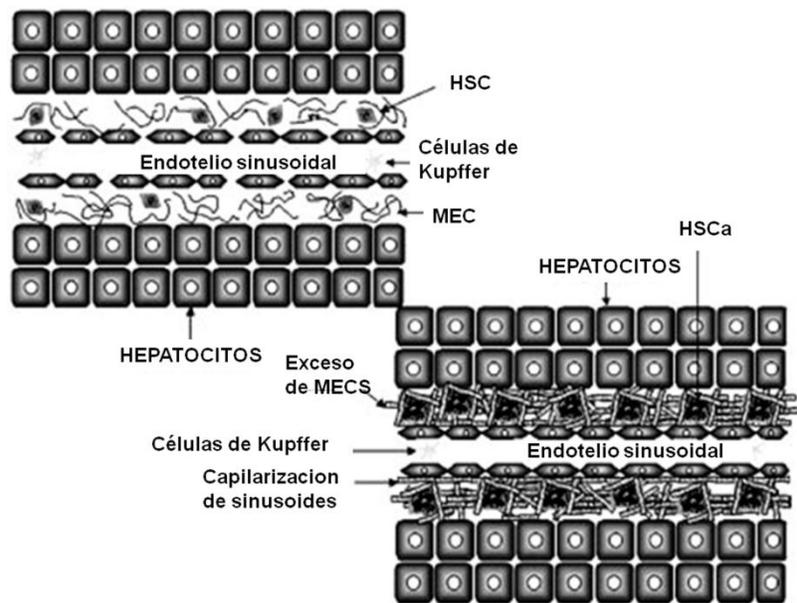


FIGURA 11: Proceso fibrótico. Alteraciones del parénquima hepático generadas por la acumulación de colágena (cicatrización) inducida por la activación de las células estelares hepáticas (HSC). Matriz extracelular (MEC) (Modificado de García y col., 2007) (73).

1.7.4 Cirrosis

La cirrosis es un estado avanzado e irreversible de la fibrosis, caracterizado por un estado inflamatorio exacerbado aunado a procesos activos de estrés oxidativo que inducen altos niveles de apoptosis en los hepatocitos. En este estado patológico las especies reactivas de oxígeno pueden inducir inestabilidad genómica y pérdida de su capacidad regenerativa (75).

La cirrosis puede ser compensada o descompensada: a) La cirrosis temprana y bien compensada puede manifestarse a través de anorexia y pérdida de peso, debilidad, fatiga y osteoporosis como resultado de la mala absorción de vitamina

D, que a su vez genera una deficiencia en el manejo del calcio. b) La cirrosis descompensada que se presenta como un estado avanzado de la enfermedad, conlleva a complicaciones como ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía hepática y sangrado de varices esofágicas (64).

Los eventos moleculares encontrados en la cirrosis hepática implican: acumulación de laminina α -1, tenascina y fibronectina, con la sucesiva activación y proliferación de HSC inducida mediante la secreción autócrina y parácrina de citocinas tales como: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β tipo 1 (TGF β 1). Las aHSC siguen incrementando los depósitos de proteínas de la MEC en el espacio perisinusoidal o de Disse, lo que dificulta el intercambio de sustancias entre el sinusoides y los hepatocitos (73).

Los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) producen el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) y otras citoquinas pro-inflamatorias que activan a los miofibroblastos productores de colágeno tipo I, que no está presente en hígados sanos (76).

1.7.5 Hepatocarcinoma

El HCC es una de las neoplasias malignas más comunes en todo el mundo y su pronóstico depende en gran medida de la detección temprana (77). Su diagnóstico se basa principalmente en pruebas imagenológicas, histopatológicas y por niveles elevados de α -Fetoproteína (AFP) y γ -Glutamilttransferasa (GGT) (78–80).

Aunque los principales factores de riesgo para el desarrollo del HCC han sido claramente identificados, como la infección por el virus de la hepatitis B y C y el abuso del alcohol, todavía hay poca comprensión de los principales factores de esta neoplasia (81), además se ha sugerido que hay una relación directa entre estados de inflamación activa y estrés oxidativo asociados con daño genético, que a la larga generan mutaciones en el DNA de hepatocitos o células madre y que eventualmente pueden conducir a una pérdida de diferenciación y al crecimiento neoplásico (82,83).

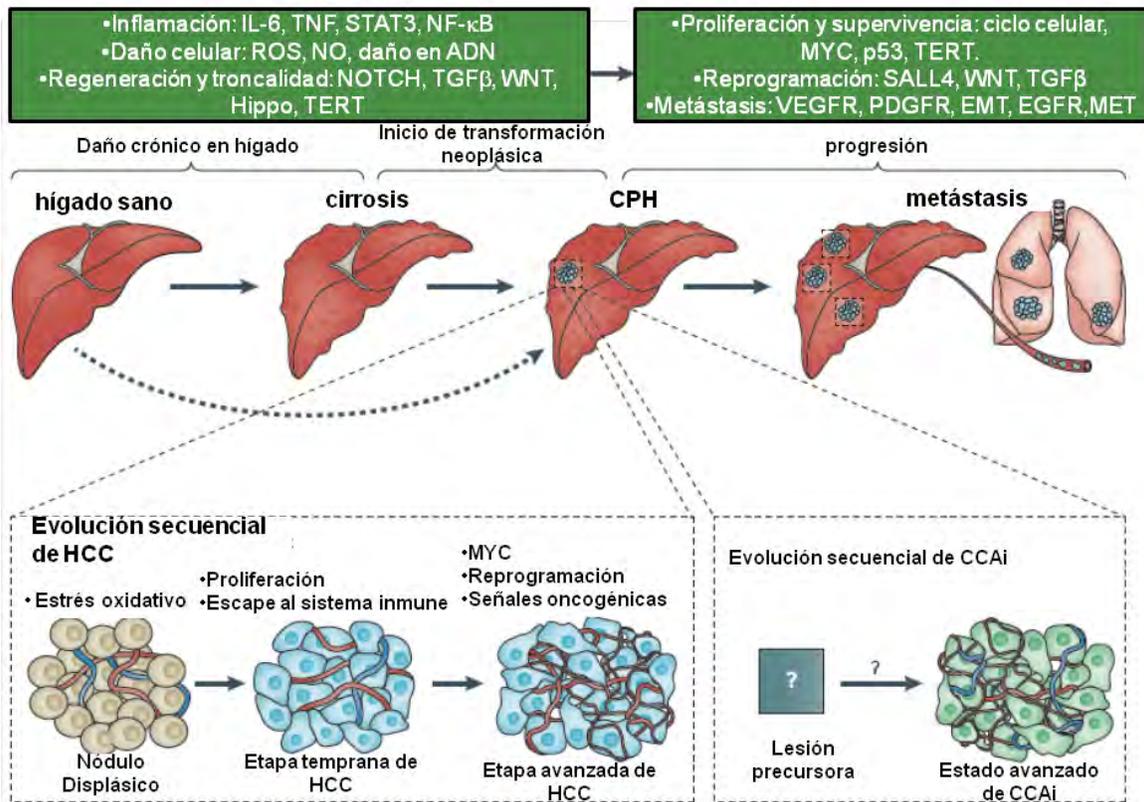


FIGURA 12: Evolución secuencial de cáncer primario de hígado (CPH). EL estado final del daño crónico en el hígado es el desarrollo de la cirrosis. Las alteraciones crónicas generadas durante la cirrosis pueden ser consideradas como un factor de predisposición al desarrollo de HCC. Se muestran las principales vías de señalización alteradas en la inducción y progresión de la cirrosis y del HCC (cuadros verdes). También se observan la evolución secuencial del HCC (cuadro con línea punteada lado izquierdo) y el desarrollo (no se conoce con certeza) del Colangio carcinoma (CCAi)(Modificado de Marquardt y col., 2015) (83).

El proceso se inicia mediante la generación de focos de hepatocitos displásicos (foci) sin un fenotipo maligno aparente, pero con la probabilidad de evolucionar a HCC. Los nódulos displásicos aumentan de tamaño y promueven angiogénesis activa, lo que resulta en un mayor suministro de sangre desde la arteria hepática; posteriormente su grado de diferenciación se pierde y el tumor desarrolla entonces una capacidad metabólica independiente que es característica de las neoplasias (Fig. 12) (82).

Ya que el cáncer es multifactorial se han reconocido una serie de genes relacionados con el proceso oncogénico del HCC, hasta ahora se proponen: los

puntos de revisión o “checkpoints”: p16/Rb, p53, IGFR2; así como alteraciones de la Telomerasa, c-myc, Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt y el VEGF (**Fig. 12**) (84).

1.8 Protocolo de inducción de fibrosis, cirrosis y HCC por tratamiento con DEN.

La mayoría de los sustratos metabolizados en el hígado son lipofílicos. El hígado cuenta con una gran variedad de enzimas encargadas del metabolismo de drogas y otros genotóxicos para su transformación en sustratos solubles en agua y poder ser excretados del cuerpo (85).

El proceso enzimático en el hígado se ha clasificado en reacciones de fase I y fase II. Las reacciones que ocurren en la Fase I ocurren en el retículo endoplasmático de los hepatocitos y comprende el sistema de las enzimas CYP450 que además incluye la oxidación, hidrólisis o reducción de los fármacos (85). Las reacciones de la fase II se llevan a cabo en el citoplasma de los hepatocitos e incluyen la conjugación de los metabolitos con sulfatos, acetatos, el glutatión, glucuronato o grupos metilo. Generalmente esta fase produce sustancias no-toxicas y además excretables (85).

La activación de los fármacos y otros genotóxicos es inducido por las enzimas CYP450 generando hepatotoxicidad y esto a su vez induce y/o facilita el desarrollo de diferentes patologías hepáticas.

El DEN es un hepatotóxico usado comúnmente para inducir fibrosis, cirrosis y HCC en roedores que es metabolizado por enzimas hepáticas de la familia CYP450 a un intermediario electrofílico que interacciona con el material genético generando aductos y metilación del ADN produciendo mutaciones; además induce una sobreexpresión de proteínas reguladoras de la fase G1/S del ciclo celular y una necrosis hepática significativa, asociada con una marcada inflamación y fibrosis, que desemboca en desarrollo de cirrosis y HCC (52,73,86,87).

La actividad de las proteínas de CYP450 del hígado que participan en la bioactivación del DEN varían entre especies, entre los diferentes sistemas de

estudio y también con las diferentes técnicas utilizadas, por lo que no está definido con precisión cuales son las isoformas que activan al DEN, pero se han propuesto las siguientes como las más probables: CYP2E1, CYP1A1/1A2 y CYP2B1/2B2 (88). En roedores se sabe que el DEN es hidroxilado generando compuestos bioactivos por los citocromos CYP2E1 Y CYP2A5 (87).

El DEN incrementa los niveles de proliferación hasta 14 veces en hígados cirróticos comparando con hígado sano a través de la activación de vías mitogénicas activadas por proteínas quinasa. El factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) estimulan la mitogénesis en hepatocitos a través de su unión al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). En el proceso de regeneración hepática el TGF- α actúa de forma autócrina y se ha evidenciado que el ARNm se encuentra sobre expresado en zonas cirróticas y HCC (89).

El TGF- α es producido por los hepatocitos y estimula la mitogénesis a través de su unión con el EGFR actuando de forma autócrina en los procesos regenerativos (89). Ha sido demostrado que TGF- α /EGFR contribuye a la hepatocarcinogénesis ya que se han encontrado incrementos tanto en el mensajero como en la proteína en zonas cirróticas y aún más en tumores (90).

1.9 Ritmicidad circadiana de los CYP450

Tanto la transcripción de genes *Cyp* como la actividad enzimática de sus proteínas se presentan ritmicidad circadiana, principalmente en órganos como el hígado y riñón, en donde se llevan a cabo procesos de desintoxicación.

Los estudios realizados por Gachon y col., (2007) demostraron que la expresión génica de las enzimas relacionadas con las fases I, II y III de desintoxicación en hígado de ratón presentan un ritmo circadiano. Esta ritmicidad es un efecto del RM sobre la actividad, principalmente de los factores de transcripción DPB, HLF y TEF, pertenecientes a la familia PAR bZIP (PAR-domain basic leucine zipper). El perfil transcriptómico de hígado y riñón de ratones deficientes de estos tres

factores de transcripción, mostraron una pérdida en la expresión rítmica de enzimas encargadas de la desintoxicación, exhibiendo una hipersensibilidad a los xenobióticos e induciendo envejecimiento prematuro (91).

En ratones ha sido demostrado que el citocromo *Cyp2e1* presenta un perfil circadiano tanto en el ARNm como en la actividad de la enzima en hígado, encargada de metabolizar el DEN. Los niveles del ARNm del *Cyp2e1* incrementan desde la fase tardía del periodo de luz a la fase tardía del periodo de oscuridad. La proteína CRY1 induce esta ritmicidad a través de la represión del gen *Cyp2e1* y por la inducción en la expresión del factor nuclear hepático-1 α (HNF-1 α) (92).

La proteína CLOCK que pertenece al RM no presenta ritmicidad circadiana. Se ha evidenciado que el gen *Clock* afecta la respuesta citotóxica inducida por el DEN, ya que en ratones mutantes de *Clock* (*Clk/Clk*) tratados con DEN presentaron una disminución en el ARNm de las enzimas *Cyp2e1* y *Cyp2a5* reflejado en una disminución en los aductos en el ADN e incremento en la viabilidad celular (87).

Otro estudio que refuerza la importancia del RM en el metabolismo de xenobióticos puso a prueba el efecto del pentobarbital (sedante del sistema nervioso) en ratones deficientes de CLOCK o de PER. Se observó que los ratones knockout de CLOCK eran resistentes al sedante, mientras que los ratones triple mutante de los genes *Per* (*Per123^{-/-}*) el sedante tuvo efecto rápido (93).

1.10 Relación entre el reloj molecular y el cáncer

El oncogén *MYC* codifica el factor transcripcional MYC contribuye a la génesis de muchos tipos de cáncer en humanos (por lo menos en 50%) (94); este factor se une al genoma en las regiones E-box (5'-CACGTG-3'), sitio de unión que tiene en común con el heterodímero CLOCK-BMAL1 (factor transcripcional del reloj molecular). Altman y col., (2012) evidenciaron que MYC mantiene un nivel transcripcional constante del regulador negativo (REV-ERB) del heterodímero CLOCK-BMAL1 lo que genera una alteración del RM ("disritmia") ya que el asa de transcripción positiva queda inhibida de forma permanente (95).

De forma colateral se demostró que MYC no solo induce disritmia en genes reloj, este efecto se ve también en el metabolismo de la glucosa, ya que en células sanas se sabe que presenta ritmicidad circadiana; en cambio en células con sobreexpresión de MYC, induce una pérdida de esta ritmicidad, además de inducir un incremento de la proteína hexokinasa 2 (HK2) encargada de catalizar la fosforilación de la glucosa incrementando el flujo de glucosa y la producción de lactato (95).

Se ha reportado que las proteínas Per1, Per 2 y Per3 se encuentran disminuidas en cáncer de mama, endometrio, páncreas, pulmón, próstata, Leucemia mieloide crónica (96), Hígado (97) entre otros. Además la ausencia de alguno de los genes reloj incrementa la incidencia (48–50), agresividad (32), metástasis (98) e incluso pueden servir como indicadores de supervivencia (99).

Protocolos de inducción y desarrollo de diferentes tipos tumorales en humanos y roedores han demostrado que las células neoplásicas presentan cambios en la maquinaria del RM generando cambios en los ritmos circadianos que se observan como cambios de fase, cambio de periodo disminución de la acrofase incluso la aparición de ritmos ultradianos (menores a 18 h), todos estos cambios son más prominentes dependiendo del estado de desarrollo del cáncer (100) y a comparación del tejido sano no están sincronizadas, de ahí que su tasa de proliferación pase de ser de 24h a un periodo menor de 18h provocando el acelerado crecimiento tumoral (97).

La alteración de la ritmicidad circadiana de tipo jet-lag induce HCC espontáneo en ratones “wild-type” siguiendo un mecanismo similar al observado en humanos obesos. El proceso inicia con hígado graso no-alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés), que progresa a esteatosis y fibrosis, por último se induce la aparición de HCC. Este desarrollo patológico se da por una disfunción metabólica global en el hígado

Si bien se ha demostrado que la alteración de los ritmos circadianos desde un nivel conductual hasta nivel molecular pueden inducir y favorecer el desarrollo neoplásico, en otros protocolos también se ha observado lo contrario.

Las células troncales leucémicas (LCS) tienen la capacidad de auto-renovarse e incluso su trasplante en modelos animales, muestra que pueden propagarse. Puran y col., (2016) demostraron que se requieren los genes *Clock-Bmal1* para el crecimiento de las células de leucemia mieloide aguda (AML por sus siglas en inglés) tanto en forma *in vitro* como *in vivo*. La alteración del RM tiene efectos anti-leucémicos que incluyen disminución en la proliferación, incremento de diferenciación mieloide y depleción de LCS (101).

Un estudio formulado para poner a prueba el efecto oncogénico de la pérdida de *Per1* y *Per2* se usaron ratones macho y hembra wild-type, *Per1*^{-/-} y *Per2*^{-/-} a los cuales se trataron con radiación ionizante; de forma contradictoria con anteriores estudios como el de Fu et al., 2002 (102), la incidencia de tumores no tuvo diferencias entre el grupo wild-type y los animales genéticamente modificados. Una posibilidad que se explica en el estudio es que el fondo genético de los ratones usados para generar las mutantes circadianas esté generando estas diferencias contradictorias, lo que abre más la dificultad de entender el papel que juega el RM en los procesos carcinogénicos (103).

2 ANTECEDENTES

Resultados publicados por nuestro grupo de trabajo (Molina-Aguilar y col., 2012) (104) reportamos que el HRC durante tres semanas además de generar una sincronización de los genes reloj, incrementa la tasa de proliferación y la de apoptosis en hígado, modificando la dinámica de recambio celular sin desarrollar un estado patológico.

Análisis de la actividad transcripcional por microarreglos (datos no publicados) en ratas con HRC comparadas con ratas AL indica que antes del acceso al alimento (a las 08:00 y a las 11:00 h), numerosos mensajeros cambian en el grupo HRC, promoviendo la progresión del ciclo celular, mientras que cambios en otros mensajeros revelan una inhibición del proceso apoptótico. Entre los genes que variaron favoreciendo la duplicación celular e impidiendo la apoptosis en este periodo están la ciclina B1 (\uparrow 5.6), ciclina C (\uparrow 7.2), la proteína activadora de Cinasa dependiente de ciclina (CDK5) (\uparrow 3.4), BAD (\downarrow 3.1), BAX (\downarrow 2.7), caspasa 9 (\downarrow 2.3), caspasa 12 (\downarrow 2.8).

En contraste, después de la alimentación (14:00 h), la actividad transcripcional favorece un incremento en la apoptosis y un freno en el ciclo celular. Algunos genes que cambiaron en este tiempo son: Subunidad 26S del proteosoma (\uparrow 22.5), proteína inhibidora 2C de la CDK (\uparrow 10.6), GADD45 (\uparrow 12.3), p21 (\uparrow 7.3), citocromo C (\uparrow 5). Aunque los datos obtenidos de microarreglos no son de inicio concluyentes por si solos, si es altamente sugestivo de ciertas tendencias experimentales que conjuntos de genes varíen de manera coordinada.

La actividad de timidina cinasa, una enzima marcadora de la fase S del ciclo mitótico, indica que los animales bajo el HRC, presentan una actividad aumentada de 4 veces a las 08:00h y 8 veces a las 14:00h; en estos grupos experimentales es comparable al aumento que ha sido reportado en hígados en regeneración 24 h después de haber sido practicada una hepatectomía parcial del 66%; Sugiriendo que la situación metabólica en que el ciclo celular se manifiesta en el hígado durante el HRC difiere de manera significativa de las condiciones presentes en el

grupo *Ad Libitum*. La presencia del PCNA detectada por inmunohistoquímica y por western blot en muestras de hígado de animales HRC reafirma lo anterior.

Wu y colaboradores en el 2004 demostraron que los horarios de alimentación modifican el crecimiento tumoral. Experimentos realizados en ratones machos B6D2F₁ a los que se les inocularon masas tumorales de osteosarcoma en ambos flancos y de forma aleatoria se dividieron en uno de tres grupos: *ad Libitum*, con acceso las 24h; restringidos de 6 h de acceso en el periodo de luz; restringidos pero durante el periodo de oscuridad (105).

A los trece días se extrajeron los tumores y se observó que en los animales con restricción los tumores crecieron menos comparados con el grupo *Ad Libitum*; además el efecto fue mayor en ratones que se alimentaron durante el día. Concluyendo que las horas de acceso y el horario generan cambios de sincronización circadiana que retrasan el crecimiento tumoral.

3 HIPÓTESIS

El horario de restricción calórica (HRC) (2 horas de acceso al alimento por día) genera un efecto protector durante la inducción de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma con DEN en ratas.

4 OBJETIVOS

Estudiar el efecto de la sincronización por alimento en la inducción y desarrollo de la fibrosis y cirrosis, seguido de HCC promovidos por 4 meses de administración semanal de DEN.

4.1 Objetivos particulares

- Caracterizar el desarrollo del HCC mediante la cuantificación del número y tamaño de áreas neoplásicas.
- Caracterizar histológicamente la fibrosis hepática y las propiedades celulares mediante las técnicas histológicas de Tricrómica de Masson y Hematoxilina-Eosina.
- Cuantificar los niveles de marcadores de daño hepático en sangre: Alanino Amino Transferasas (ALAT) y Aspartato Amino Transferasa (ASAT), bilirrubina directa e indirecta y albúmina, entre otros.
- Cuantificar los niveles de marcadores tumorales en suero: α -fetoproteína (AFP) y Antígeno Carcinoembrionario (CEA) en suero (106).
- Caracterizar la ritmicidad del reloj molecular hepático por la cuantificación de la proteína reloj Per1 (asa negativa) y Bmal1 (asa positiva) (97,107).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se usaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 200 ± 20 g al inicio del experimento. Las ratas se alojaron en cuartos con una temperatura de 22° C y con ciclos de luz/oscuridad de 12:12 (encendido de la luz a las 8:00 a.m.) e intensidad de 350 lux. Como periodo de aclimatación, las ratas se mantuvieron en condiciones de libre acceso al alimento y agua durante tres días.

Los tratamientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética del Instituto de Neurobiología y se realizaron siguiendo la guía para el cuidado y uso de animales en experimentación biomédica, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y conforme a los estándares de ética a nivel internacional propuestos por Portaluppi y colaboradores en 2008 (108).

5.2 Diseño experimental

Las ratas fueron asignadas de forma aleatoria en uno de los siguientes grupos experimentales: Grupo **AL** con ratas sanas y acceso al alimento de forma *Ad Libitum* (libre acceso al alimento durante 24 horas). El grupo con ratas sanas y un horario de restricción al alimento (**HRC**) el cual consiste en limitarles el acceso al alimento por un periodo de 2 h (12:00 a 14:00 h) de forma manual. El grupo de ratas tratadas con DEN y acceso al alimento de forma *Ad Libitum* (**AL+DEN**). El grupo de ratas tratadas con DEN y un horario de restricción al alimento (**HRC+DEN**). Todos los grupos fueron alimentados con dieta 5001 para roedores (LabDiet, Brentwood, Missouri, USA). Los resultados mostrados en el presente trabajo son la suma de 4 repeticiones de experimentos con un número final de ratas para cada grupo de: AL, n=9; AL+DEN, n=19; HRC, n=9; HRC+DEN, n=23; con una (n) mínima de 4 animales por grupo en los diferentes experimentos.

5.3 Tratamiento con Dietilnitrosamina (DEN).

Los grupos control (ratas sanas AL y HRC) recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) 1 vez por semana de buffer salino de fosfatos (PBS) durante 16 semanas. Las ratas tratadas con DEN (Sigma-Aldrich, México. N0756) recibieron una inyección i.p. semanal de 50 mg/kg durante 16 semanas; seguido de un periodo de dos semanas sin dosis de DEN para evitar los daños agudos del tratamiento. Se ha demostrado que el tratamiento crónico del DEN induce cirrosis a las primeras 12 semanas y HCC a las 16 semanas de tratamiento (89).

5.4 Somatometría e ingesta de alimento

La ingesta de alimento fue cuantificada de forma manual una vez por semana a las 14:00 h; asegurándose de abarcar un periodo de 24 h en los grupos con acceso *Ad Libitum* (AL y AL+DEN) y 2h de acceso en los grupos con horario de restricción calórica (HRC y HRC+DEN). Para registrar la ganancia de peso, las ratas se pesaron una vez por semana, durante las 18 semanas del experimento. El índice de Lee es un parámetro usado y aceptado para evaluar la masa corporal en ratas, que fue calculado al final del experimento. Este índice fue realizado siguiendo el protocolo reportado por Carmona-Alcocer y col. en el 2012 (109).

5.5 Pruebas sanguíneas

Las ratas se sacrificaron por decapitación entre las 10:00 y las 12:00 h, tomando el periodo justo antes del acceso al alimento en los grupos HRC y HRC+DEN. La sangre periférica se colectó en tubos Vacutainer para obtener suero. En el suero se realizaron las mediciones de prueba de funcionamiento hepático, química sanguínea y marcadores tumorales. Las pruebas en sangre se realizaron siguiendo las técnicas estandarizadas para el área clínica, a través de espectrofotometría.

Los marcadores tumorales usados fueron:

-La AFP es una proteína producida por el hígado y el saco vitelino de un feto durante el embarazo. Los niveles de AFP disminuyen poco después del nacimiento. Los niveles de AFP superiores a lo normal pueden deberse al desarrollo de HCC.

-La enzima Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) se encuentra en altos niveles en el hígado (además de otros órganos como riñones, páncreas, corazón y cerebro) y es usado, junto con la prueba de funcionamiento hepático para detectar enfermedades del hígado o las vías biliares como la cirrosis y HCC.

-El antígeno carcinoembrionario (CEA por sus siglas en inglés) es una proteína que normalmente se encuentra en el tejido de un feto en el útero. El nivel sanguíneo de esta proteína desaparece o se vuelve muy bajo después del nacimiento. En los adultos, un incremento de CEA es relacionado con reincidencia de cáncer además de que se ha relacionado con la capacidad metastásica en diferentes tipos de tumores (110–112).

Estos marcadores en conjunto pueden dar un panorama de cómo se comportan ambas enfermedades en nuestros tratamientos (68)

5.6 Evaluación macroscópica

El hígado se extrajo, se pesó y se tomaron fotos para realizar la evaluación macroscópica y microscópica. Cabe señalar que ambas valoraciones fueron realizadas con apoyo de la Dra. María de Jesús Guerrero Carrillo, patóloga con una amplia experiencia; estas valoraciones se realizaron con método de ciego (La Dra. desconocía a qué grupo pertenecían las muestras).

5.6.1 Evaluación macroscópica de la cirrosis y HCC

Los hígados se evaluaron de forma macroscópica tanto para las zonas cirróticas como los tumores siguiendo estándares establecidos (113,114). El daño cirrótico se evaluó numerando los 6 lóbulos de cada hígado y dándole un porcentaje correspondiente de toda la masa hepática a cada uno de los 6 lóbulos.

Una vez que se identificó el tamaño (porcentaje de cada lóbulo de la masa total) se evaluó el grado de daño cirrótico en todos los lóbulos representado en 4 grados: Grado 0: corresponde a hígados de ratas tratadas con DEN pero que no presentan daño macronodular (nódulos que se perciben a simple vista); Grado I (micronodular): son hígados en los que son evidentes los nódulos cirróticos menores a 3 mm; Grado II (nódulos medianos): son hígados que presentan nódulos bien definidos que van de 3 a 5 mm. Grado III (macronodular): son hígados que presentan nódulos bien definidos mayores a 5 mm (**Fig.13**).

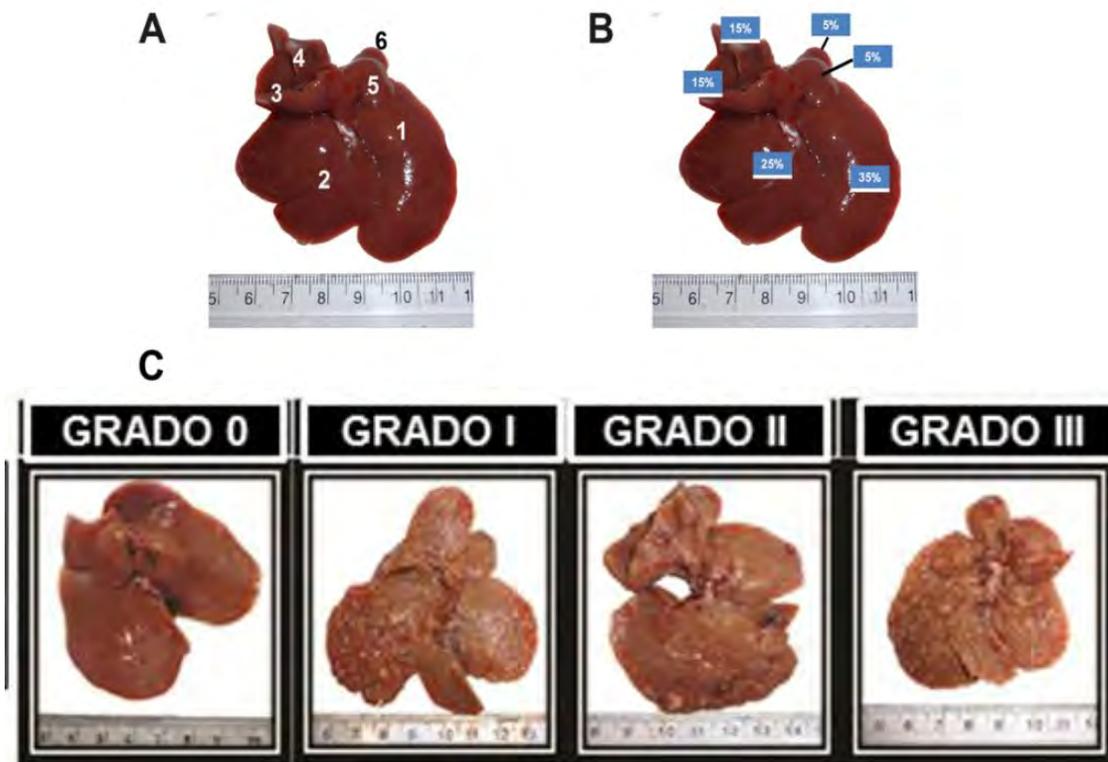


FIGURA13: Metodología usada para la evaluación de daño cirrótico. A) La numeración de los diferentes lóbulos hepáticos. B) Porcentaje representativo de la masa total, correspondiente de cada lóbulo. C) Grados de daño cirrótico evaluado a nivel macroscópico.

La evaluación del daño neoplásico (HCC) se realizó midiendo en las fotos el diámetro mayor de las masas tumorales. El HCC puede presentarse en 4 diferentes formas: a) Uninodular: tumor bien definido decoloración blanquecina

que pueden tener tonalidades rojas por la alta irrigación y solo se encuentra uno en todo el hígado. b) Multinodular: tumores bien definidos de color blanquecino y pueden estar en uno o más lóbulos. c) Masivo: Es un tumor de gran tamaño que puede abarcar desde un 50% hasta sustituir la totalidad de uno de los lóbulos. d) Difuso: Son múltiples tumores muy pequeños que se extienden de forma homogénea en los lóbulos hepáticos. Esta condición micronodular puede ser confundida con áreas cirróticas (114) (**Fig. 14**).

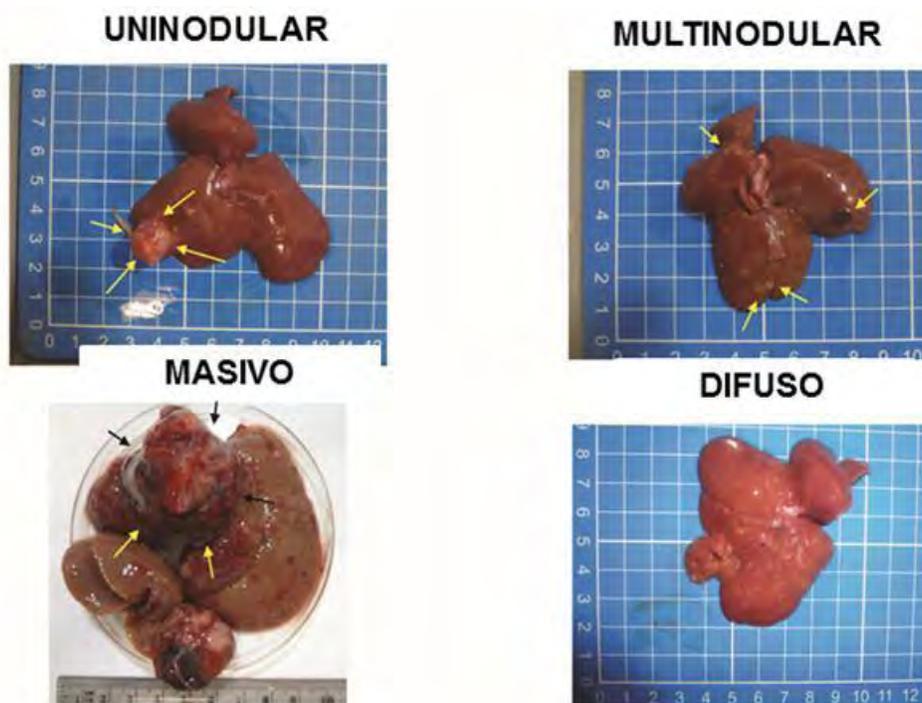


FIGURA 14: *Diferentes tipos de HCC. Se observan los diferentes tipos de tumores que se presentaron en este estudio.*

5.7 Evaluación histológica

Para la evaluación histopatológica se obtuvieron muestras de secciones de hígado sano en los grupos AL y HRC. En los grupos tratados con DEN se obtuvieron zonas cirróticas y de HCC.

5.7.1 Histopatología

Se obtuvieron fragmentos de 1-3 mm³ y se fijaron en formalina al 10%, para después embeberlos en bloques de parafina y obtener cortes de 7 micras en micrótopo. Los cortes se usaron para realizar las tinciones de Hematoxilina & Eosina (H&E) y Tricrómica de Massón siguiendo las especificaciones de Lee, 1968 (115). La tinción de H&E se usó para evaluar la integridad y arquitectura tisular; para evaluar a nivel citológico la integridad de hepatocitos sanos, cirróticos y de HCC, siguiendo criterios estándar (113,114,116–120) (**Fig. 15**).

La tricrómica de Massón es una tinción que se usa para teñir los depósitos de colágena de color azul, evaluar el grado cirrótico mediante el grosor y la invasión del lobulillo hepático por parte de las fibras de colágena.

Se realizó también análisis de microscopia electrónica, usada para observar la ultraestructura (organelos) de los hepatocitos. Esta técnica se realizó siguiendo el protocolo de Martínez-Alfaro y col., 2014 (121).

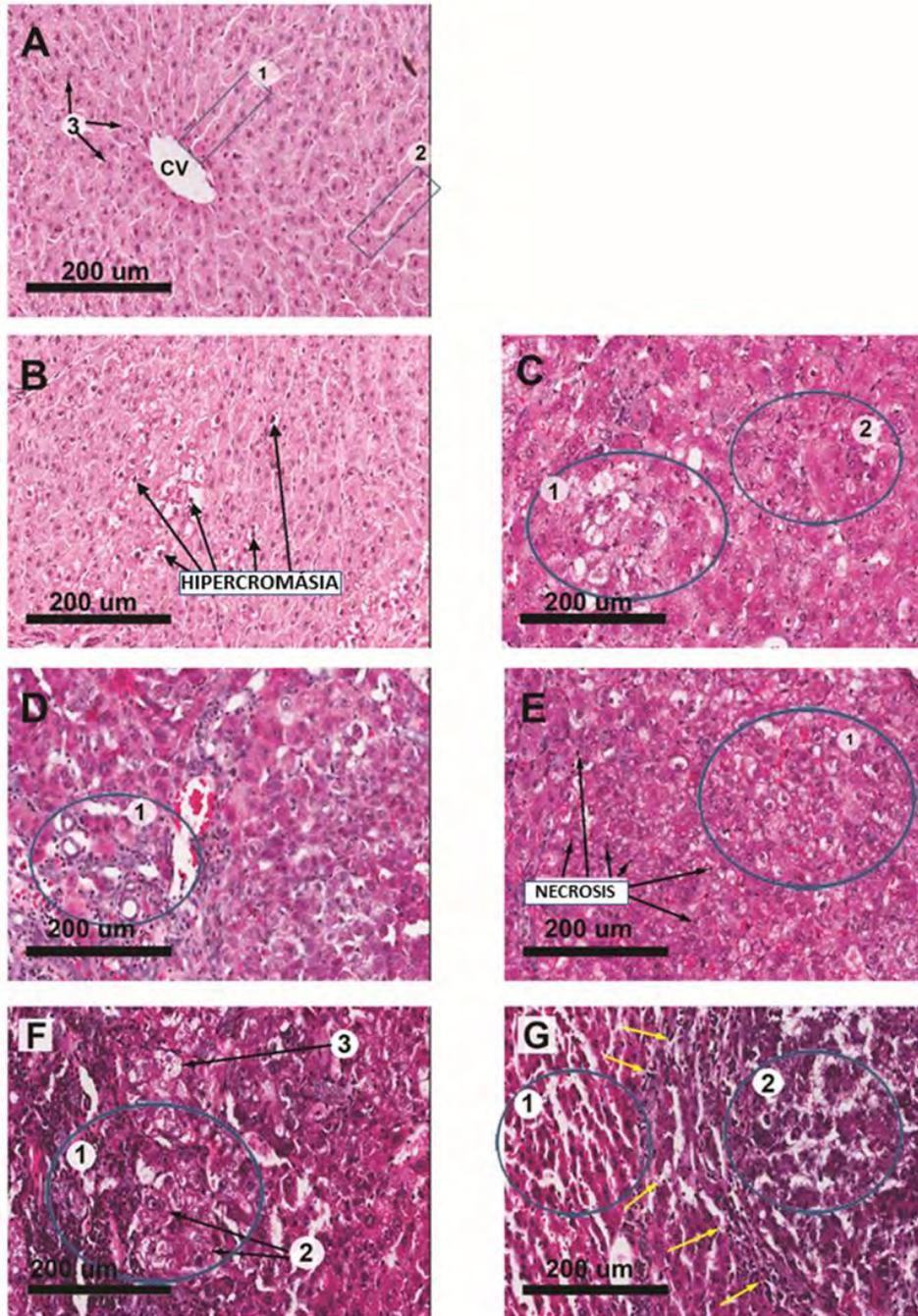


FIGURA 15: CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS. (A) Características citológicas de los hepatocitos en un hígado sano. Vena central (CV), cordones de hepatocitos (recuadro A1), sinusoides (recuadro A2), hepatocitos sanos con citoplasma eosinófilo. (B) Área cirrótica con hepatocitos que muestran hiper Cromasia (flechas negras). (C) Área cirrótica con hepatocitos que muestran vacuolización (círculo C1), anisocitosis (círculo C2). (D) Área cirrótica con hiperplasia de ductos biliares. (E) Área de hiper celularidad (círculo E1) y área de necrosis. (F) Área de pleomorfismo celular (círculo F1), células con pérdida de la relación núcleo/citoplasma marcado con flechas negras (2), hepatocitos con vacuolización marcado con flechas negras (3). (G) Área de separación entre tumor (derecha) y área cirrótica (izquierda) indicado por flechas amarillas. Se muestra un ejemplo células con apariencia hepatocítica (+++) (1) y células con pérdida de apariencia hepatocítica (2).

5.8 Metabolismo del DEN

La bioactivación del DEN se lleva a cabo principalmente en el hígado, ya que la concentración del citocromo *Cyp2e1* es mayor. La transcripción del gen *Cyp2e1* se evaluó a través de RT-qPCR. Uno de los mecanismos por los que el DEN produce daño, es la generación de especies reactivas de oxígeno que a su vez induce estrés oxidativo. Las técnicas de dienos conjugados y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (lipoperoxidación) se usaron para evaluar el estrés oxidativo inducido por el metabolismo del DEN

5.8.1 Análisis del RT-qPCR

El ARN total se aisló mediante la técnica estándar de trizol (Thermo Fisher Scientific, USA). El cDNA para *Cyp2e1* fue formado a partir de 1 µg del total de ARN y con la transcriptasa reversa M-MVL (Cat. 28025013) siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). El qPCR se realizó siguiendo el protocolo TaqMan_Master Mix, usando *Cyp2e1* (Rn00580624_m1) y β-actina (Rn00667869_m1), siguiendo las instrucciones del fabricantes en el software Rotor Gene Corbett 6000. La expresión relativa se calculó por medio de análisis matemático usando $2^{-\Delta Ct}$, usando el grupo AL como calibrador de la condición alimenticia para el grupo HRC y para la condición patológica para los demás grupos (AL+DEN y HRC+DEN) (122).

5.8.2 Lipoperoxidación

Las técnicas para medir lipoperoxidación a través de dienos conjugados y de TBARs se realizaron en muestras de hígado sano, áreas cirróticas y tumorales, siguiendo protocolos reportados con anterioridad por Aguilar-Delfín y col., en 1996 (123).

5.9 Western blot

Para realizar la técnica de western blot, primero se colectaron fragmentos de ~1 g en hígado sano y zonas cirróticas. En el caso de los tumores se obtuvieron las

masas completas y se procesaron según su peso. Siguiendo el protocolo descrito previamente por Martínez-Merlos y Díaz-Muñoz en 1997 las muestras se homogenaron (124), usando coctel de inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

La concentración de proteína se realizó siguiendo el método estándar de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Se cargaron 100 µg de cada muestra en geles de 12% de poliacrilamida y se realizó la electroforesis. Luego se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se incubaron en diferentes anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C.

Los anticuerpos primarios usados fueron: Anti- α 1-Fetoproteína (ab46799, Abcam, CA, USA) con una dilución de 1:1000, anti-PER1 (PA1-524, Thermo scientific, Rockford IL, USA) con una dilución de 1:100, anti-BMAL1 (ab3350, Abcam, CA, USA) con una dilución de 1:500, anti-CLOCK (PA1-520, Thermo scientific, Rockford IL, USA) con una dilución de 1:200 y anti- β -actina (4967, Cell Signaling, USA) con una dilución de 1:1000.

Las membranas se lavaron con PBS y se incubaron por 2 h a 4°C con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina: donkey anti-mouse (sc-2320, Santa Cruz, CA, USA) a una dilución de 1:1000 y donkey anti-rabbit (ab97061, ab46799, Abcam, CA, USA) a una dilución de 1:4000. Las bandas se visualizaron con un kit de sustrato para fosfatasa alcalina (Bio-Rad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó con el programa Image Lab.Ink program.

5.10 Imágenes

Las imágenes de la microscopia se tomaron con el programa Image-Pro Plus 6.0 a diferentes aumentos para su análisis histopatológico (20X y 40X).

5.11 Estadística

La comparación de los grupos se realizó de la siguiente manera: a) entre grupos sanos AL y HRC; b) grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN) comparados con sus grupos controles sanos (AL y HRC); c) Se realizó una comparación entre los grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN).

El análisis estadístico consistió en ANOVA de dos Vías con $p < 0.05$ para la ganancia de peso que se realizó durante 18 semanas. Para las demás mediciones que se realizaron solo al final del experimento se realizó *t-student* con $p < 0.05$, seguido del análisis post-hoc de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5 y las gráficas se realizaron con el programa Sigma Plot versión 10.0

6 RESULTADOS

6.1 Somatometría

6.1.1 Influencia del HRC en la ganancia de peso en ratas sanas

El protocolo de HRC promovió una disminución de ~36% en la ingesta promedio por día (**Fig. 16B**) generando una disminución de ~28% en la ganancia de peso al final del experimento (semana 18) (**Fig. 16A**), se indujo también una disminución de ~6% en el índice de Lee (**Fig. 16C**).

6.1.2 El tratamiento con DEN promueve una reducción de peso

El grupo AL+DEN presentó una disminución de peso comparado con el grupo sano AL, siendo de ~11% en la semana 7 (semana a partir de la cual las diferencias son significativas) y en la semana 18 terminó con una disminución de 12% (**Fig. 16A**). En promedio el grupo AL+DEN tuvo una disminución en el promedio de la ingesta diaria de 6% comparado con el AL (**Fig. 16B**), pero sin presentar cambios en el índice de Lee (**Fig. 16C**).

Por otro lado el grupo HRC+DEN tuvo una disminución en la ganancia de peso comparado con su control sano (grupo HRC), el cual fue de 12% y 17% menos en las semanas 11 y 18 respectivamente (**Fig. 16A**). El consumo de alimento también fue de 16% menos (**Fig. 16B**), sin presentar cambios en el índice de Lee (**Fig. 16C**).

6.1.3 El HRC protege parcialmente la hepatomegalia

Los grupos tratados con DEN desarrollaron hepatomegalia y esplenomegalia, señales características del desarrollo del proceso cirrótico: en el grupo AL+DEN la relación hígado/peso corporal fue de 180% mayor en comparación con el grupo AL. En contraste, en el grupo HRC+DEN la relación peso hígado/peso corporal fue de 165% mayor en comparación con el grupo HRC. Comparando los grupos tratados con DEN hay una disminución significativa en el grupo HRC comparado con el grupo AL+DEN de un 15% (**Fig. 16D**). La esplenomegalia se desarrolló de igual manera en los grupos tratados con DEN (**Fig. 16E**).

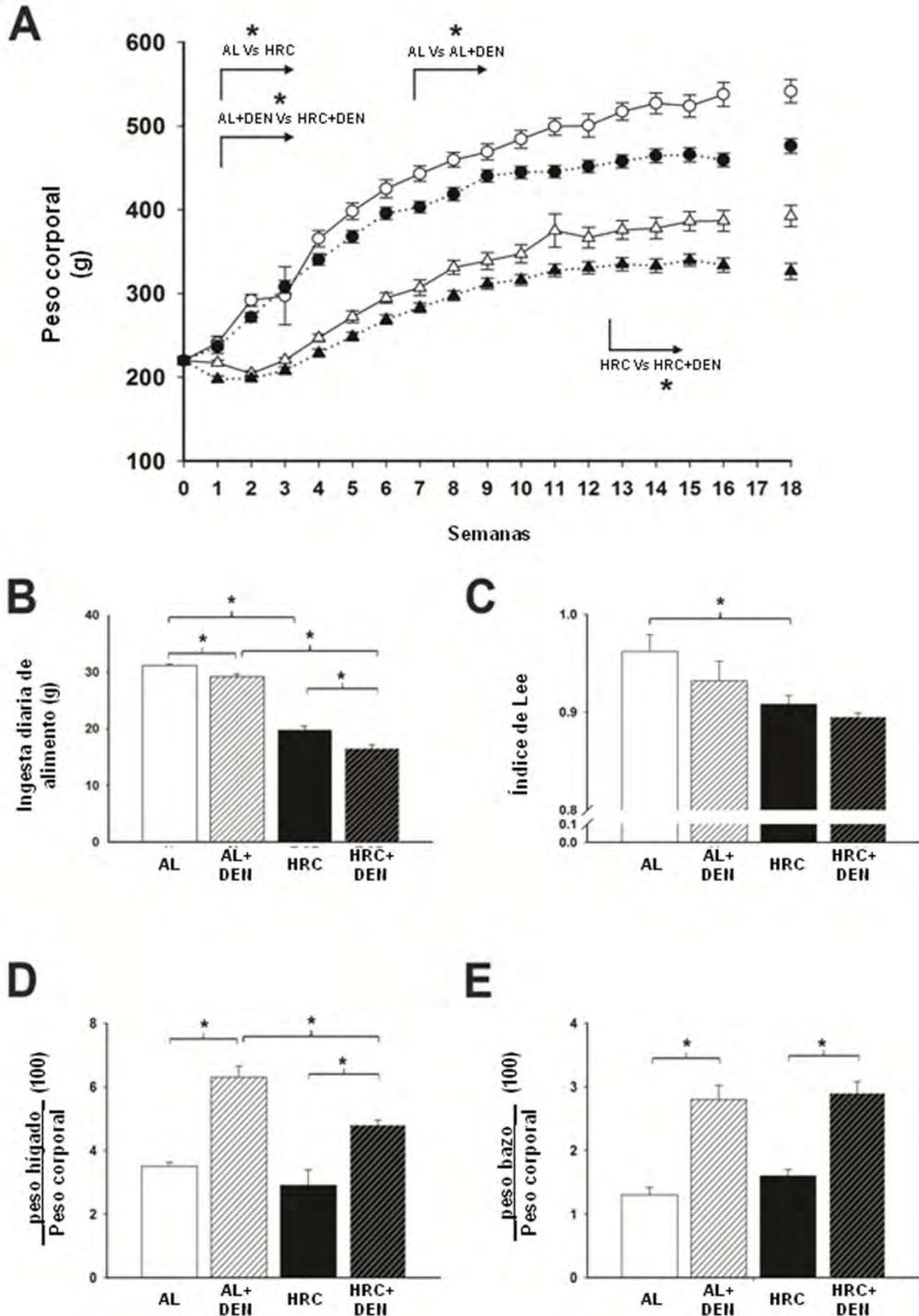


FIGURA 16: SOMATOMETRÍA. (A) Peso corporal en gramos a lo largo de 18 semanas que duró el protocolo experimental. Los círculos blancos representan el grupo sano AL (o), los círculos negros representan el grupo AL+DEN (●). Los triángulos blancos representan el grupo sano HRC (Δ). Los triángulos negros representan al grupo HRC+DEN (▲). Las diferencias significativas se representan con el asterisco (*). Las flechas negras marcan la semana a partir de la cual se considera que hubo diferencias entre los grupos. Las gráficas de barras representan el promedio ± EE (error estándar poblacional). Las barras blancas representan al grupo AL, las barras blancas con líneas representan al grupo AL+DEN, las barras negras representan al grupo HRC y las barras negras con líneas representan al grupo HRC+DEN. (B) Promedio diario de ingesta de alimento en gramos. (C) Índice de Lee. (D) Hepatomegalia. (E) Esplenomegalia. Las diferencias estadísticas se indican con asterisco (*). El análisis de ANOVA de 2 VÍAS ($P < 0.05$) fue usado para el panel (A) y el análisis de t-student ($P < 0.05$) fue usado en los paneles (B), (C), (D) y (E).

6.2 Química sanguínea y prueba de funcionamiento hepático

6.2.1 El HRC preserva normales los niveles en sangre

El protocolo de HRC afectó a la baja únicamente los niveles de nitrógeno ureico (24%), comparado con el grupo AL (**Tabla 2F**). En contraste los niveles de hemoglobina corpuscular media (HCM) mostraron un incremento de 24% en el grupo HRC (**Tabla 3B**), a pesar de que la ingesta de alimento fue menor. Esto sugiere que el estado nutricional del grupo HRC no se ve alterado por la disminución en la ingesta calórica.

6.2.2 El DEN promueve un estado de cirrosis compensado

El grupo AL+DEN tuvo un incremento de 2.2 veces en las bilirrubinas totales, conformada por un 68% a la bilirrubina directa y un 32 % a la bilirrubina indirecta comparado con el grupo AL (**Tabla 2A**); indicando que la cirrosis alteró el proceso de excreción del hígado. Los porcentajes de bilirrubinas directa e indirecta indican que el grupo AL+DEN presenta una cirrosis compensada. Los parámetros usados para diagnosticar daño hepático tuvieron incrementos en el grupo AL+DEN comparado con el grupo sano AL; la fosfatasa alcalina (AP por sus siglas en Inglés) tuvo un incremento de 1.8 veces, la ALT 2.1 veces, la AST aumentó 1.5 veces y la GGT aumentó 3.9 veces (**Tabla 2D**).

En este grupo no se mostraron cambios en las funciones de coagulación y biocinética del hígado (**Tabla 2C**). Estos datos sugieren que la cirrosis desarrollada en el grupo AL+DEN se considera compensada.

La fracción roja en sangre mostró una reducción en el no. de eritrocitos (6%), concentración de hemoglobina (11%) y de hematocrito (12%) (**Tabla 3B**) indicando un estado comprometido a nivel nutricional de las ratas tratadas con DEN y acceso *Ad Libitum* al alimento.

6.2.3 *El grupo HRC+DEN muestra mayores niveles de hiperbilirrubinemia*

El grupo HRC+DEN mostró cambios similares en la mayoría de los parámetros de prueba de funcionamiento hepático comparado con el grupo AL+DEN. Se presentó un cambio importante en los niveles de bilirrubinas circulantes, ya que el grupo HRC+DEN presentó un incremento de 4.6 veces la concentración, comparado con el grupo sano HRC. La bilirrubina directa representó un 75% y la bilirrubina indirecta un 25% del total circulante. Indicando una hiperbilirrubinemia mayor al grupo AL+DEN pero sin perder la relación entre la directa e indirecta (**Tabla 2A**).

Los parámetros usados para evaluar daño hepático mostraron incremento en el grupo HRC+DEN comparado con el grupo sano HRC. La AP se incrementó 2.2 veces (**Tabla 2A**), la ALT 2.5 veces, la AST tuvo un incremento de 1.8 y la GGT aumentó 2.2 veces (**Tabla 2D**). No se observaron cambios en las funciones sintética y de coagulación del hígado (**Tabla 2B y 2C**).

Estos datos indican que a pesar de que el grupo HRC+DEN presenta mayores niveles de bilirrubinas circulantes comparado con el grupo AL+DEN, el nivel de daño es similar en ambos; aunado a que se preservan las funciones coagulantes y sintéticas, podemos considerar que también se desarrolla una cirrosis compensada este grupo. Por otro lado, el grupo HRC+DEN no presenta cambios en la fracción roja comparado con su control sano HRC (**Tabla 3B**), indicando que el estado nutricional se preserva a pesar del daño provocado por el DEN y de la disminución en la ingesta calórica.

	AL	AL+DEN	HRC	HRC+DEN	FUNCIÓN	
BILIRRUBINAS TOTALES (mg / dl)	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.02	&	0.15 ± 0.01	0.69 ± 0.08	¥¶
BILIRRUBINA DIRECTA (mg / dl)	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.02	&	0.12 ± 0.01	0.52 ± 0.08	¥¶
BILIRRUBINA INDIRECTA (mg / dl)	0.02 ± 0.004	0.07 ± 0.01	&	0.03 ± 0.01	0.18 ± 0.02	¥¶
FOSFATASA ALCALINA (IU/L)	186 ± 10	327 ± 19	&	162 ± 8	360 ± 20	¥
PROTEÍNAS TOTALES (g/dl)	6.39 ± 0.10	6.70 ± 0.08	&	6.40 ± 0.11	6.89 ± 0.10	¥
ALBÚMINA (g/dl)	2.31 ± 0.33	2.35 ± 0.24		2.53 ± 0.40	2.45 ± 0.19	
GLOBULINA (g/dl)	4.13 ± 0.27	4.35 ± 0.22		3.88 ± 0.34	4.36 ± 0.25	
ReI_A/G	0.65 ± 0.13	0.62 ± 0.09		0.79 ± 0.16	0.65 ± 0.08	
TIEMPO DE PROTROMBINA (segundos)	9.60 ± 0.20	9.04 ± 0.10	&	9.85 ± 0.2	11.5 ± 0.80	¶
ACTIVIDAD (%)	163 ± 9	194 ± 6	&	151 ± 10	108 ± 15	¶
INR	0.84 ± 0.02	0.81 ± 0.02		0.86 ± 0.02	0.99 ± 0.07	¶
ALANINO AMINOTRANSFERASA (IU/L)	112 ± 10	235 ± 15	&	88 ± 40	218 ± 11	¥
ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (IU/L)	274 ± 13	405 ± 29	&	255 ± 21	445 ± 36	¥
GAMA-GLUTAMIL TRANSFERASA (IU/L)	13 ± 2	51 ± 6	&	26 ± 9	57 ± 8	¥
DESHIDROGENASA LÁCTICA (IU/L)	2156 ± 167	1943 ± 116		2303 ± 222	1778 ± 116	¥
COLESTEROL TOTAL (mg/dl)	65 ± 4	133 ± 9	&	74 ± 6	116 ± 8	¥
TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)	124 ± 16	123 ± 9		93 ± 18	81 ± 5	¶
GLUCOSA (mg/dl)	102 ± 5	91 ± 5		90 ± 6	89 ± 5	
UREA (mg/dl)	47 ± 3	48 ± 2		39 ± 2	46 ± 5	
CREATININA (mg/dl)	0.49 ± 0.02	0.51 ± 0.01		0.52 ± 0.02	0.52 ± 0.04	
NITRÓGENO UREICO (mg/dl)	22 ± 1	23 ± 1		19 ± 1	22 ± 2	
ÁCIDO ÚRICO (mg/dl)	2.22 ± 0.04	2.27 ± 0.12		2 ± 0.09	2.28 ± 0.22	
AMONIO(umol/L)	200 ± 13	355 ± 35	&	195 ± 8	361 ± 33	¥

TABLA 2: QUÍMICA SANGUÍNEA Y PERFIL METABÓLICO. Se muestran los valores obtenidos en suero de los grupos AL, AL+DEN, HRC y HRC+DEN. Normalización internacional (INR). Los resultados fueron agrupados en función de excreción, biosíntesis, coagulación, integridad del tejido, metabolismo y nitrógeno del metabolismo. Las diferencias significativas se representan por los siguientes símbolos: (#) AL vs T-CR, (&) AL vs AL+DEN, (¥) T-CR vs T-CR+DEN, (¶) AL+DEN vs T-CR+DEN.

6.2.4 El HRC protege del estado inflamatorio crónico

El grupo AL+DEN tuvo un incremento de 80% en los leucocitos totales comparado con su grupo control AL, inducido por un aumento en los monocitos y granulocitos, los cuales son indicativos de un estado de inflamación crónico (**Tabla 3A**). Por otro lado el grupo HRC+DEN presentó niveles similares de células de la fracción blanca (aunque hubo cambio en los porcentajes pero se consideran dentro del rango sano), comparado con el grupo sano HRC (**Tabla 3A**).

El estado inflamatorio crónico se caracteriza por un incremento en los linfocitos y monocitos, que se reclutan mutuamente.

La restricción alimenticia evitó el establecimiento del estado inflamatorio crónico, este es un importante hallazgo, ya que el estado inflamatorio es una de las principales características necesarias en el establecimiento y desarrollo de la cirrosis y que facilita la progresión hacia HCC; sugiriendo así, que la condición del grupo HRC+DEN es fibrótica.

	AL	AL+DEN	HRC	HRC+DEN		
A						
GLOBULOS BLANCOS ($10^3/\text{mm}^3$)	15 ± 1	27 ± 4	&	11 ± 2	12 ± 1.5	¶
% LINFOCITOS	80 ± 2	67 ± 2	&	82 ± 3	73 ± 2	¥¶
# LINFOCITOS	12 ± 1	17 ± 3		9 ± 2	9 ± 1	¶
% MONOCITOS	11 ± 1	19 ± 0.3	&	10 ± 1	17 ± 1	¥
# MONOCITOS	1.6 ± 0.1	4.8 ± 0.6	&	1 ± 0.2	2 ± 0.3	¶
% GRANULOCITOS	9.5 ± 2	14 ± 2		8 ± 2	10 ± 2	
# GRANULOCITOS	1.5 ± 0.2	3.6 ± 0.4	&	0.8 ± 0.05	1.3 ± 0.2	¶
SERIE BLANCA						
B						
GLÓBULOS ROJOS ($10^9/\text{mm}^3$)	8 ± 0.3	7.5 ± 0.1	&	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.3	
HEMOGLOBINA (g/dl)	14.1 ± 0.5	12.6 ± 0.2	&	14.4 ± 0.3	13.9 ± 0.4	¶
HEMATOCRITO (%)	43 ± 1	38 ± 0.5	&	43 ± 1	41 ± 1	
CCMH (μm^3)	53 ± 1	51 ± 0.4	&	54 ± 0.4	53 ± 0.5	¶
HCM (pg)	17.6 ± 0.1	16.8 ± 0.2	&	18.3 ± 0.1	17.8 ± 0.3	¶
VCM (g/dl)	33 ± 0.4	33 ± 0.2		34 ± 0.2	34 ± 0.5	
ADE (%)	13.6 ± 0.3	12.8 ± 0.2	&	13.6 ± 0.2	12 ± 0.2	¥¶
SERIE ROJA						
C						
PLAQUETAS ($10^3/\text{mm}^3$)	871 ± 57	681 ± 100		877 ± 47	761 ± 62	
PLAQUETOCRITO (H%)	0.65 ± 0.04	0.58 ± 0.10		0.62 ± 0.03	0.56 ± 0.04	
VPM (μm^3)	7.5 ± 0.1	8.3 ± 0.5		7 ± 0.1	7.4 ± 0.3	
PDI (%)	6.8 ± 1	2.2 ± 0.5	&	7.4 ± 0.6	4.3 ± 1	
PLAQUETAS						

TABLA 3: BIOMETRÍA HEMÁTICA. Se muestran los valores obtenidos en suero de los grupos AL, AL+DEN, HRC y HRC+DEN. Los resultados fueron agrupados obtenidos en las series blanca y roja además de las plaquetas. Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH), Hemoglobina corpuscular media (HCM), volumen corpuscular medio (VCM), amplitud de la distribución de eritrocitos (ADE), volumen plaquetario medio (VPM), proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las diferencias significativas se representan por los siguientes símbolos: (#) AL vs T-CR, (&) AL vs AL+DEN, (¥) T-CR vs T-CR+DEN, (¶) AL+DEN vs T-CR+DEN.

6.3 Evaluación del estado cirrótico

6.3.1 El grupo HRC presentó mayor alteración fibrótica a nivel macroscópico.

La evaluación macroscópica mostró que en los hígados de las ratas del grupo AL+DEN el 77% desarrolló cirrosis de grado I y grado II, un porcentaje de 19% no presentó lesiones cirróticas a nivel macroscópico y solo un 4% presentó daño severo del grado III (**Fig. 17A**). En contraste, los hígados de las ratas del grupo HRC+DEN presentaron más acentuado el daño fibrótico macroscópico, 75% desarrolló grados II y III y un 25 % de los hígados mostró grado I.

6.3.2 La evaluación histológica muestra incremento en los depósitos de colágena en el grupo HRC+DEN.

La evaluación a nivel histológico a través de la tinción de tricrómica de Massón, mostró que el 100% de las ratas de ambos grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN) desarrollaron fibrosis en alguno de los diferentes niveles. En el grupo AL+DEN se observó una disminución de los sinusoides y el espacio de disse; los depósitos de colágena fueron evidentes, cubriendo la zona portal del parénquima

hepático e invadiendo las zonas 1, 2 y 3 del acino hepático fragmentándolo y generando micro- y macronodulación. Se observó además hiperplasia y neoformación de los conductos biliares (**Fig. 17B y 17C**).

El grupo HRC+DEN mostró un incremento importante de los depósitos de colágena, en la neoformación de conductos biliares y en la presencia de micronodulación comparado con el grupo AL+DEN. A pesar de que la micronodulación fue mayor en este grupo, la arquitectura tisular y los cordones hepáticos se preservaron (**Fig. 17B y 17C**). Estos datos sugirieron que la colágena se produjo como resultado del daño provocado por el DEN pero no disminuyó el área donde se encontraban hepatocitos vivos, aunado a una ausencia de procesos regenerativos (que serán descritos más adelante).

Los resultados anteriores sugieren que a pesar de tener mayores depósitos de colágena, en el grupo HRC+DEN se puede considerar que solo se presenta un estado fibrótico; por otro lado el grupo AL+DEN muestra rasgos característicos de un estado de cirrosis franca.

A

GRADO FIBROSIS/CIRROSIS	AL+DEN	HRC+DEN
0	19%	0%
I	43%	25%
II	34%	40%
III	4%	35%

B

	AL+DEN	HRC+DEN
COLÁGENA	+++	++++
GROSOR TRABECULAR	++	++++
ESPACIO PORTAL	++	++++
REDUCCIÓN DE LOBULILLOS	++	+++
DISOCIACIÓN DE COORDONES	++++	++

C

	AL+DEN	HRC+DEN
ANISOCITOSIS	++++	++
PLEOMORFISMO CELULAR	+++	++
HIPERCROMASIA	+++	+
ÁREAS DE VACUOLIZACIÓN	+++	+
CITOPLASMA GRANULAR	+++	+
NECROSIS	++++	+
PERDIDA DE INTEGRIDAD	++++	++

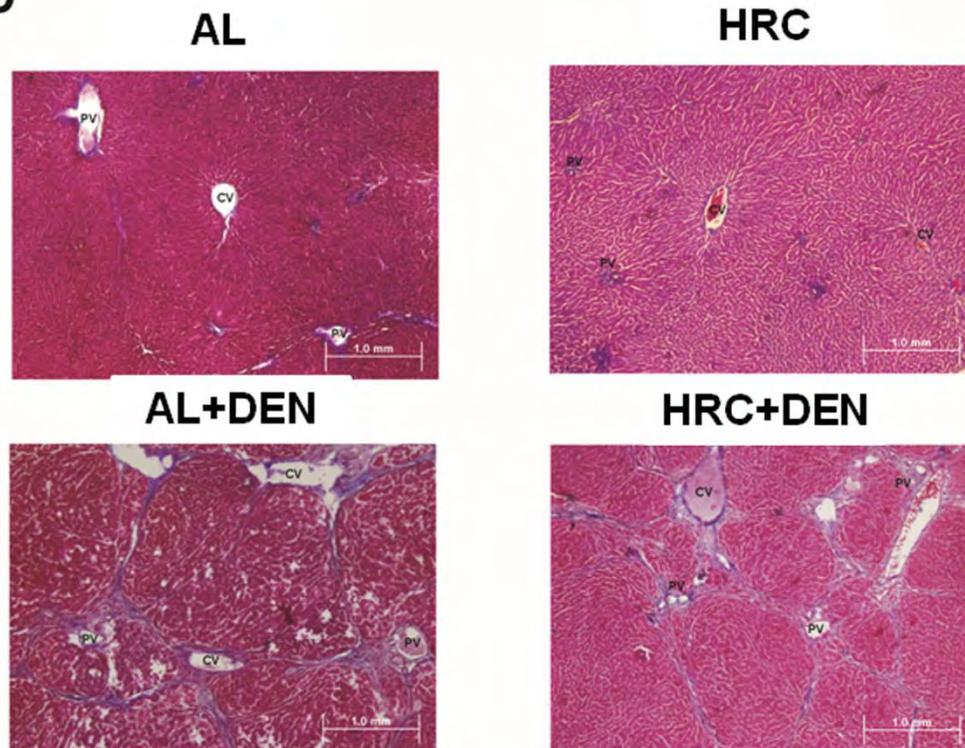
D

FIGURA 17: EVALUACIÓN DE LA CIRROSIS. (A) Evaluación macroscópica de los nódulos fibróticos/cirróticos. Grado 0 corresponde a la ausencia de nódulos bien definidos; Grado I corresponde a micronodulación; Grado II son hígados que presentaron desarrollo micro y macro-nodular; Grado III corresponde a hígados con nódulos macroscópicos. (B) Análisis microscópico e histológico en áreas de fibrosis y cirrosis de los grupos de ratas tratadas con DEN, ambos grupos fueron comparados con los grupos sanos (AL y HRC) y las diferencias fueron marcadas con cruces como una valoración del hígado completo: (+) cambios ligeros con fibras reticulares delgadas y presentes solo en la zona portal, (++) cambios de grado medio con engrosamiento de fibras de colágena y evidentes en la zona portal, (+++) alto grado de daño con mayor engrosamiento de las fibras de colágeno que invaden la zona central desde la zona portal, (++++) cambios muy severos con fragmentación del lobulillo hepático y formación de nódulos delimitados por fibras de colágeno. (C) Evaluación citológica en áreas cirróticas. Los cambios citológicos son representados por cruces: (+) ligeros cambios, (++) moderado, (+++) alto grado de cambios, (++++) muy alto grado de cambios citológicos. (D) Tinción de Tricrómica de Massón que muestra las fibras de colágena teñidas de color azul. Vena central (CV), vena portal (PV). Todas las fotos fueron tomadas con objetivo de 4X.

6.4 Evaluación del desarrollo de HCC

6.4.1 Marcadores séricos de HCC

Los marcadores usados en la clínica para diagnosticar el desarrollo de HCC son la AFP el cual presenta un 100% de especificidad y un 70% de sensibilidad, la GGT que presenta 91% de especificidad y 71% de sensibilidad y son usados para discriminar entre cirrosis y HCC (80).

El CEA es una onco-proteína fetal cuyo incremento en la etapa adulta se da por adenocarcinomas, principalmente colorrectal pero también en hígado, mama, páncreas, entre otros, por lo que su especificidad es reducida. A pesar de ser poco específico, su combinación con parámetros como AFP y GGT se relacionan con metástasis y con reincidencia de cáncer (125).

Los niveles de AFP y GGT se incrementaron de la misma forma en los dos grupos tratados con DEN, los cuales confirman el desarrollo de HCC (**Fig. 18A y 18B**). En contraste, el CEA se incrementó 51% en el grupo AL+DEN mientras que en el grupo HRC+DEN se mantuvo en nivel similar al grupo sano HRC lo que indicaría que los tumores del grupo AL+DEN están en un estado avanzado del proceso carcinogénico y/o agresivo; por el contrario los tumores del grupo HRC+DEN se encuentran en un estado inicial y/o poco agresivo (**Fig. 18C**).

6.4.2 Evaluación macroscópica del HCC

El HCC puede desarrollarse de 4 diferentes formas: a) uninodular, cuando es una única masa, bien definida con aspecto parenquimatoso y que sobresale del tejido circundante; b) multinodular, cuando se presentan más de una masa tumoral, bien definidos con aspecto parenquimatoso; c) masivo, cuando se presentan una o varias masas tumorales de gran tamaño que abarcan más del 50% del lóbulo; difuso, cuando se presentan una gran cantidad de masas tumorales bien definidas pero pequeñas de forma distribuida a lo largo de todo el hígado, este tipo de desarrollo de HCC puede confundirse con las zonas cirróticas.

El análisis macroscópico mostró que el 100% de los hígados de los grupos AL+DEN y HRC+DEN mostraron algún tipo de crecimiento tumoral. El 75% de las

masas tumorales en el grupo AL+DEN son multinodulares y 15% son de tipo difuso (**Fig. 18D y 18E**). En contraste, en el grupo HRC+DEN un 62% de los hígados presentaron HCC de tipo difuso y 33% del tipo multinodular (**Fig. 18D y 18E**). Los tumores masivos sólo se presentaron uno en cada grupo (AL+DEN y HRC+DEN).

Son poco estudiadas las características del hepatocarcinoma difuso ya que al tener el fenotipo similar a la cirrosis, en la mayoría de los casos es diagnosticado en estadios muy avanzados o *post mortem*. De forma muy clara el HRC modificó el tipo de HCC que se desarrolló y por ésta razón el estudio histopatológico tomó más relevancia para el presente estudio, ya que el grado de desdiferenciación celular (transformación maligna) es más importante comparado al tipo macroscópico de desarrollo tumoral.

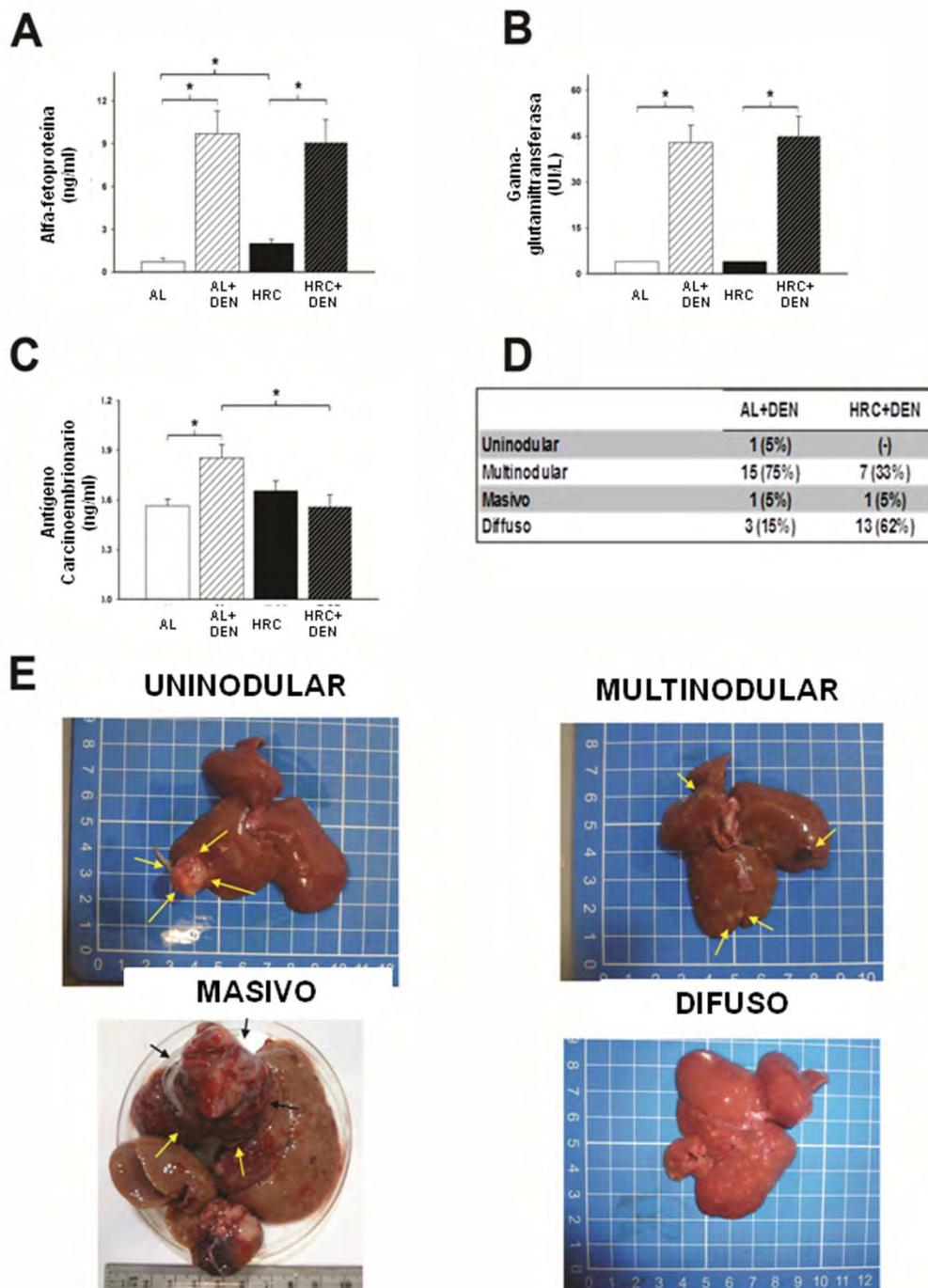


FIGURA 18: EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE HCC. (A) Concentración de AFP en suero de los grupos sanos (AL y HRC) y tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN); Las barras representan el promedio \pm EE (error estándar poblacional). (B) Concentración en suero de GGT en grupos sanos (AL y HRC) y tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN); Las barras representan el promedio \pm EE (error estándar poblacional). (C) Concentración en suero de CEA en grupos sanos (AL y HRC) y tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN); Las barras representan el promedio \pm EE (error estándar poblacional). (D) Evaluación macroscópica del HCC en los cuatro diferentes tipos de tumores que se desarrollaron: Uninodular, hígados que presentaron una sola masa tumoral bien delimitada de color blanquecino y pequeño; multinodular, hígados con dos o más tumores bien delimitados; Masivo, tumor de gran tamaño, bien delimitado que puede abarcar la totalidad de un lóbulo hepático; Difuso, son tumores de pequeño tamaño, poco delimitados y que están diseminados en todo el hígado, una característica de este tipo de tumor es que se puede confundir con zonas cirróticas. (E) Se muestran imágenes representativas de los cuatro tipos de HCC que se desarrollaron.

6.5 Evaluación histopatológica

Como era esperando los hígados de los grupos sanos (AL y HRC) no mostraron diferencias entre ellos; presentándose hepatocitos con citoplasma eosinófilo, con núcleos íntegros que presentaron cromatina activa y nucléolo bien definido (**Fig. 19C**).

6.5.1 Áreas cirróticas

Las áreas cirróticas de los hígados del grupo AL+DEN mostraron amplias zonas con alteraciones citológicas de los hepatocitos, que se representaron desde un 70% hasta el 100% del parénquima. Se observaron hepatocitos pleomórficos y con anisocitosis (evidencias de estado inflamatorio), el citoplasma presentó degeneración glucogénica y lipídica (vacuolas lipídicas). Los núcleos se mostraron con cromatina reactiva y una alta incidencia de núcleos desmembrados, picnóticos y con cariólisis (evidencias de inflamación, necrosis y apoptosis). A nivel tisular se presentó una infiltración de gran magnitud de células linfáticas (correlacionado con la serie blanca (**Tabla 3A, Fig. 19A y 19B**)).

En contraste, el grupo HRC+DEN mostró pocos cambios citológicos, con escasos niveles de infiltración linfocítica (respuesta inflamatoria) y procesos regenerativos (**Fig. 19A y 19B**). Las evidencias histopatológicas y séricas sugieren que los hígados del grupo HRC+DEN presentan muerte celular por las dosis semanales de DEN generándose la cicatrización, pero la recuperación homeostática es inmediata, evitando el estado inflamatorio, la proliferación exacerbada y cambios citológicos.

6.5.2 Tumores de HCC

Las zonas tumorales en el grupo AL+DEN se presentaron bien delimitadas por tejido conectivo y presentaron altos niveles de infiltración linfocítica, los tumores presentaron estadios avanzados de dediferenciación con arreglos trabeculares y sólidos. Las células transformadas presentaron una disminución en la relación núcleo/citoplasma, con núcleos grandes y nucléolos prominentes, además

presentaron citoplasma granular y basofílico con degeneración principalmente glucogénica (**Fig. 19A, 19B y 19C**).

En contraste, las zonas tumores del grupo HRC+DEN se presentaron como masas bien delimitadas por tejido conectivo y con escasa infiltración linfocítica. Estos tumores presentaron poblaciones de células bien diferenciadas, moderadamente diferenciadas y pobremente diferenciadas; siendo las bien diferenciadas las poblaciones más frecuentes en este tratamiento. Estos tumores se calificaron como anaplásicos y pleomórficos, además de que preservaron características tisulares similares al tejido cirrótico (**Fig. 19A, 19B y 19C**).

Estos datos mostraron que el HRC previno el proceso de transformación neoplásica manteniendo las masas tumorales en estadios tempranos de la transformación; siendo consistente con los bajos niveles del CEA en el grupo HRC+DEN y los altos niveles en el grupo AL+DEN (**Fig. 18C**).

A

	AL+DEN	HRC+DEN
TRABÉCULAS	++	+
PSEUDOACINOS	+	
NECROSIS	+++	
CÉLULAS INFLAMATORIAS	+++	+

B

	AL+DEN	HRC+DEN
CITOPLASMA GRANULAR	++++	+
ANISOCITOSIS		+++
INCREMENTO RELACIÓN NÚCLEO/CITOPLASMA	++++	+
FENOTIPO HEPATOCÍTICO		+++
VACUOLAS CITOPASMÁTICAS		+++
HIPERCELULARIDAD	++++	+
COHESIVIDAD EPITELIAL	++++	+
PLEOMORFISMO	+	++

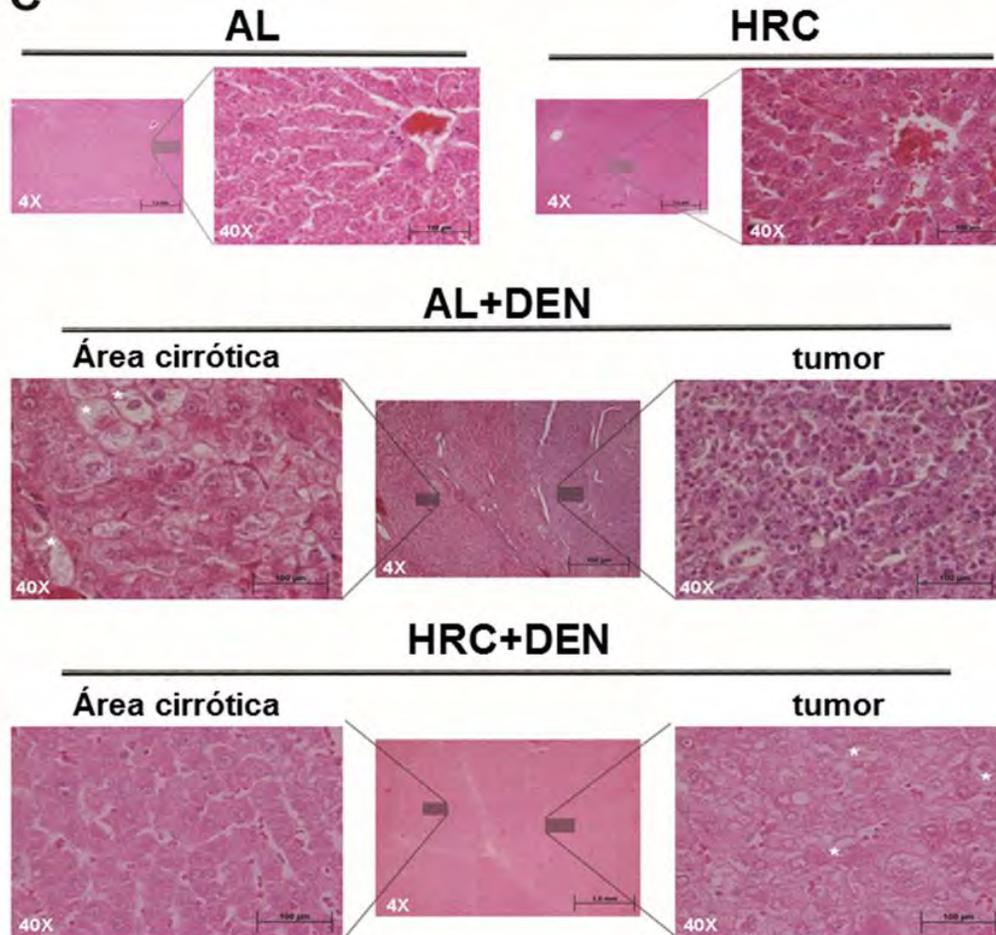
C

FIGURA 19: EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL HCC. (A) Evaluación microscópica de las características tisulares de las masas tumorales en los grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN). **(B)** Evaluación citológica de las masas tumorales en los grupos AL+DEN y HRC+DEN. Los cambios en los paneles A y B se presentaron con cruces: (+) cambios ligeros, (++) cambios moderados, (+++) cambios avanzados, (++++) cambios muy avanzados. La ausencia de cruces indica que no se presentaron cambios. **(C)** Fotos de tejidos representativos de los 4 grupos por tinción de H&E. Los grupos sanos (AL y HRC) se ubican en la parte superior del panel C con dos diferentes aumentos (4x y 40X). El grupo AL+DEN se ubica al centro del panel C, mostrando en el centro una foto panorámica (4X) y a la izquierda un aumento (40X) en el área cirrótica y a la derecha un aumento (40X) de un tumor. En la parte inferior del panel C se muestra en el centro una foto panorámica (4X) del grupo HRC+DEN, a la izquierda un aumento (40X) en el área cirrótica y a la derecha un aumento (40X) de un tumor. (*) Anisocitosis.

6.5.3 Hemangiomas cavernosos

A modo de serendipia, el tratamiento con DEN indujo la formación de hemangiomas cavernosos de igual manera en los dos grupos tratados con DEN. Los hemangiomas son tumores benignos de origen endotelial, el tipo cavernoso está formado por grandes espacios que se encuentran totalmente irrigados y le dan apariencia esponjosa y de color rojizo (**Fig. 20**).

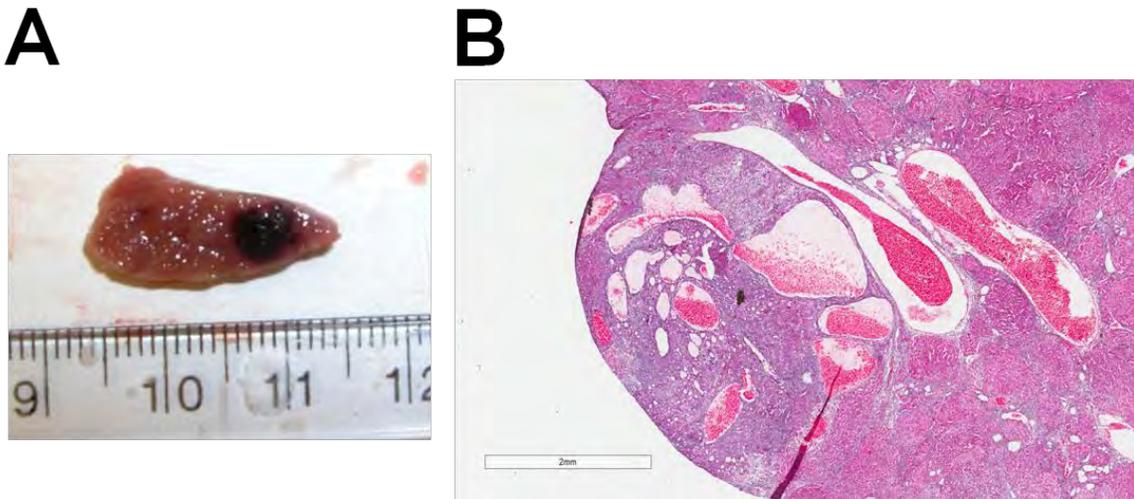


FIGURA 20: HEMANGIOMAS. (A) Hemangioma a nivel macroscópico. (B) Hemangioma a nivel histológico, donde se observan los espacios de irrigación con glóbulos rojos (puntillero rojo) (magnificación 4X)

6.6 Evaluación por microscopía electrónica

La microscopía electrónica permite tener un análisis de la ultraestructura celular. En el presente estudio se usó con la finalidad de estudiar los cambios citológicos de una manera más detallada.

Comparando los grupos sanos (AL y HRC), en el grupo AL se observaron mitocondrias con crestas poco evidentes, con áreas sin contenido celular y una baja cantidad de retículo endoplasmático. El grupo HRC presentó mitocondrias íntegras con crestas evidentes. De forma muy clara se observó un incremento del retículo endoplasmático rugoso (RER) con un arreglo de cisternas concéntricas que cubren ~50% del área citoplasmática. En ambos grupos se presentó cromatina reactiva y nucléolo prominente (**Fig. 21**).

6.6.1 Microscopía electrónica de áreas cirróticas

Comparado con hepatocitos sanos, los hepatocitos en las áreas cirróticas del grupo AL+DEN presentaron áreas sin contenido celular abarcando un 30%-60% del citoplasma; mitocondrias pleomórficas con pérdida de integridad de endomembranas; además, presentó menor cantidad de RER comparado con su control sano (AL) y ribosomas libres. También presentaron degeneración lipídica con núcleos picnóticos con indentación y ruptura de la membrana nuclear (**Fig. 20**).

Comparado con hepatocitos sanos, el grupo HRC+DEN presentó un incremento en el número de mitocondrias aunque de menor tamaño, con crestas evidentes e integras. De forma interesante se observó que los hepatocitos tenían también incremento de RER con arreglo concéntrico abarcando hasta un 70% del citoplasma. Los núcleos con menor presencia de indentación membranal, con cromatina reactiva y nucléolos evidentes (**Fig. 20**).

6.6.2 Microscopía electrónica en tumores de HCC

Las células en los tumores de HCC del grupo AL+DEN mostraron una reducción en la relación núcleo/citoplasma, una disminución importante en el número de mitocondrias que mostraron una pérdida de la integridad de las membranas. Estas células mostraron escasa cantidad de RER con alta incidencia de ruptura de las cisternas y rompimiento de la estructura, todo esto comparado con hepatocitos sanos (**Fig. 20**).

Por otro lado el grupo HRC+DEN presentó hepatocitos pleomórficos y bien diferenciados. En este grupo se preservó la presencia de cisternas concéntricas formadas por RER que abracaban hasta un 70% del citoplasma. Mostraron mitocondrias pleomórficas pero con mayor integridad membranal además de núcleos ligeramente indentados con cromatina reactiva y nucléolo evidente, todo esto comparado con hepatocitos sanos (**Fig. 20**).

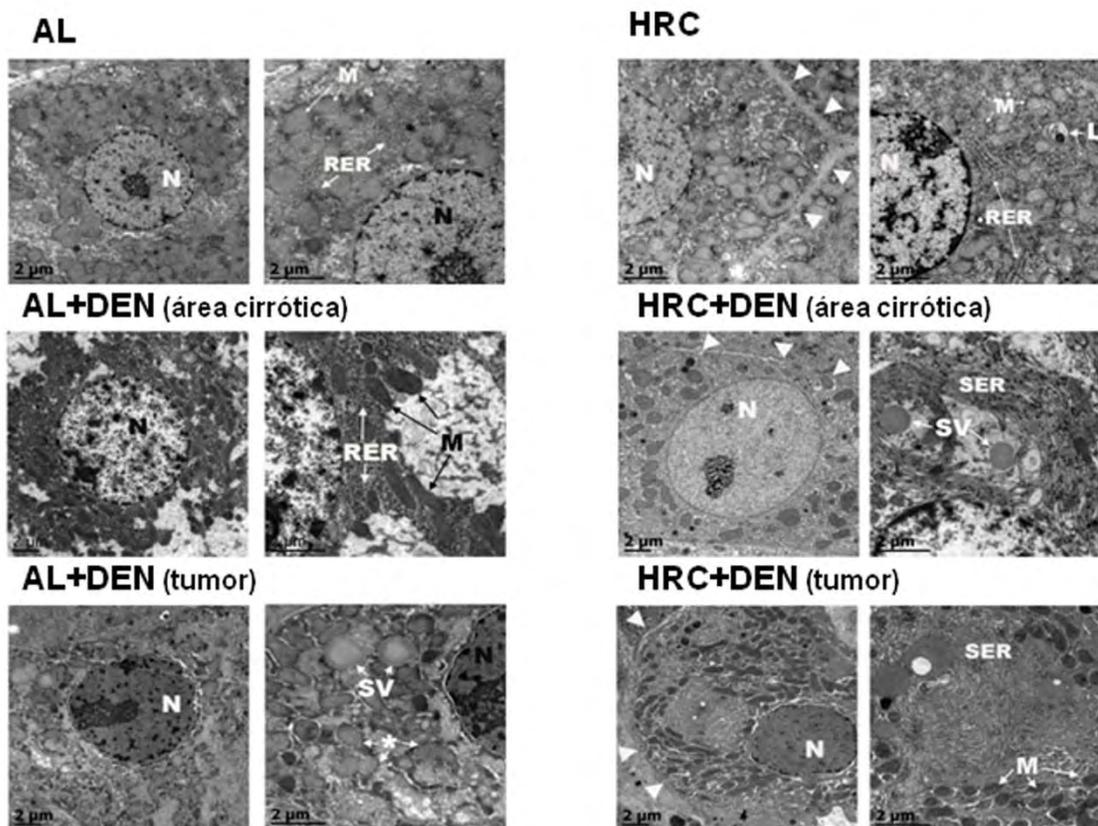


FIGURA 21: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA. Representativo de cada grupo. Evaluación de la ultraestructura de los grupos sanos AL y HRC (parte superior), áreas cirróticas de los grupos AL+DEN and T-CR+DEN (en medio) y masas tumorales de los grupos AL+DEN y HRC+DEN (parte inferior). Núcleo (N), límite entre dos hepatocitos (puntas de flecha blancas), retículo endoplasmático rugoso (RER), retículo endoplasmático liso (SER), mitocondria (M), lisosoma (L), restos de retículo endoplasmático rugoso (*), vesícula secretora (SV).

6.7 Bio-activación del DEN y reacciones pro-oxidantes.

Ya que los hígados de los grupos tratados con DEN presentaron fibrosis, cirrosis y tumores de HCC a modo de mosaico, se realizó la medición de la proteína AFP por técnica de western blot en homogenado de las muestras tomadas para confirmar que corresponden a zonas cirróticas o zonas tumorales. Los niveles de AFP en áreas fibróticas/cirróticas deben ser similares a los niveles de los grupos sanos (AL y HRC) y los niveles deben ser altos en las zonas tumorales. Los niveles de AFP son muy bajos en muestras de hemangiomas (**Fig. 22A**).

6.7.1 Bioactivación del DEN

La transcripción del gen *Cyp2e1* se induce por el tratamiento con DEN, ya que este citocromo es el encargado de metabolizarlo generando la bioactivación del DEN. Los niveles del ARNm en los grupos sanos no tuvieron diferencias. Las zonas tumorales del grupo AL+DEN tuvieron una disminución en la expresión del *Cyp2e1* de 96% y 60% comparado con el grupo sano (AL) y zona cirrótica respectivamente (**Fig. 22B**).

Los niveles de ARNm en las zonas tumorales del grupo HRC+DEN fueron también menores comparado con su control sano (HRC) y las zonas cirróticas con una disminución de 85% y 75% correspondientemente (**Fig. 22B**). Comparando las áreas tumorales del grupo AL+DEN con el grupo HRC+DEN se observó un incremento de 160% en el grupo HRC+DEN (**Fig. 22B**).

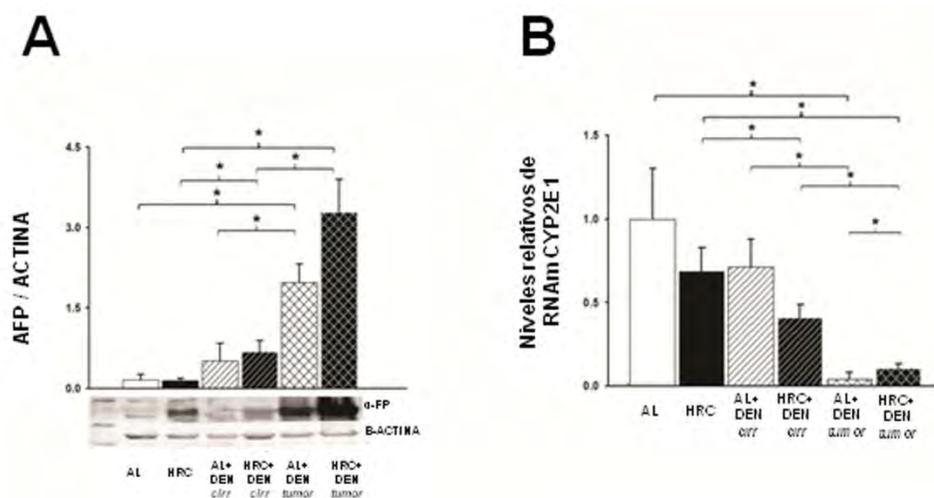


FIGURA 22. BIOACTIVACIÓN DEL DEN. (A) Gráfica de barras de los niveles relativos de ARNm del citocromo *Cyp2e1* de los grupos sanos (AL y HRC), zonas fibróticas/cirróticas y tumorales de grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN). (B) Western blot de los niveles de la proteína AFP en homogenado de hígado de los grupos sanos (AL y HRC), zonas fibróticas/cirróticas y tumorales de grupos tratados con DEN (AL+DEN y HRC+DEN). Las diferencias significativas se muestran con (*).

6.7.2 Reacciones pro-oxidantes

Uno de los efectos del tratamiento con DEN es la producción de especie reactivas de oxígeno. Cuando la liberación de radicales libres excede a los mecanismos antioxidantes se presenta una situación celular conocida como estrés oxidativo, el

cual induce daño molecular a nivel de los lípidos de la membrana plasmática (lipoperoxidación) y en consecuencia, alteración de la permeabilidad de las membranas.

Este estado de estrés oxidativo daña los organelos y el ADN de los hepatocitos induciendo su transformación neoplásica. En los homogenados que se reconocieron como sanos, cirróticos o HCC a través de la cuantificación de AFP, se midió la lipoperoxidación a través de las técnicas de dienos conjugados (DC) y especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARs).

Los dienos conjugados mostraron importante incrementos en las zonas tumorales de los grupos tratados con DEN comparado con sus controles sanos (AL y HRC). El grupo AL+DEN aumentó 36 veces la concentración de DC comparado con el grupo AL. EL grupo HRC+DEN aumentó 38 veces comparado con su grupo sano HRC (**Fig. 23A**).

Aunque en las mediciones de TBARS hubo algunos cambios, tomando en conjunto los resultados de lipoperoxidación basal, el estímulo con FeSO_4 y su relación no muestran cambios entre las zonas sanas con las zonas cirróticas y tumorales, lo que implicaría que los niveles pro-oxidantes (lipoperoxidación) son similares, pero recordemos que estado redox es el resultado de las reacciones pro-oxidantes y anti-oxidantes (**Fig. 23B, C y D**).

Los resultados obtenidos del gen *Cyp2e1* y lipoperoxidación nos sugiere que el metabolismo y bioactivación del DEN no se ve modificado por el régimen de alimentación (*Ad Libitum* y HRC).

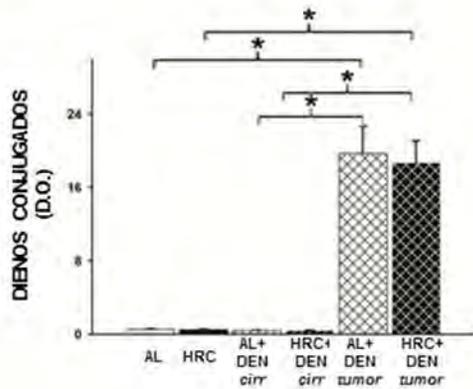
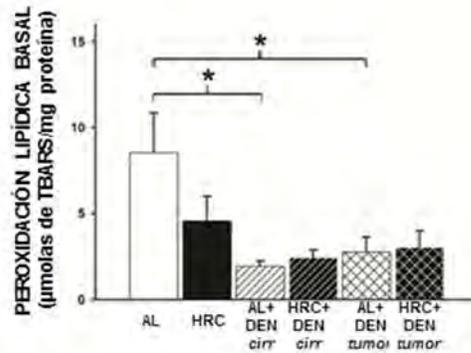
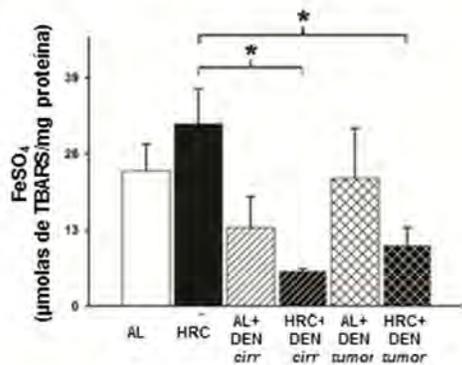
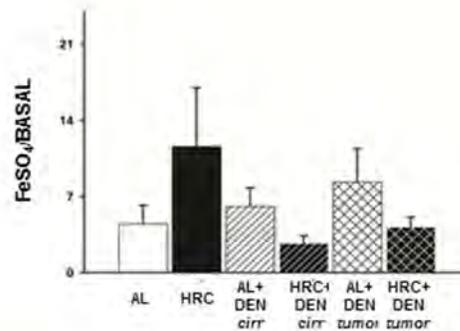
A**B****C****D**

FIGURA 23. REACCIONES PRO-OXIDANTES. Pruebas bioquímicas para evaluar los niveles de las reacciones pro-oxidantes. Las gráficas de barras muestran los valores en los grupos sanos (AL y HRC), además de zonas cirróticas y tumorales de los grupos AL+DEN y HRC+DEN. (A) Dienos, (B) peroxidación lipídica basal, (C) Inducción máxima de la actividad pro-oxidante, (D) relación entre la peroxidación máxima y la basal. Las barras muestran el promedio \pm EE (error estándar poblacional). Las diferencias significativas se muestran con (*) basado en la prueba t-student ($P < 0.05$).

6.8 Reloj molecular

En condiciones sanas el HRC genera una sincronización de la maquinaria del reloj molecular (RM) al horario de acceso al alimento. En el presente estudio nos centramos en cuantificar los niveles de las proteínas PER1 que forma parte del asa negativa y las proteínas CLOCK y BMAL1 que forman parte del asa positiva.

En las mismas muestras de homogenado que fueron diferenciadas por los niveles de AFP se cuantificaron las proteínas reloj por medio de western blot.

6.8.1 Proteína CLOCK

La proteína CLOCK es una proteína que pertenece a la asa de transcripción positiva del RM, pero no presenta oscilación circadiana en su concentración. Los niveles de la proteína CLOCK no tuvieron cambios comparando los grupo sanos, zonas cirróticas o zonas tumorales (**Fig. 24A**).

6.8.2 Proteína PER1

En base a lo discutido en el apartado “1.4 Efectos del horario de restricción calórica”, en el grupo AL la acrofase de la proteína PER1 se presenta cerca de las 2 h (en periodo de oscuridad) y para el grupo HRC la acrofase de la proteínas Per1 se presenta justo después del acceso al alimento (14 h); para el caso de la proteína BMAL1 su acrofase se presenta en anti-fase a la proteína PER1 (41,46).

El horario en el que obtuvimos las muestras de hígado fue entre las 10 y 12 horas (antes del acceso al alimento en ratas con HRC) y la concentración de PER1 tuvo un incremento de 3.9 veces en el grupo HRC comparado con el grupo AL; esto nos sugiere que el HRC si tuvo su efecto sincronizador.

La concentración de PER1 en zona cirrótica del grupo HRC+DEN aumentó 2.1 veces comparado con la zona cirrótica del grupo AL+DEN. En la zona tumoral del grupo HRC+DEN también se presentó un incremento de 2 veces en la concentración de PER1 (**Fig. 24B**). Estos datos nos sugieren que a pesar de las patologías el HRC siguió teniendo su efecto sincronizador.

6.8.3 Proteína BMAL1

Tomando en cuenta lo reportado por Arellanes-Licea y col., 2014 en donde se reportó que la acrofase de la proteína BMAL1 en el grupo AL se presenta a las 11 h y para el grupo HRC se presenta a las 23 h; ya que en nuestro protocolo el horario de sacrificio fue de 10 a 12 h no se esperaban diferencias significativas al igual que en el estudio publicado por Arellanes-Licea (41).

Se observó un incremento importante de la proteína BMAL1 en las zonas tumorales del grupo HRC+DEN comparado con su control sano y las zonas tumorales del grupo AL+DEN presentando incrementos de 7.4 veces y 4.1 respectivamente (**Fig. 24C**).

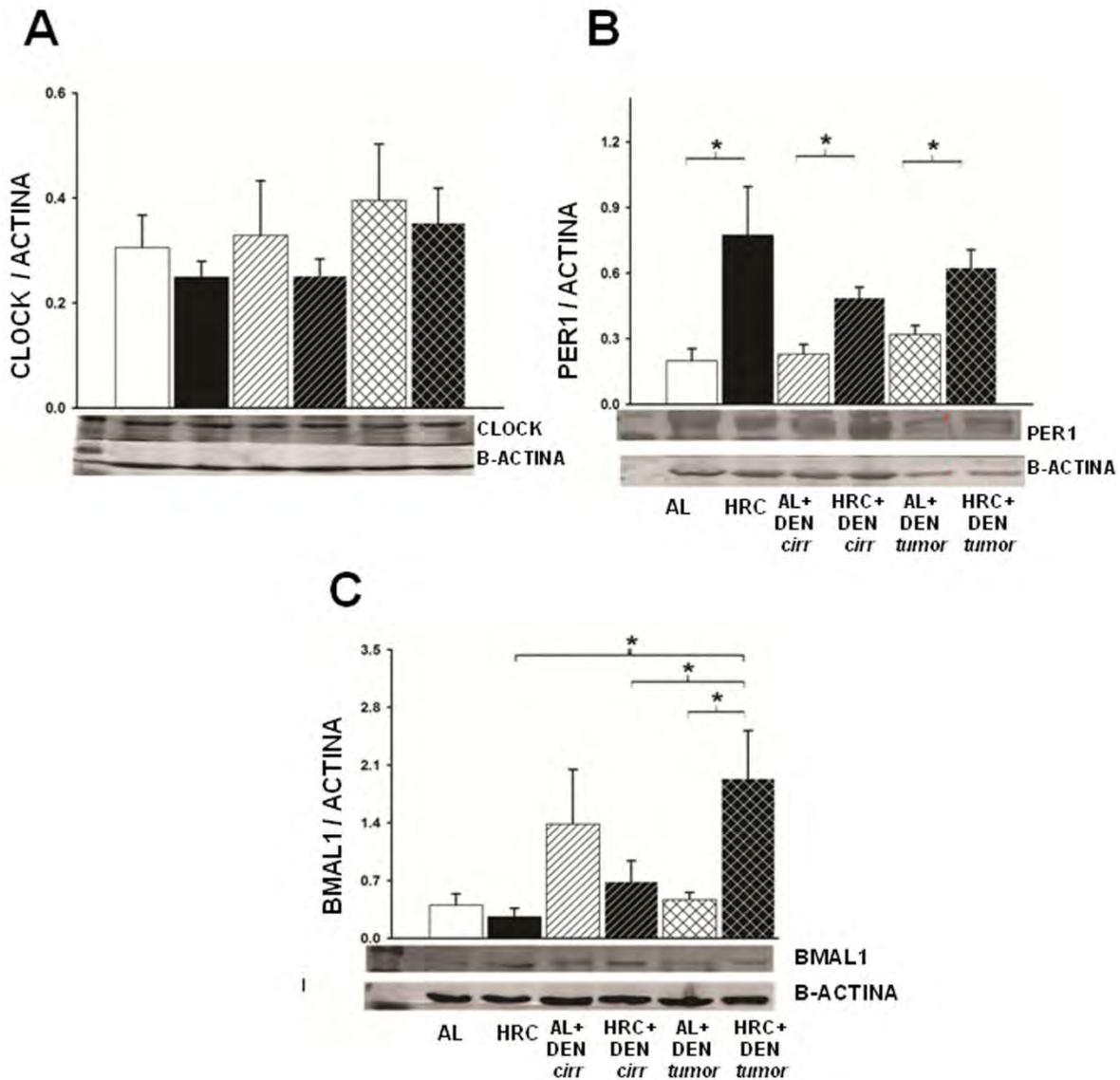


FIGURA 24: RELOJ MOLECULAR. Niveles de proteínas reloj obtenidos por western blot en homogenado de hígados sanos en los grupos sanos (AL y HRC), además de zonas cirróticas y tumorales de los grupos AL+DEN y HRC+DEN. **(A)** Proteína CLOCK. **(B)** Proteína PER1. **(C)** Proteína BMAL1. Las barras muestran el promedio \pm EE (error estándar poblacional). Las diferencias significativas se muestran con (*) basado en la prueba t-student ($P < 0.05$).

6.9 Resumen de resultados obtenidos

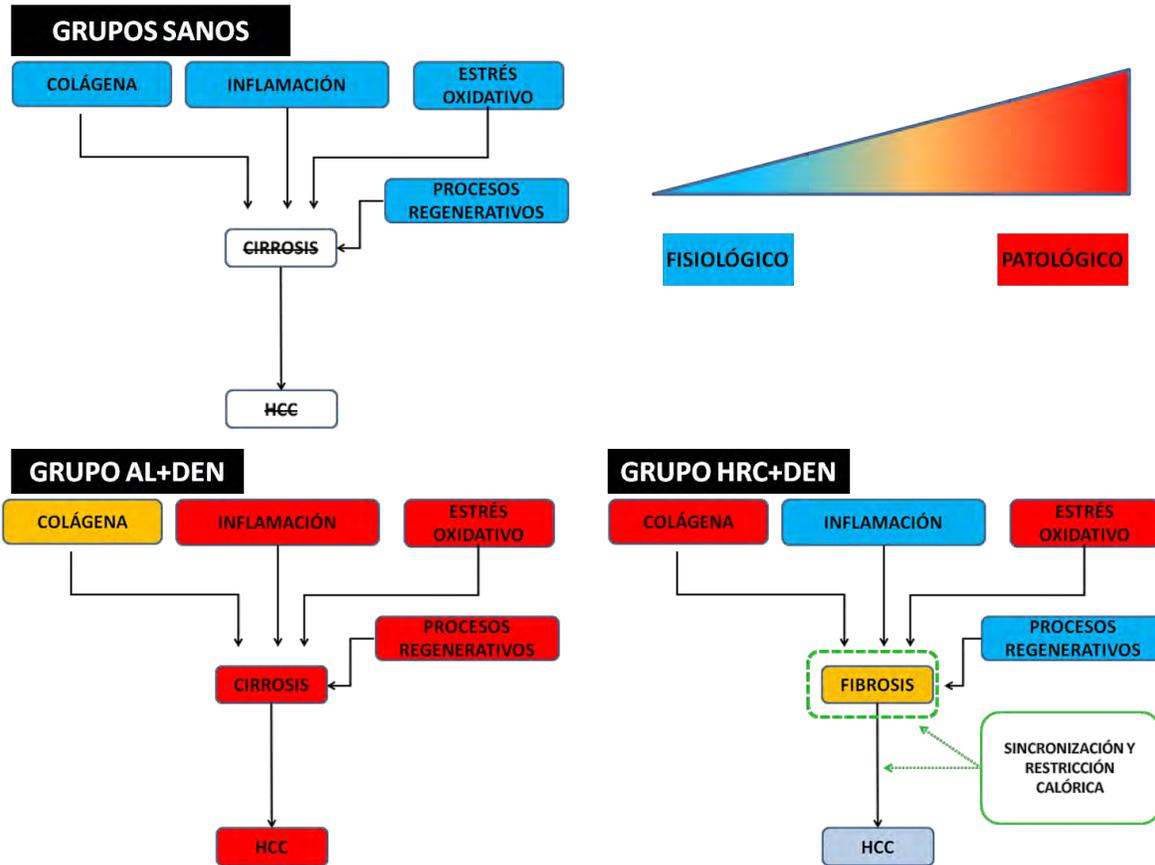


FIGURA 25: RESUMEN DE RESULTADOS. A través de un código de colores se presenta un resumen de los principales resultados obtenidos en el presente trabajo. En color azul se hace referencia a ligeros cambios que se consideran dentro de un estado fisiológico, en color naranja se indican cambios patológicos de forma ligera y en rojo los cambios elevados en un estado patológico. Se muestran las características en los grupos sanos (AL y HRC) (parte superior), los cambios en el grupo AL+DEN (parte inferior izquierda) y los cambios obtenidos en el grupo HRC+DEN (parte inferior derecha).

7 DISCUSIÓN

El uso del DEN para la inducción de fibrosis, cirrosis y HCC es un modelo muy conveniente para estudiar y replicar las condiciones clínicas. Es importante aclarar que los hígados de ratas tratadas con DEN presentaron el daño fibrótico, cirrótico y tumoral en forma de “mosaico” ya que se desarrollaron de forma heterogénea en el hígado presentando diferentes estadios en zonas de fibrosis y cirrosis; además de áreas hiperplásicas y neoplásicas del desarrollo tumoral. Por ésta razón la evaluación histopatológica cobró un peso importante para el presente estudio.

En las últimas décadas, la exploración de medidas alternativas para restablecer patrones circadianos de expresión molecular y fisiológica a través de medios no farmacológicos y usarlos en el tratamiento de patologías, ha evidenciado el poder sincronizador del alimento en pacientes. La sincronización por alimento en pacientes con nutrición parenteral ha mostrado ser útil en su re-sincronización fisiológica y molecular (51).

La alteración de ritmos circadianos a nivel fisiológico y tejido-específico modifican el RM induciendo cambios a nivel celular como el metabolismo, proliferación celular y procesos de reparación del ADN; todos ellos, relacionados con el desarrollo carcinogénico. El uso de modelos *in vivo* e *in vitro* han aportado evidencia de estos cambios aunque aún no es totalmente claro cómo se llevan a cabo (11).

7.1 HRC como sincronizador

Los efectos conocidos del protocolo de HRC (que se tratarán más adelante) sobre la fisiología circadiana y a nivel molecular están inducidos por la suma de dos variables, por un lado el horario en que se alimentan las ratas y por otro un estado de restricción calórica sin malnutrición (34). Se ha demostrado que en ratas sanas bajo el protocolo de HRC durante 3 semanas tienen en promedio una reducción en la ingesta de alimento ~30% comparadas con ratas con acceso *Ad Libitum* (41). Partiendo de esto, la discusión de los resultados se hará desde ambas perspectivas.

La RC sin malnutrición es un potente sincronizador, en roedores logra una pérdida >15% e incrementa su actividad locomotriz; modificando los patrones de actividad, en animales nocturnos se vuelven parcialmente diurnos, ya que presentan un incremento en la actividad durante su periodo de descanso (periodo de luz). Estos cambios conductuales son el resultado de los cambios metabólicos asociados a la RC y que afectan al NSQ y su sincronización por luz (126).

El acceso al alimento por 12 h en el periodo de luz en roedores, sincroniza a los órganos periféricos sin tener influencia sobre la fase del NSQ cuando los animales están bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h (40); cabe señalar que en 12 h los animales ingieren la misma cantidad de alimento que ratas AL. Por otro lado el HRC además de sincronizar órganos periféricos como el hígado, riñones y páncreas, a nivel central puede modificar la fase del NSQ (126).

A nivel molecular el HRC sincroniza también al RM del hígado. La acrofase (máxima de concentración) de la proteína PER1 aparece en el periodo de acceso alimento (periodo de luz) y la proteína BMAL1 presenta su acrofase en el periodo de oscuridad (41,46); ambos picos se encuentran en anti-fase si se comparan con animales que tuvieron acceso *Ad Libitum* al alimento.

A nivel metabólico en nuestro grupo de trabajo hemos reportado que el HRC incrementa la β -oxidación de ácidos grasos y cetogénesis; mientras que al mismo tiempo hay una regulación al alta de las vías gluconeogénicas. Se intensifica la actividad mitocondrial, se modifican el perfil diurno y los niveles de síntesis de ATP (34,127–130). En adición el nivel energético del hígado se encuentra incrementado durante el HRC, mientras que el estado redox se encuentra oxidado en la fracción mitocondrial y citosólica (34).

Otro de los efectos del HRC sobre el hígado es que se evita la inducción de respuesta de fase aguda, sugiriendo que no existe estrés en el hígado inducido por este protocolo (46). Por último se ha demostrado que el hígado de ratas bajo HRC incrementa tanto la apoptosis como la proliferación celular sin pérdida de la homeostasis, aunado a un cambio en el perfil circadiano, sugiriendo que el recambio celular se hace más dinámico (104).

Los cambios inducidos por el HRC sobre el metabolismo, recambio celular e inflamación pueden afectar el proceso de iniciación, desarrollo y progresión del proceso carcinogénico.

7.2 El HRC previene la progresión de la fibrosis

El grupo AL+DEN tuvo un desarrollo de cirrosis franca, ya que se presentaron las características clásicas de esta patología. Este grupo mostró depósitos de colágena (**Fig. 17**), inflamación crónica (**Tabla 3**), incremento en las reacciones pro-oxidantes (**Fig. 23**) e incremento de los procesos regenerativos (**Fig. 19**).

En comparación, a pesar de presentar mayor cantidad de colágena (**Fig. 17**) y niveles de reacciones pro-oxidantes similares al grupo AL+DEN (**Fig. 23**), el grupo HRC+DEN no presentó inflamación crónica (**Tabla 3**) ni descontrol del proceso regenerativo (**Fig. 19**); aunado a esto, el funcionamiento óptimo del hígado y el estado nutricional (**Tabla 2 y 3**) de las ratas del grupo HRC+DEN sugieren que al no presentar todas las marcas de un proceso cirrótico bien establecido se considera solamente el desarrollo de un estado fibrótico, evitando su progresión a un estado cirrótico gracias al efecto del HRC.

Los protocolos de acceso hipocalórico de alimento incrementan el depósito de colágena en tratamientos pro-fibróticos. Un estudio realizado por Goldani y col., en 2006 (131) demostró que la disminución calórica induce de forma inversamente proporcional los depósitos de colágena en ratas tratadas con CCl₄ (fármaco usado para la inducción de fibrosis y cirrosis), esta es la posible razón por la cual las ratas del grupo HRC+DEN presentan mayores niveles de colágena sin presentar inflamación crónica o pérdida de la función.

7.3 Efecto anti-inflamatorio del HRC

La respuesta inflamatoria juega un papel crucial en los diferentes estados del desarrollo tumoral. Se ha demostrado que en mamíferos, la restricción calórica es

una de las mejores estrategias para extender su tiempo de vida, además de retrasar la aparición de enfermedades crónico degenerativas que en su mayoría están relacionadas con procesos inflamatorios crónicos y estrés oxidativo (132).

Aunque aún no es claro el mecanismo que permite estos efectos, una de las teorías más aceptadas es que la reducción calórica (sin malnutrición) disminuye los procesos metabólicos que son la principal fuente de producción de ERO's, las cuales inducen daño en las biomoléculas provocando mutaciones en ADN, estados inflamatorios crónicos además pérdida de la función e integridad de organelos (133).

Rocha y col. en el 2002 pusieron a prueba la influencia del ayuno simple y el ayuno intermitente en ratas, comparado con ratas que tuvieron acceso al alimento de forma *Ad Libitum*. Este estudio evidenció que el ayuno intermitente durante 48 semanas disminuyó el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas inducidas por tratamiento con DEN, además de disminuir el tamaño y número de nódulos positivos a Glutati6n-S-Transferasa (marcador de HCC) (134). Ya que el protocolo de HRC implica que las ratas est1n en ciclos de 22 h de ayuno y 2 de realimentaci6n, esta informaci6n respalda el efecto del HRC reportado en este estudio.

En el estudio de Rocha y col. se concluye por un lado que cuando se usa el DEN se debe tomar en cuenta las dosis y la frecuencia del tratamiento (una sola inyecci6n y/o inyecciones cr6nicas) ya que el efecto puede variar. Por otro lado la ingesta cal6rica que los animales tengan antes, durante y/o despu6s del tratamiento; ya que esto tambi6n pueden influir en el desarrollo tanto de los diferentes grados de fibrosis y cirrosis como de los focis neopl1sicos o tumores bien definidos.

El posible mecanismo por el que la restricci6n cal6rica cr6nica influencia el desarrollo del c1ncer es por un incremento de la apoptosis en c6lulas da1adas por el DEN y una disminuci6n en los niveles de proliferaci6n celular; adem1s se ha visto que estos efectos se revierten cuando los roedores se regresan a condiciones de acceso al alimento de forma *Ad Libitum* (134).

7.4 El HRC preservó las características histopatológicas en hígado y evitó su transformación neoplásica.

Aunque en la clínica se puede usar el número y tamaño de las masas tumorales, uno de los mejores indicadores usado sigue siendo la evaluación histopatológica, ya que el grado de des-diferenciación del tejido de donde procede es directamente proporcional al estadio y grado de agresividad de las células tumorales

Las células tumorales en el grupo AL+DEN mostraron características claras de un estado neoplásico avanzado (**Fig.19 y 21**), consistente con el incremento del CEA en sangre (**Fig. 18C**) usado en la clínica como indicador de procesos metastásicos y de reincidencia tumoral. Los niveles normales de CEA en el grupo HRC (**Fig. 18C**) sugieren que los tumores desarrollados se encuentran en un grado inicial o temprano del desarrollo neoplásico, lo cual fue corroborado con la valoración histopatológica y de microscopía electrónica (**Fig. 19 y 21**).

Los resultados obtenidos demuestran que el HRC evitó la transformación neoplásica de las masas hiperplásicas desarrolladas.

7.5 Estado nutricional

Existe una relación demostrada a varios niveles en donde se observa que a mayor ingesta de alimento se incrementa el número y tamaño de masas tumorales de HCC en protocolos de inducción con el DEN (135).

La RC es una manipulación experimental basada en la reducción de la ingesta calórica sin causar malnutrición, la cual se ha demostrado que incrementa la esperanza de vida en animales y humanos; aunque es poco conocido como se da este efecto, se sabe que intervienen procesos metabólicos y anti-inflamatorios (132,136,137).

Es sabido que la RC influencia el balance y correlación entre el estado energético, la remodelación de cromatina y la fisiología circadiana (136,137), una posibilidad es a través de la interacción del factor de crecimiento similar a la insulina/IGF1,

AMPK, la señalización de mTOR y las proteínas pertenecientes a la familia de las sirtuinas (132,136).

Los elementos usados en este protocolo para evaluar el estado nutricional de las ratas (albúmina, globulina y hemoglobina corpuscular media) (**Tabla 2 y Fig. 16**) mostró que el HRC preservó el estado nutricional a pesar de tener una reducción en la ingesta (~36%) en el grupo HRC comparado con el grupo AL; y una disminución de ~42% en el grupo HRC+DEN comparado con el grupo AL+DEN.

Ratones y humanos con deficiencias en el receptor/IGF-1 muestra una reducción significativa en las enfermedades relacionadas con la edad. Los efectos de esta vía en la longevidad fue descrito primero en *C. elegans* en donde se demostró que las mutaciones en el receptor del factor similar a la insulina/IGF-1 incrementa el tiempo de vida. La restricción proteínica o de aminoácidos en particular como la metionina y el triptófano es suficiente para reducir los niveles del IGF-1 y se puede explicar los efectos de la restricción calórica sobre la longevidad y el riesgo de desarrollar enfermedades (138).

Resultados de nuestro grupo de trabajo muestran que los niveles de IGF-1 en suero disminuyen en un perfil diurno cuando se usa el HRC durante 3 semanas en ratas (41), por lo que la vía de señalización del IGF-1 se convierte en un fuerte candidato a estudiar como parte del efecto antineoplásico del HRC.

El metabolismo de la glucosa tanto en el tumor como nivel fisiológico se ve incrementado y la actividad proliferativa en tumores de HCC se ve favorecida por estos niveles (139). El HRC induce una disminución los niveles de glucosa en un perfil diurno (140), siendo un blanco interesante de estudio para evidenciar el efecto inhibitorio que tiene el HRC sobre la transformación neoplásica.

La alternancia de periodos de alimentación y ayuno es paralelo a los cambios en el estado energético con varianzas en las relaciones ATP/AMP y NAD⁺/NADH. En recientes estudios se ha demostrado que las proteínas reloj están reguladas directamente por sensores energéticos, modificando su estabilidad y expresión. El reloj molecular es sensible a la relación NAD⁺/NADH. El NAD⁺ se incrementa bajo

restricción calórica en el hígado o después de hacer ejercicio en músculo, pero disminuye bajo una alimentación hipercalórica. EL NAD⁺ es un co-factor de las sirtuinas (SIRT1 en específico) que presentan actividad de deacetilasas de histonas, traduciendo así los cambios metabólicos en modificaciones en cromatina y a su vez en modificaciones transcripcionales (141–143).

7.6 Metabolismo del DEN

Los niveles de ARNm del gen *Cyp2e1* se vieron modificados por las patologías pero no por la condición alimenticia. Las zonas cirróticas del grupo HRC+DEN mostraron una disminución comparado con su control sano. Las áreas tumorales presentaron menores niveles del *Cyp2e1* que las zonas cirróticas y sanos pero sin presentar un comportamiento diferente (**Fig. 22A**). Las zonas tumorales presentaron elevados niveles de dienos conjugados (**Fig.22A**) pero en general no se observaron cambios por el protocolo de alimentación (comparación entre grupo AL y HRC).

Ha sido demostrado que los genes y proteínas reloj pueden modificar la capacidad toxicológica de fármacos. En la citotoxicidad inducida por el DEN es necesario que la proteína CLOCK esté presente para que el daño pueda ser inducido (87). Nuestros resultados muestran que no existieron diferencias en los niveles de la proteína CLOCK comparando ratas sanas contra enfermas, ni entre regímenes alimenticios (**Fig. 24A**), que es consistente con los niveles de ARNm del gen *Cyp2e1* y reacciones pro-oxidantes.

Las dietas altas en proteína parecen activar las enzimas CYP450, mientras que las dietas con disminución de proteína induce una disminución de estas enzimas (144). Si bien no encontramos diferencias en la expresión del ARNm del *Cyp2e1* sería importante contemplar la expresión circadiana de este gen y sus posibles cambios inducidos por la ingesta calórica, además de la expresión de otros citocromos que podrían estar envueltos en la respuesta al tratamiento con DEN.

Estos datos sugieren que los cambios que se encontraron a nivel fisiológico y celular en ratas bajo el protocolo de HRC tratadas con DEN, son producto de una respuesta diferencial inducida por la forma en que comen y no por alteraciones o cambios en el metabolismo del fármaco; por lo que con el presente trabajo quedan abiertas varias posibilidades de estudiar tanto el metabolismo, como el efecto de fármacos como el DEN en relación a los horarios de suministro y de la ingesta calórica.

7.7 Regulación circadiana como represor de la transformación neoplásica.

Como se ha mencionado previamente, el RM permite por un lado medir el tiempo y por otro lado permite la sincronización entre células y órganos como respuesta a algunos estímulos como ciclos de luz/oscuridad y ayuno/alimentación. Estudios recientes han demostrado un efecto anti-neoplásico del RM en diferentes tipos de cáncer.

Un horario de sincronización con RC de 25% (disminución del 25% en la ingesta calórica) evitó el crecimiento de tumores de osteosarcoma inoculados de forma subcutánea comparado con ratones que tuvieron acceso *Ad Libitum* al alimento. Este estudio evidenció que los ratones que tuvieron la restricción en el periodo de luz tuvieron un mayor efecto anti-proliferativo comparado con ratones que se restringieron durante la noche. Estos resultados demuestran que tanto el horario, como la RC modifican el crecimiento tumoral (105).

La proteína BMAL1 puede unirse directamente al promotor del gen *P53* y activar las vías antineoplásicas inducidas por *P53* incrementando los niveles de apoptosis y disminuyendo la tasa de proliferación celular en células de cáncer pancreático (145).

Utilizando un modelo de ratón genéticamente modificado de adenocarcinoma de pulmón, Papagiannakopoulos y col. (2016) estudiaron los efectos de las alteraciones circadianas (como el "jet-lag") en la tumorigénesis en el pulmón. Sus

hallazgos mostraron que los genes *PER2* y *BMAL1* tienen un rol de supresión tumoral autónomo en la transformación y progresión tumoral en el pulmón; además de que la pérdida de estos componentes del RM llevó a una mayor expresión de c-Myc incrementando la proliferación celular y generando alteraciones metabólicas (146).

Las cronoterapias han surgido como estrategias terapéuticas en las que se aplican el conocimiento de los ritmos circadianos con la finalidad de tener un mejor resultado de los tratamientos contra el cáncer (147,148). Ya que el metabolismo de fármacos, procesos fisiológicos y procesos celulares tienen una regulación circadiana, las cronoterapias se centran en poder identificar la hora del día en la que el tratamiento puede ser más efectivo contra células cancerosas y/o menos agresivo con las células sanas (87,147,148).

Si bien la finalidad de este trabajo no fue crear una cronoterapia como tal, sí aporta información básica para contemplar el metabolismo circadiano del DEN, además de la influencia de la sincronización por alimento en el efecto del fármaco en el desarrollo de cirrosis y cáncer.

El protocolo de HRC puede ser considerado como un factor potencial en el fortalecimiento de enfoques terapéuticos que ayuden a disminuir las dosis de los tratamientos contra el cáncer que son agresivos como la quimioterapia o radioterapia, o coadyuvar en el efecto de estos tratamientos.

7.8 Extensión del presente estudio a otros organismos

El presente trabajo podría tener implicaciones en el mejoramiento de la calidad de vida de pacientes con cáncer a futuro. A continuación presentaré dos aspectos en los que podría ser aplicado el conocimiento generado en el presente trabajo:

7.8.1 Efectos de la alteración de los ritmos circadianos en la inducción y desarrollo del cáncer en humanos

En humanos, los ritmos circadianos se ven alterados con la edad, también se ven modificados por el estilo de vida como los horarios de alimentación, la ingesta calórica, estímulos continuos de luz (por uso de aparatos electrónicos), jet-lag, trabajos nocturnos, entre otros (149).

Estudios epidemiológicos demuestran que la alimentación errática (sin horarios fijos) incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades como el cáncer; por otro lado, los ciclos de alimentación/ayuno bien establecidos y ayunos prolongados durante la noche están relacionados con un efecto protector en el desarrollo de cáncer, por ejemplo de mama (149,150).

El estudio de las variaciones genéticas en genes reloj y vías de señalización relacionadas al RM en humanos nos brindan un área de estudio interesante. En un estudio de asociación entre variaciones genéticas de genes reloj y genes relacionados con el metabolismo y producción de melatonina (hormona usada en humanos como sincronizador), se concluyó que el cáncer de próstata, de pulmón, colorrectal y de ovario presentan variaciones genéticas del RM, aunque sólo se observó una correlación entre la alteración de la melatonina en el cáncer de próstata (151).

La proliferación descontrolada es un factor importante que permite caracteriza a todos los tipos de cáncer. Cerca de 1/6 parte de las células epidermales sanas en humano presentan ritmicidad circadiana en la mitosis, teniendo sus máximos niveles durante el periodo de oscuridad tardía (cercano al amanecer) inducido por el incremento en la expresión de *BMAL1*. Si bien se ha reportado que cerca del 90% de los tipos de cáncer en humano presentan mutaciones en los genes *Ciclina*, *Cdk* o *Cki*; se ha encontrado una relación directa entre la alteración del reloj molecular, con las alteraciones de estos genes (28).

Por otro lado, en línea celular de melanoma B16 y carcinoma de colon humano (HCT-116) en los que se identificó que los genes reloj se encuentran suprimidos, se indujo sincronización por tratamiento con dexametasona produciendo una disminución en la tasa de proliferación celular y en la progresión del ciclo celular *in vitro* y en tumores inoculados. Además se observó que este efecto se pierde cuando a las células se les induce un silenciamiento del gen *Bmal1*. Este estudio sugiere que un incremento en la sincronización puede representar una nueva estrategia para el control en la progresión tumoral (152).

7.8.2 Efectos de la sincronización por alimento en humanos

Ya ha sido mencionada la importancia de la sincronización en la salud de los humanos, pero ésta es difícil de mantener por los distintos hábitos de vida.

Un estudio publicado por Jakubowicz y col., en el 2013 demostró la importancia de la relación entre horarios de alimentación e ingesta calórica. Se compararon dos grupos de mujeres con síndrome metabólico que fueron sujetas a una dieta isocalórica para bajar de peso, donde un grupo tuvo un desayuno copioso y una cena escasa y el otro grupo recibió un desayuno escaso y una cena copiosa por 12 semanas, se observó que las mujeres del primer grupo perdieron más peso, además de tener una mayor reducción de cintura; aunado a una disminución en la glucosa en ayuno, en los triglicéridos e incluso en la ghrelina induciendo mayores niveles de saciedad. (153).

Otro factor sincronizador a tomar en cuenta en humanos es el estímulo lumínico producido por celulares, computadoras y/o empleos que impliquen estar despiertos y con estímulo de luz artificial durante la noche, lo que evita una correcta sincronización del NSQ y de los órganos periféricos. La disminución en el periodo de sueño aunado a la ingesta de alimento en la noche, han sido fuertemente relacionados en humanos con un incremento en la obesidad, también

con hígado graso, diabetes e incluso en comportamiento como el estrés mental y disminución en realizar ejercicio (154,155).

Kenneth y col. (2013) pusieron a prueba un protocolo de sincronización por luz natural en humanos comparado a luz artificial (aparatos electrónicos), poniendo en evidencia que la exposición sólo a luz natural induce una mejor sincronización a periodos de luz-oscuridad mediante los niveles de melatonina que se sintetiza de forma más eficiente al inicio del periodo de oscuridad comparado con las personas que tuvieron estímulo de luz artificial (156).

Tanto la restricción calórica como los ayunos intermitentes generan sincronización circadiana en relojes periféricos como en el NSQ aunado a efectos benéficos en la salud en humanos; ya que presentan una reducción importante en los depósitos de grasa abdominal, una reducción en la resistencia a la insulina, una reducción en los marcadores pro-inflamatorios en pacientes que sufren de asma y sanos, además de niveles de energía elevados (157).

De esta forma queda evidenciado que si bien es difícil lograr una sincronización en humanos, si es posible además de que eso genera beneficios importantes en la salud. El RM aparece también como una importante interface entre el estado nutricional y la homeostasis, generando un gran interés en los beneficios de la crono-nutrición (158).

8 CONCLUSIONES

En conclusión, el HRC reduce el daño producido por el DEN, modificando la secuencia del desarrollo de la fibrosis, cirrosis y HCC mediante la prevención del establecimiento de un estado inflamatorio crónico y la transformación neoplásica; además de mantener el funcionamiento hepático y el estado nutricional a pesar de que la ingesta de alimento sea menor comparado con ratas que tuvieron accesos al alimento de forma *Ad Libitum*.

9 PERSPECTIVAS

Si bien el trabajo realizado para esta tesis logra ser contundente en el efecto antineoplásico que tiene el HRC como perspectivas podría proponer:

- 1.- Evaluar el efecto solo de la RC en un protocolo en el que se permita el acceso solo al 70% del alimento en tan solo 12h o 24h.
- 2.- Evaluar el efecto de la sincronización por alimento sin RC permitiendo el acceso al alimento durante 6 horas en el periodo de luz.
- 3.- La evaluación del estado inflamatorio comenzando por marcadores de la fase de respuesta aguda y de forma crónica. Estudiar a nivel celular los cambios generados en las señales pro y anti-inflamatorias.
- 4.- Estudiar más a fondo la expresión génica y proteica de las diferentes proteínas y genes reloj mediante silenciamiento y/o knockout, aunque el interés en el gen *Bmal1* se hace más sugerente en el presente trabajo. Además de la regulación de sus genes blanco como el supresor tumoral p53.

10 REFERENCIAS

1. Greene, M.W. (2012) Circadian rhythms and tumor growth. *Cancer Lett.*, **318**, 115–23.
2. Reppert, S.M. *et al.* (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935–941.
3. Lévi, F. *et al.* (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 377–421.
4. Zhang, R. *et al.* (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 16219–24.
5. Golombek, D. a *et al.* (2010) Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol. Rev.*, **90**, 1063–1102.
6. Kondratova, A. a *et al.* (2012) The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 325–35.
7. Tevy, M.F. *et al.* (2013) Aging signaling pathways and circadian clock-dependent metabolic derangements. *Trends Endocrinol. Metab.*, **24**, 229–237.
8. Laermans, J. *et al.* (2016) Chronobesity: Role of the circadian system in the obesity epidemic. *Obes. Rev.*, **17**, 108–125.
9. Mazzocchi, G. *et al.* (2014) Circadian clock circuitry in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 4197–4207.
10. Yu, E.A. *et al.* Disrupting the circadian clock : Gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. **3**, 479–493.
11. Savvidis, C. *et al.* (2012) Circadian Rhythm Disruption in Cancer Biology. *Mol. Med.*, **18**, 1249–1260.
12. Filipski, E. *et al.* (2009) Circadian disruption in experimental cancer processes. *Integr. Cancer Ther.*, **8**, 298–302.
13. Challet, E. (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J. Comp. Physiol. B.*, **180**, 631–44.
14. Rana, S. *et al.* (2010) Circadian rhythm and its role in malignancy. *J. Circadian Rhythms*, **8**, 2–13.
15. Roenneberg, T. *et al.* (2005) Circadian clocks — the fall and rise of physiology. *Nature Rev. Mol. cell Biol.*, **6**, 965–971.
16. Partch, C.L. *et al.* (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.*, **24**, 90–9.
17. Mohawk, J. a *et al.* (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.*, **35**, 445–62.
18. Welsh, D.K. *et al.* (2010) Suprachiasmatic Nucleus : Cell Autonomy and

Network Properties. *Annu Rev Physio*, **72**, 551–557.

19. Kuroiwa, A. *et al.* (1991) Restoration of circadian rhythmicity after transplantation of the suprachiasmatic nucleus in the rats—its conditions for functional recovery and long-term survival. *No To Shinkei*, **43**, 1053–1059.
20. Lehman, M.N. *et al.* (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J. Neurosci.*, **7**, 1626–1638.
21. Buttgereit, F. *et al.* (2015) Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat. Publ. Gr.*, **11**, 349–356.
22. Preitner, N. *et al.* (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251–260.
23. Johnson, C.H. (2014) Circadian clocks and cell division. *Cell Cycle*, **9**, 3864–3873.
24. Kelleher, F.C. *et al.* (2014) Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett.*, **342**, 9–18.
25. Shearman, L.P. *et al.* (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, **288**, 1013–1019.
26. Mendoza, J. *et al.* (2007) Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3691–701.
27. Chen, L. *et al.* (2015) Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system. *Front. Pharmacol.*, **6**, 71.
28. Feillet, C. *et al.* (2015) Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth. *Front. Neurol.*, **6**, 96.
29. Yang, X. *et al.* (2009) the Circadian Clock Gene *Per1* Suppresses Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth At Specific Times of Day. *Chronobiol. Int.*, **26**, 1323–1339.
30. Delezie, J. *et al.* (2011) Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1243**, 30–46.
31. Gréchez-Cassiau, A. *et al.* (2008) The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21^{WAF1/CIP1} expression and hepatocyte proliferation. *J. Biol. Chem.*, **283**, 4535–42.
32. Shadan, F.F. (2007) Circadian tempo: A paradigm for genome stability? *Med. Hypotheses*, **68**, 883–891.
33. Lévi, F. *et al.* (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 377–421.
34. Aguilar-Roblero, R. *et al.* (2010) Chronostatic adaptations in the liver to

- restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol. Rhythms*, **8**, 9–17.
35. Escobar, C. *et al.* (2001) El alimento como sincronizador de los ritmos biológicos: su relevancia para la identificación de un oscilador circadiano. **44**, 58–62.
 36. Mendoza, J. (2007) Circadian clocks: setting time by food. *J. Neuroendocrinol.*, **19**, 127–37.
 37. Nagai K, Nishio T, Nakagawa H, Nakamura S, F.Y. (1978) Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Res.*, **142**, 384–389.
 38. Moore, R.Y. *et al.* (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42**, 201–206.
 39. Schwartz, W.J. (2002) Review of Circadian Clocks (Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 12). *Genes, Brain Behav.*, **1**, 193–194.
 40. Damiola, F. *et al.* (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.*, **14**, 2950–2961.
 41. Arellanes-Licea, E.D.C. *et al.* (2014) Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats. *J. Neuroendocrinol.*, **26**, 282–95.
 42. Honma, K.I. *et al.* (1983) Critical role of food amount for prefeeding corticosterone peak in rats. *Am. Physiol. Soc.*, **245**, R339–R344.
 43. Froy, O. (2011) Circadian rhythms, aging, and life span in mammals. *Physiology (Bethesda)*, **26**, 225–35.
 44. Reinke, H. *et al.* (2016) Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology*, **150**, 574–580.
 45. Asher, G. *et al.* (2008) SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, **134**, 317–28.
 46. Luna-Moreno, D. *et al.* (2009) Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol. Int.*, **26**, 1409–1429.
 47. Arellanes-Licea, E.D.C. *et al.* (2014) Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats. *J. Neuroendocrinol.*, **26**, 282–95.
 48. Rafnsson, V. *et al.* (2001) Risk of breast cancer in female flight attendants: A population-based study (Iceland). *Cancer Causes Control*, **12**, 95–101.
 49. Davis, S. *et al.* (2001) Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1024**, 1557–1562.
 50. Willett, W.C. *et al.* (2001) Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in

- Women Participating in the Nurses' Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**, 1563–1568.
51. Sunderram, J. *et al.* (2014) Time-restricted feeding and the realignment of biological rhythms: translational opportunities and challenges. *J. Transl. Med.*, **12**, 1–9.
 52. Park, D. *et al.* (2009) Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G 1 / S-phase regulatory proteins in rat. **191**, 321–326.
 53. Hanahan, D. *et al.* (2000) The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. **100**, 57–70.
 54. Todd, Randy and Munger, K. (2006) Oncogenes. *eLS*,
 55. Perry, A.R. (2001) Oncogenes. *eLS*,
 56. Ambrosone, C.B. *et al.* (2010) The development of molecular epidemiology to elucidate cancer risk and prognosis: a historical perspective. *Int J Mol Epidemiol Genet*, **1**, 84–91.
 57. Levitt, N.C. *et al.* (2002) Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol. Med.*, **8**, 179–186.
 58. Hanahan, D. *et al.* (2011) Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **144**, 646–674.
 59. Aldaco-sarvide, F. *et al.* (2010) Mortalidad por cáncer en México 2000-201 damages. *Gac. Mex. Oncol.*, **11**, 371–379.
 60. Kershenobich *et al.* (2011) La hepatitis C como un problema de salud pública en México. *Salud Publica Mex.*, **53**, S61–S67.
 61. Arias, I.M. *et al.* (2009) *The Liver: Biology and Pathobiology: Fifth Edition*,
 62. Fausto, N. (2002) Regeneration of Liver. *Encycl. life Sci. eLS*,
 63. Marrone, G. *et al.* (2016) Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J. Hepatol.*, **65**, 608–6017.
 64. Heidelbaugh, J.J. *et al.* (2006) Cirrhosis and Chronic Liver Failure part 1. diagnosis and evaluation.pdf. *Am. Fam. Physician*, **74**, 756–762.
 65. Highleyman, L. *et al.* (2008) Introducción sobre el hígado.
 66. Schinoni, M.I. *et al.* (2006) Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases. *Acta Gastroenterol. Latinoam.*, **36**, 211–217.
 67. Fattovich, G. *et al.* (2004) Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology*, **127**, 35–50.
 68. Stefaniuk, P. *et al.* (2010) Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. **16**, 418–424.
 69. Lee, J.M. *et al.* (2014) β -Catenin signaling in hepatocellular cancer: Implications in inflammation, fibrosis, and proliferation. *Cancer Lett.*, **343**,

90–7.

70. Heidelbaugh, J.J. *et al.* (2006) Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part II. Complications and Treatment. *Am. Fam. Physician*, **74**, 767–776.
71. Severi, T. *et al.* (2010) Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacol. Sin.*, **31**, 1409–1420.
72. Sanyal, A.J. *et al.* (2010) The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *Oncologist*, **15 Suppl 4**, 14–22.
73. García B, L. *et al.* (2007) Blancos terapéuticos potenciales. *Rev. Médica Chil.*, **135**, 783–791.
74. Bataller, R. (2002) Nuevas perspectivas terapéuticas de la fibrosis hepática: bases patogénicas. *Med. Clin.*, **118**, 339–346.
75. Chagoya de Sánchez, V. *et al.* (2012) Recovery of the Cell Cycle Inhibition in CCl(4)-Induced Cirrhosis by the Adenosine Derivative IFC-305. *Int. J. Hepatol.*, **2012**, 212530.
76. Xu, J. *et al.* (2014) The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front. Pharmacol.*, **5**, 1–12.
77. Salomao, M. *et al.* (2012) Recent advances in the classification of hepatocellular carcinoma. *Diagnostic Histopathol.*, **18**, 37–45.
78. Zhao, Y.-J. *et al.* (2013) Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Mol. Clin. Oncol.*, **1**, 593–598.
79. Gonzalez, S. a *et al.* (2011) Diagnosis of hepatocellular carcinoma: role of tumor markers and liver biopsy. *Clin. Liver Dis.*, **15**, 297–306.
80. Maussier, M.L. *et al.* (1990) AFP, CEA, CA 19-9 and TPA in the hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biol. Markers*, **5**, 121–126.
81. Zender, L. *et al.* (2010) Cancer gene discovery in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, **52**, 921–929.
82. Sakamoto, M. *et al.* (2010) Molecular diagnosis of multistage hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **40**, 891–6.
83. Marquardt, J.U. *et al.* (2015) Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **15**, 653–67.
84. Zender, L. *et al.* Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. , *Onkologie*, 31. (2008) , 550–555.
85. Eli D. Ehrenpreis, MD, and Seymour Ehrenpreis, P. (1998) Cytochrome P-450. *Clin. Liver Dis.*, **2**, 457–470.
86. Pound, A.W. *et al.* (1975) Partial hepatectomy and toxicity of dimethylnitrosamine and carbon tetrachloride, in relation to the carcinogenic action of dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer*, **32**, 596–603.

87. Matsunaga, N. *et al.* (2011) Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes. *Toxicology*, **280**, 144–151.
88. Jaimes-Santoyo, J. *et al.* (2014) El Citocromo P-450. *Rev Hosp Jua Mex*, **81**, 250–256.
89. Schiffer, E. *et al.* (2005) Gefitinib, an EGFR Inhibitor, Prevents Hepatocellular Carcinoma Development in the Rat Liver With Cirrhosis. *Hepatology*, **41**, 307–314.
90. Yamaguchi, K. *et al.* (1995) Concomitant and isolated expression of TGF- α and EGF-R in human hepatoma cells supports the hypothesis of autocrine, paracrine, and endocrine growth of human hepatoma. *J. Surg. Oncol.*, **58**, 240–5.
91. Gachon, F. *et al.* (2006) The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.*, **4**, 25–36.
92. Matsunaga, N. *et al.* (2008) The Molecular Mechanism Regulating 24-Hour Rhythm of CYP2E1 Expression in the Mouse Liver. *Hepatology*, **40**, 240–251.
93. DeBruyne, J.P. *et al.* (2014) The hepatic circadian clock modulates xenobiotic metabolism in mice. *J. Biol. Rhythms*, **29**, 277–87.
94. Dang, C. V. MYC on the path to cancer. , *Cell*, 149. (2012) , 22–35.
95. Altman, B.J. *et al.* (2015) MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells. *Cell Metab.*, **22**, 1009–1019.
96. Hernández-rosas, F. *et al.* (2010) Ritmos circadianos, genes reloj y cáncer. *Arch. Med.*, **6**,
97. Lin, Y. *et al.* (2008) Disturbance of Circadian Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma. *Mol. Carcinog.*, **47**, 925–933.
98. Li, D.-Q. *et al.* (2013) Metastasis-associated protein 1 is an integral component of the circadian molecular machinery. *Nat Commun*, **4**, 2545.
99. Zhao, B. *et al.* (2012) A functional polymorphism in PER3 gene is associated with prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*, **32**, 1451–9.
100. M.C., M. *et al.* (1997) Circadian-system alterations during cancer processes. *Int. J. Cancer*, **70**, 241–247.
101. Puram, R. V. *et al.* (2016) Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML. *Cell*, **165**, 303–316.
102. Fu, L. *et al.* (2002) The circadian gene period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, **111**, 41–50.
103. Antoch, M.P. *et al.* (2013) Deficiency in PER proteins has no effect on the rate of spontaneous and radiation-induced carcinogenesis. *Cell Cycle*, **12**, 3673–3680.

104. Molina-Aguilar, C. *et al.* (2012) Restricted food access during the daytime modifies the 24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver. *Biol. Rhythm Res.*, **43**, 25–37.
105. Wu, M.W. *et al.* (2004) Effects of meal timing on tumor progression in mice. *Life Sci.*, **75**, 1181–1193.
106. Mansour, M.A. *et al.* (2010) Ginger ingredients inhibit the development of diethylnitrosoamine induced premalignant phenotype in rat chemical hepatocarcinogenesis model. *BioFactors*, **36**, 483–490.
107. Li, X.-M. *et al.* (2010) Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing. *Cancer Res.*, **70**, 3351–60.
108. Portaluppi, F. *et al.* (2008) Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol. Int.*, **25**, 999–1016.
109. Carmona-Alcocer, V. *et al.* (2012) Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Physiol. Behav.*, **105**, 727–733.
110. Beauchemin, N. *et al.* (2013) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **32**, 643–671.
111. Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 67–81.
112. Metser, U. *et al.* (2010) Assessment of tumor recurrence in patients with colorectal cancer and elevated carcinoembryonic antigen level: FDG PET/CT versus contrast-enhanced 64-MDCT of the chest and abdomen. *Am. J. Roentgenol.*, **194**, 766–771.
113. López Panqueva, R. del P. (2015) Hepatocarcinoma: papel de la biopsia hepática , estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Rev. Colombiana Gastroenterol.*, **30**, 232–242.
114. Colina, F. *et al.* (2016) Protocolo y guía para el diagnóstico histopatológico de carcinoma hepatocelular Subprotocolo de Anatomía Patológica para un protocolo general hospitalario de hepatocarcinoma carcinoma. *Rev. Española Patol.*, **40**, 147–160.
115. Lee G., L. (1968) *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*, (1st edn) McGraw-Hill.
116. Hytioglou, P. *et al.* (2007) Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **36**, 867–887.
117. Nascimento, C. *et al.* (2007) Analysis of morphological variables and arterialization in the differential diagnosis of hepatic nodules in explanted cirrhotic livers. *Diagn. Pathol.*, **2**, 51.

118. Neoplasia., I.C.G. for H.N.I.C.G. for H. (2009) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*, **49**, 658–664.
119. Squire RA, L.M. (1975) Report of a Workshop on Classification of Specific Hepatocellular. *Cáncer Res.*, **35**, 3214–3223.
120. Iancu, T.C. *et al.* (2011) Electron Microscopy of Liver Biopsies. In *Liver biopsy* (Takahashi, H., ed), pp. 109–136, InTech.
121. Martínez-Alfaro, M. *et al.* (2014) Subsurface cistern (SSC) proliferation in Purkinje cells of the rat cerebellum in response to acute and chronic exposure to paint thinner: A light and electron microscopy study. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **66**, 323–332.
122. Livak, K.J. *et al.* (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, **25**, 402–8.
123. Aguilar-Delfin, I. *et al.* (1996) Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology*, **24**, 657–662.
124. Teresa, M. *et al.* (1997) Ryanodine Receptor Binding Constants in Skeletal Muscle, Heart, Brain and Liver of the Mexican Volcano Mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; Rodentia: Cricetidae). Comparison with Five other Rodent Species. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 529–539.
125. Perkins, G.L. *et al.* (2003) Serum tumor markers. *Am. Fam. Physician*, **68**, 1075–1082.
126. Challet, E. (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J. Comp. Physiol. B.*, **180**, 631–44.
127. Rivera-Zavala, J.B. *et al.* (2011) Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal Markers When Feeding Is Restricted to Two Daytime Hours. *PPAR Res.*, **2011**, 261584.
128. Pérez-Mendoza, M. *et al.* (2014) Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol. Int.*, **31**, 815–28.
129. Díaz-muñoz, M. *et al.* (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**, 2048–2056.
130. Báez-Ruiz, A. *et al.* (2005) Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **289**, G1015-23.
131. Goldani, H.A.S. *et al.* (2007) The role of food restriction on CCl₄ -induced cirrhosis model in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **58**, 331–337.
132. Trepanowski, J.F. *et al.* (2011) Impact of caloric and dietary restriction

- regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr. J.*, **10**, 107.
133. González, O. a *et al.* (2012) Caloric restriction and chronic inflammatory diseases. *Oral Dis.*, **18**, 16–31.
 134. Gonzalez, C. *et al.* (2002) Effects of fasting and intermittent fasting on rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **22**, 129–138.
 135. Isobe, Y. *et al.* (2008) Diethylnitrosamine-induced Hepatic Lesions are Greater in Rats Maintained under a Light-dark Cycle than under Constant Light, Related to the Locomotor Activity Rhythm. *Asian Pacific Jorunal Cancer Prev.*, **9**, 619–624.
 136. Bellet, M.M. *et al.* (2010) Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J. Cell Sci.*, **123**, 3837–48.
 137. Sahar, S. *et al.* (2009) Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 886–896.
 138. Levine, M.E. *et al.* (2014) Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab.*, **19**, 407–417.
 139. Kitamura, K. *et al.* (2011) Proliferative activity in hepatocellular carcinoma is closely correlated with glucose metabolism but not angiogenesis. *J. Hepatol.*, **55**, 846–857.
 140. Pérez-Mendoza, M. *et al.* (2014) Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol. Int.*, **31**, 815–28.
 141. Nakahata, Y. *et al.* (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, **324**, 654–657.
 142. Ramsey, K.M. *et al.* (2009) Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis. *Science.*, **324**, 651–654.
 143. Berger, S.L. *et al.* (2016) Metabolic signaling to chromatin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**,
 144. Williams, L. *et al.* (1996) The influence of food on the absorption and metabolism of drugs: an update. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 201–211.
 145. Jiang, W. *et al.* (2016) The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer Lett.*, **371**, 314–25.
 146. Papagiannakopoulos, T. *et al.* (2016) Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. *Cell Metab.*, **24**, 324–331.
 147. Innominato, P.F. *et al.* (2010) Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 979–1001.

148. Lévi, F. *et al.* (2008) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, **366**, 3575–98.
149. Manoogian, E.N.C. *et al.* (2017) Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging. *Ageing Res. Rev.*, **39**, 59–67.
150. Kamdar, B.B. *et al.* (2013) Night-shift work and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.*, **138**, 291–301.
151. Gu, F. *et al.* (2017) Inherited variation in circadian rhythm genes and risks of prostate cancer and three other cancer sites in combined cancer consortia. *Int. J. Cancer*, **141**, 1794–1802.
152. Kiessling, S. *et al.* (2017) Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth. *BMC Biol.*, **15**, 13.
153. Jakubowicz, D. *et al.* (2013) High Caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity*, **21**, 2504–2512.
154. Hsieh, S.D. *et al.* (2011) Association of short sleep duration with obesity, diabetes, fatty liver and behavioral factors in Japanese men. *Intern. Med.*, **50**, 2499–2502.
155. Baron, K.G. *et al.* (2011) Role of Sleep Timing in Caloric Intake and BMI. *Obesity*, **19**, 1374–1381.
156. Wright, K.P. *et al.* (2013) Entrainment of the human circadian clock to the natural light-dark cycle. *Curr. Biol.*, **23**, 1554–1558.
157. Longo, V.D. *et al.* (2016) Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metab.*, **23**, 1048–1059.
158. Asher, G. *et al.* (2015) Time for food: The intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*, **161**, 84–92.

11 ARTÍCULO PUBLICADO EN FORMATO OFICIAL

ORIGINAL ARTICLE

Time-caloric restriction inhibits the neoplastic transformation of cirrhotic liver in rats treated with diethylnitrosamine

Christian Molina-Aguilar¹, María de Jesús Guerrero-Carrillo², Jesús Javier Espinosa-Aguirre³, Sitali Olguin-Reyes³, Thania Castro-Belio¹, Olivia Vázquez-Martínez¹, Julieta Berenice Rivera-Zavala¹ and Mauricio Díaz-Muñoz^{1,*}

¹Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México, ²Faculta de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México and ³Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 4422 381035; Fax: +442 238 1035; E-mail: mdiaz@comunidad.unam.mx

Abstract

Hepatocellular cancer is the most common type of primary liver cancer. Cirrhosis is the main risk factor that generates this malady. It has been proven that caloric restriction protocols and restricted feeding schedules are protective in experimental carcinogenic models. We tested the influence of a time-caloric restriction protocol (2 h of food access during the daytime for 18 weeks) in an experimental model of cirrhosis-hepatocarcinoma produced by weekly administration of diethylnitrosamine. Our results indicate that time-caloric restriction reduced hepatomegaly and prevented the increase in blood leukocytes promoted by diethylnitrosamine. Strikingly, time-caloric restriction preserved functional and histological characteristics of the liver in fibrotic areas compared to the cirrhotic areas of the Ad Libitum-fed group. Tumoural masses in the restricted group were well differentiated; consider a neoplastic or early stage of HCC. However, time-caloric restriction enhanced collagen deposits. With regard to the cancerous process, food restriction prevented systemic inflammation and an increase in carcinoembryonic antigen, and it favoured the occurrence of diffuse multinodular tumours. Histologically, it prevented hepatocyte inflammation response, the regenerative process, and neoplastic transformation. Time-caloric restriction stimulated circadian synchronization in fibrotic and cancerous liver sections, and it increased BMAL1 clock protein levels. We conclude that time-caloric restriction prevents fibrosis from progressing into cirrhosis, thus avoiding chronic inflammation and regenerative processes. It also prevents, probably through circadian entrainment and caloric restriction, the neoplastic transformation of tumoural lesions induced by diethylnitrosamine.

Introduction

Hepatocellular cancer (HCC) is the most frequent primary tumour in the liver (1). Around 90% of clinical HCC cases show previous cirrhosis (2). Cirrhosis is caused by a variety of chronic liver pathologies. It is accompanied by a change in the architecture of the liver with loss of function resulting from increased collagen synthesis and his deficient degradation. Cirrhosis

development it is preceded by inflammation, apoptosis, and fibrosis processes that are accompanied by energy imbalance and oxidative damage induced by reactive oxygen species that frequently result in chromosomal instability (3).

Treatment with diethylnitrosamine (DEN) is an experimental model used to replicate the sequence of cirrhosis and HCC

Received: June 21, 2016; Revised: April 22, 2017; Accepted: May 17, 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Abbreviations

CEA	carcinoembryonic antigen
CMC	circadian molecular clock
CR	caloric restriction
DEN	diethylnitrosamine
HCC	hepatocellular cancer
MCH	mean corpuscular hemoglobin
SER	smooth endoplasmic reticulum

in rats (4). DEN is hydroxylated and bio-activated by hepatic CYP2E1 and CYP2A5 (5), and it promotes: (i) formation of the mutagenic O6-ethylguanine-DNA adduct in DNA, (ii) pro-inflammatory and pro-fibrotic conditions, (iii) oxidative stress and (iv) regenerative processes. These effects lead to neoplastic transformation (4,6).

Epidemiological studies suggest that circadian rhythm disruption is an important risk factor for different types of cancer (7,8). Circadian rhythms are fluctuations in most of the biological parameters within a period of nearly 24 h (9). The human genome displays circadian variations in expression from 4 to 25% (10). Many cellular processes, such as metabolism, cell cycle progression, stress response, DNA repair, and chromatin remodelling, show circadian rhythms, and their disruption is associated with carcinogenesis (9,11). The timing system consists of a set of interlocking transcriptional/translational feedback loops known as the circadian molecular clock (CMC), which completes one cycle every 24 h and is located in every cell. The CMC is driven by core clock genes including *bmal1*, *clock*, *per1*, *per2*, *cry1*, *cry2*, and their corresponding proteins (10).

It has been suggested that CMC is a tumour suppressor since cancerous cells show reduced expression of clock proteins, and mutated forms of these proteins have been associated with the carcinogenesis process (12,13). Disruption of the *per1* and *per2* genes causes dysfunction in cell cycle check-points and susceptibility to DNA damage associated with malignancies (13,14); *bmal1*^{-/-} mice show an increased rate of spontaneous and radiation-induced neoplasia; mutated *cry* gene has a protective effect on mice expressing a mutant form of p53 (11). Indeed, the overexpression of some clock proteins in cancer cells increases apoptosis and decreases their proliferation rate (15).

Food availability and feeding schedules influence the timing system (16). Synchronization by time-caloric restriction (T-CR) in rats involves daytime food access for 2 h. It induces the expression of the food entrained oscillator (FEO), which is a distributed circadian system formed by the communication between different brain areas and peripheral organs (9). The T-CR protocol implies both the effects of food access schedules and a hypocaloric food intake (~30% less in comparison to *Ad Libitum* conditions) (17). It induces changes in the acrophases of metabolic substrates (glycogen, fatty acids, triacylglycerides), hormones (insulin, ghrelin, glucocorticoids), inflammatory factors (NF- κ B), and cellular events (cell cycle, apoptosis, metabolic pathways) (9).

The aim of this study was to explore the potential protective role of the T-CR protocol against liver damage associated with the cirrhotic and carcinogenic action of chronic DEN treatment. The main findings were that T-CR prevented cirrhotic development, inhibited the neoplastic transformation of liver tissue, favored the daily synchronization of hepatic CMC under healthy and pathological conditions, and promoted the increase of BMAL1, in addition to avoiding chronic inflammation and development of diffuse tumours.

Materials and methods

Experimental procedures

Animals and housing conditions

Male Wistar rats (200 \pm 20 g) were kept on a 12 h light/12 h dark cycle (light on at 08:00 h; average light intensity 350 lux) at room temperature (~22 °C) with free access to food and water. Experimental procedures were conducted according to the Institutional Guide for the Care and Use of Animals Under Biomedical Experimentation (Universidad Nacional Autónoma de México) and conformed to international ethical standards (18).

Treatment with diethylnitrosamine (DEN)

Rats treated with DEN (Sigma-Aldrich, México. N0756) received weekly i.p. injections of 50 mg/kg for 16 weeks, followed by 2 weeks without DEN treatment to avoid acute drug effects. This protocol induces fibrosis/cirrhosis and HCC after 12 and 16 weeks of DEN treatment, respectively (4). Control groups were injected i.p. with phosphate-buffered saline (PBS).

Experimental design

Rats were randomly assigned to one of the following 4 experimental groups (3 rats per cage) for 18 weeks: (i) *Ad Libitum* food access (AL); (ii) restricted feeding schedule limited manually to 2 h daily (from 12:00 to 14:00 h) (T-CR); (iii) AL food access, and DEN treatment (AL \pm DEN); (iv) restricted mealtime schedule, and DEN treatment (T-CR \pm DEN). All groups were fed with 5001 rodent diet (LabDiet, Brentwood, Missouri, USA). The experiments were replicated four times, and at least four rats per group were measured as follows: *n* = 9 in AL groups; *n* = 20 in AL + DEN group; *n* = 9 in T-CR group; *n* = 21 in T-CR + DEN group.

Somatometry and food intake

Food intake was manually quantified once a week at 14:00 h (after 24 h and 2 h of food access for the AL and T-CR groups, respectively). Body weight gain was measured once a week. The Lee index is an accepted parameter that was used to calculate rodent body mass at the end of the experiment (19).

Blood and liver sampling

Rats were sacrificed by decapitation between 10:00 and 12:00 h before T-CR group mealtime. Trunk blood was collected in vacutainer tubes to obtain serum. Parameters of hepatic function, hematic biometry, liver damage, and tumoural markers were determined by standard spectrophotometric techniques used in clinical practice.

Macroscopic evaluation of cirrhosis and cancer

Each liver lobule was weighed, numbered, assigned a representative percentage of the total mass of liver, and the degree of fibrosis/cirrhosis developed was evaluated according to nodule size (20,21). Degree 0: Without apparent nodules; Degree I: Micronodular (<3 mm); Degree II: Medium nodules (3–5 mm); Degree III: Macronodular (>5 mm). Two types of tumour were observed after DEN treatment: HCC tumours (recognized as pale and solid masses) and cavernous hemangiomas (benign tumours) (Supplementary Figure S1). DEN treatment caused two main kinds of HCC lesions: (i) Nodular: well-defined, single or multiple nodules. (ii) Diffuse: small tumour nodules extending diffusely within a lobe or throughout the entire liver. This micronodular character, extension and regularity can be confused with cirrhotic lesions (21).

Tissue sampling and histology staining

Fragments of liver (1–3 mm³) were dissected for histology. Tissue sections were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Liver slices of 7 μ m were stained using standard methods (Lee) (22). Hematoxylin/eosin (H&E) staining was used to assess tissue integrity, architecture, cytology and inflammation using histopathologic criteria (23). Masson Trichrome staining was used to outline collagen fibers. For electron microscopy, liver fragments (~3 mm³) were fixed in 10% formalin and processed according to a previous report (24). The assessment used histopathological criteria (20,21,23,25–29), and examples are presented in Supplementary Figure S3.

RT-qPCR analysis

Total liver RNA was isolated using the TRIzol method. cDNA for CYP2E1 was made with 1 µg of total RNA and M-MVL Retrotranscriptase following the manufacturer's instructions. qPCR was performed with TaqMan Master Mix, TaqMan probes for rat CYP2E1 (Rn00580624_m1), and β-actin (Rn00667869_m1) in a Corbett Rotor-Gene 6000 following the manufacturer's guide. Efficiency curves were made for each probe, and relative expression was calculated using 2-ΔCt mathematical analysis with the AL group as calibrator (30).

Lipid peroxidation

Oxidative stress produced by DEN metabolism was measured using conjugate dienes and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays to quantify lipoperoxidative grade in fibrotic/cirrhotic and tumoural sections of liver samples, as previously reported (31).

Western blot analysis

Defined liver (~1 g) areas of healthy livers and areas showing evident cirrhotic nodules or cancerous masses in DEN treatment were homogenized (32) using the protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Protein was quantified with the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Samples were placed on a 12% polyacrylamide gel under denaturing conditions. They were electroblotted onto a nitrocellulose membrane and then incubated overnight at room temperature with different primary antibodies: Anti-α1-Fetoprotein (ab46799, Abcam, CA, USA) at 1:1000 dilution, anti-PER1 (PAI-524, Thermo scientific, Rockford IL, USA) at 1:100 dilution, anti-BMAL1 (ab3350, Abcam, CA, USA) at 1:500 dilution, anti-CLOCK (PAI-520, Thermo scientific, Rockford IL, USA) at 1:200 dilution, and anti-β-actin (4967, Cell Signaling, USA) at 1:1000 dilution. Membranes were washed and incubated for 2 h at room temperature with alkaline phosphatase (AP) conjugated to the following secondary antibodies: donkey anti-mouse (sc-2320, Santa Cruz, CA, USA) at 1:1000 dilution and donkey anti-rabbit (ab97061, ab46799, Abcam, CA, USA) at 1:4000 dilution. Bands were visualized using the AP conjugate substrate kit (Bio-Rad, USA) according to the manufacturer's instructions. The Image Lab.Ink program was used for quantification.

Pictures

Pictures were taken using the Image-Pro Plus 6.0 program with ×20 and ×40 magnification.

Statistics

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were compared using a two-way ANOVA for independent measures, with group factor and time factors in cases of weekly data, followed by Bonferroni post hoc tests with a significance threshold set at $P < 0.05$.

The Student's t-test was done with the significance threshold set at $P < 0.05$. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 and graphs were made with SigmaPlot 10.0.

Results

Somatometry

T-CR rats were slimmer

The T-CR regimen promoted ~36% lower daily food intake (Figure 1B) leading to ~28% lower weight compared to the AL group after 18 weeks (marked with arrow in Figure 1A). It also induced a ~6% reduction in the Lee index (Figure 1C).

DEN promoted weight reduction

The AL + DEN group weighed ~11% less than the AL group in week 7 (marked with arrow in Figure 1A). By week 18, the AL-DEN group exhibited ~12% less weight (Figure 1A). In average, the AL + DEN group showed ~6% less daily food intake compared to the AL group (Figure 1B), but without changes in the Lee index (Figure 1C). The T-CR + DEN group, which weighed 12% and 17% less than the T-CR group at weeks 11 and 18, respectively (marked with arrow in Figure 1A), ingested 16% less food per day (Figure 1B) without change in the Lee index (Figure 1C).

T-CR partially protected against hepatomegaly

Hepatomegaly and splenomegaly were observed in DEN-treated groups: liver/body weight ratio in the AL + DEN group increased 180% in comparison to the AL group. In contrast, the T-CR protocol reduced hepatomegaly by 165% in the DEN group. Splenomegaly developed similarly in both DEN groups (Figure 1D and E). The enlarged spleen is not a disease in itself, but it is a condition associated with portal system dysfunction promoted by the fibrotic/cirrhotic pathology.

Blood chemistry and liver function tests

T-CR preserved normal blood parameters

The T-CR protocol did not affect blood parameters, but it reduced urea nitrogen by 24% (Supplementary Figure S2B). The mean corpuscular hemoglobin (MCH) level was 9% higher in the T-CR group than in the AL group (Supplementary Figure S2C), suggesting that the nutritional state was not affected in rats under the T-CR protocol.

DEN promoted a compensated cirrhosis-like state

The AL + DEN group showed a 2.2-fold increase in total bilirubin (68% direct bilirubin and 32% indirect bilirubin), increases of 1.8 folds in alkaline phosphatase (AP) (Table 1C), 2.1 folds in alanine aminotransferase (ALT), 1.5 folds in aspartate aminotransferase (AST) and 3.9 folds in gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) (Table 1D) compared with AL group. No significant changes were observed in biosynthetic and clotting functions (Table 1B). These data suggest fibrosis/cirrhosis development after DEN treatment. The red blood cell fraction showed reductions in erythrocytes (6%), hemoglobin concentration (11%), hematocrits (12%) and medium corpuscular hemoglobin concentration (Supplementary Figure S2C). These data indicate a compromised nutritional status in rats treated with DEN.

The T-CR + DEN group showed enhanced hyperbilirubinemia

The T-CR + DEN group showed increasing in AP 2.2 times (Table 1C), ALT 2.5 times, AST 1.8 times, and GGT 2.2 compared with T-CR group. One important difference was an increase of circulating bilirubin 4.6 folds compared with the T-CR group (75% direct bilirubin and 25% indirect bilirubin) (Table 1D). No changes were observed in biosynthetic and clotting functions (Table 1B). These data are also indicative of a compensated fibrotic/cirrhotic state but with reduced capacity of excretion in the T-CR + DEN group. In contrast to the AL + DEN group, all T-CR + DEN parameters related to red blood cells were normal (Supplementary Figure S2C), indicating healthy nutritional conditions in spite of the reduced food intake.

DEN induced a pro-inflammatory state in the AL + DEN group

White blood cells (leukocytosis) in the AL + DEN group increased 80% compared to the AL group (Table 1E). This effect is suggestive of a pro-inflammatory condition.

Anti-inflammatory effect of T-CR

T-CR + DEN rats had a normal white blood cell count, indicating that food restriction prevented the pro-inflammatory condition observed in the AL + DEN group (Table 1E). The liver histopathological evaluation showed that macrophage and lymphocyte presence was 20% higher in the T-CR + DEN group than AL + DEN.

Fibrotic/cirrhotic state evaluation

It is important to clarify that 100% of rats treated with DEN developed some degree of fibrosis/cirrhosis and evidence of cancer.

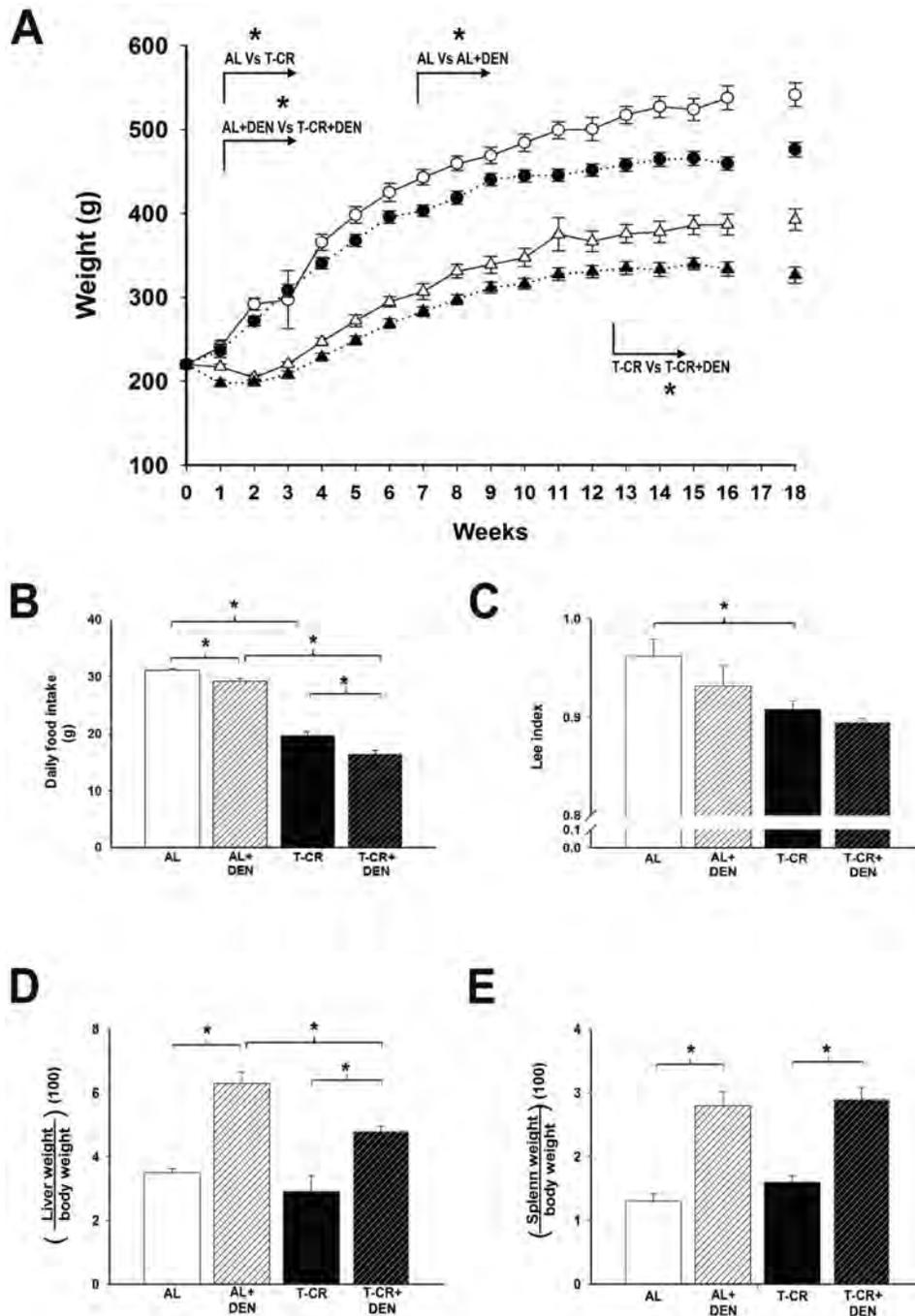


Figure 1. Somatometry. (A) Body weight in grams throughout the 18-week experimental protocol. Open circle (o), AL group; black circle (•), AL + DEN group; open triangle (Δ), T-CR group; black triangle (▲), T-CR + DEN group. Statistical differences between these groups are marked by arrows. The comparisons included: (AL vs T-CR), (AL + DEN vs T-CR + DEN), (AL vs AL + DEN) and (T-CR vs T-CR + DEN). The bar graph shows the mean ± SEM. (B) Daily food intake in grams: white bar, AL group; white bar with lines, AL + DEN group; black bar, T-CR group; black bar with lines, T-CR + DEN group. (C) Lee Index. (D) Hepatomegaly. (E) Splenomegaly. Statistical differences are marked with *. Two-way ANOVA ($P < 0.05$) was used for panel (A), and Student's t-test ($P < 0.05$) was used for panels (B–E). Bars represent mean ± SE. Bonferroni's post hoc test was used for statistical correction.

The T-CR + DEN group showed more aggravated fibrotic macroscopic alterations

The macroscopic evaluation indicated that most of the AL + DEN rats (77%) developed Degree I and Degree II of macronodular fibrosis/cirrhosis. A smaller percentage (19%) did not present macroscopic cirrhotic lesions, and only 4% of the rats had severe cirrhotic damage (Degree III) (Figure 2A). In contrast, T-CR + DEN rats showed a more accentuated macroscopic damage since

75% developed Degree II and Degree III of fibrotic/cirrhosis alterations.

The histological evaluation showed more collagen deposits in the T-CR + DEN rats

The Masson trichrome staining indicated in the AL + DEN group a decrease in sinusoids and space of Disse by an increase in cell proliferation. Collagen deposits were evident, as they

Table 1. Liver function test (A–D) and blood chemistry for white series (E)

		AL	AL + DEN		T-CR	T-CR + DEN		
A	Total bilirubin (mg / dl)	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.02	&	0.15 ± 0.01	0.69 ± 0.08	¥ ¶	
	Direct bilirubin (mg / dl)	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.02	&	0.12 ± 0.01	0.52 ± 0.08	¥ ¶	
	Indirect bilirubin (mg / dl)	0.02 ± 0.004	0.07 ± 0.01	&	0.03 ± 0.01	0.18 ± 0.02	¥ ¶	
	Alkaline phosphatase (IU/L)	186 ± 10	327 ± 19	&	162 ± 8	360 ± 20	¥	EXCRETION
B	Total protein (g/dl)	6.39 ± 0.10	6.70 ± 0.08	&	6.40 ± 0.11	6.89 ± 0.10	¥	
	Albumin (g/dl)	2.31 ± 0.33	2.35 ± 0.24		2.53 ± 0.40	2.45 ± 0.19		
	Globulin (g/dl)	4.13 ± 0.27	4.35 ± 0.22		3.88 ± 0.34	4.36 ± 0.25		
	Rel_A/G	0.65 ± 0.13	0.62 ± 0.09		0.79 ± 0.16	0.65 ± 0.08		BIOSYNTHETIC
C	Prothrombin time (seconds)	9.60 ± 0.20	9.04 ± 0.10	&	9.85 ± 0.2	11.5 ± 0.80	¶	
	Activity (%)	163 ± 9	194 ± 6	&	151 ± 10	108 ± 15	¶	
	INR	0.84 ± 0.02	0.81 ± 0.02		0.86 ± 0.02	0.99 ± 0.07	¶	CLOTTING
D	ALT (IU/L)	112 ± 10	235 ± 15	&	88 ± 40	218 ± 11	¥	
	AST (IU/L)	274 ± 13	405 ± 29	&	255 ± 21	445 ± 36	¥	
	GGT (IU/L)	13 ± 2	51 ± 6	&	26 ± 9	57 ± 8	¥	
	Lactic dehydrogenase (IU/L)	2156 ± 167	1943 ± 116		2303 ± 222	1778 ± 116	¥	INTEGRITY
E	WBC (103/mm3)	15 ± 1	27 ± 4	&	11 ± 2	12 ± 1.5	¶	
	% lymphocytes	80 ± 2	67 ± 2	&	82 ± 3	73 ± 2	¥ ¶	
	# Lymphocytes	12 ± 1	17 ± 3		9 ± 2	9 ± 1	¶	
	% Monocytes	11 ± 1	19 ± 0.3	&	10 ± 1	17 ± 1	¥	
	# Monocytes	1.6 ± 0.1	4.8 ± 0.6	&	1 ± 0.2	# 2 ± 0.3	¶	
	% Granulocytes	9.5 ± 2	14 ± 2		8 ± 2	10 ± 2		WHITE BLOOD CELL
	# Granulocytes	1.5 ± 0.2	3.6 ± 0.4	&	0.8 ± 0.05	# 1.3 ± 0.2	¶	

Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), white blood cells (WBC), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV), red blood cell distribution width (RDW), mean platelet volume (MPV), protein disulfide isomerase (PDI). Student's t-test ($P < 0.0001$). Symbols for statistical differences: (#) AL vs T-CR, (&) AL vs. AL + DEN, (¥) T-CR vs. T-CR + DEN, (¶) AL + DEN vs. T-CR + DEN.

covered the portal zone and fragmented the structure of the liver lobule with macro- and micro-nodulation in zones 1, 2 and 3. Hyperplasia and neo-formation of bile ducts were also evident (Figure 2C and D, and Supplementary Figure S3). The T-CR + DEN group had more collagen deposits and thicker septa; it also presented alterations in tissue architecture, especially an enhanced neo-formation of bile ducts but with less dissociation of hepatocyte cords compared with the AL + DEN group, indicating that cell proliferation did not increase (Figure 2C and D).

Markers for hepatocarcinoma alteration

Circulating α -Fetoprotein (α -FP), GGT and carcinoembryonic antigen (CEA) were used as markers for HCC. α -FP and GGT increased significantly in both DEN-treated groups (Figure 3A and B). In contrast, the T-CR protocol prevented a substantial rise in the CEA observed in AL + DEN rats (~51%) (Figure 3C). These results suggest that DEN stimulated cancerous development was not modified by the T-CR protocol. However, the CEA levels in the T-CR + DEN regime seem to indicate a reduction in the metastatic capacity of HCC.

HCC in the T-CR + DEN group is mostly diffuse

Tumour classification has been described based on macroscopic images. These classification systems generally require examination of the entire tumour and do not provide prognostic or predictive information by themselves, nor do they give clues that

can explain pathogenesis. HCC can develop in different forms: (i) Uninodular, a single, well-defined tumour with a parenchymal-like aspect; (ii) multinodular, several well-defined tumours with a parenchymal-like aspect; (iii) massive, large tumour masses which can encompass an entire liver lobe; (iv) diffuse, a collection of small tumours distributed throughout the liver lobules (20).

Macroscopic analysis showed that 75% of liver tumours in the AL + DEN group were multinodular, and only 15% were diffuse (Figure 3D and E). In contrast, tumours in the T-CR + DEN group were mostly diffuse (62%), and only 33% were multinodular; however, both types of tumours presented an early stage of carcinoma (Figure 3D and E and Supplementary Figure S4). Little is known about the characteristics of diffuse HCC because the cirrhotic phenotype is usually discovered in the final stage of the disease or post-mortem. Since T-CR clearly induces a change in the type of tumour, histopathological evaluation (degree of neoplastic un-differentiation) becomes relevant.

Histopathological evaluation of den-treated rat livers

H&E staining was used to characterize the degree of neoplastic transformation and cancer aggressiveness in DEN-treated rat livers. As expected, normal characteristics (hepatocytes with granular eosinophilic cytoplasm, and intact nuclei with well-defined nucleoli) were found in the AL and T-CR groups (Figures 4 and Supplementary Figure S3).

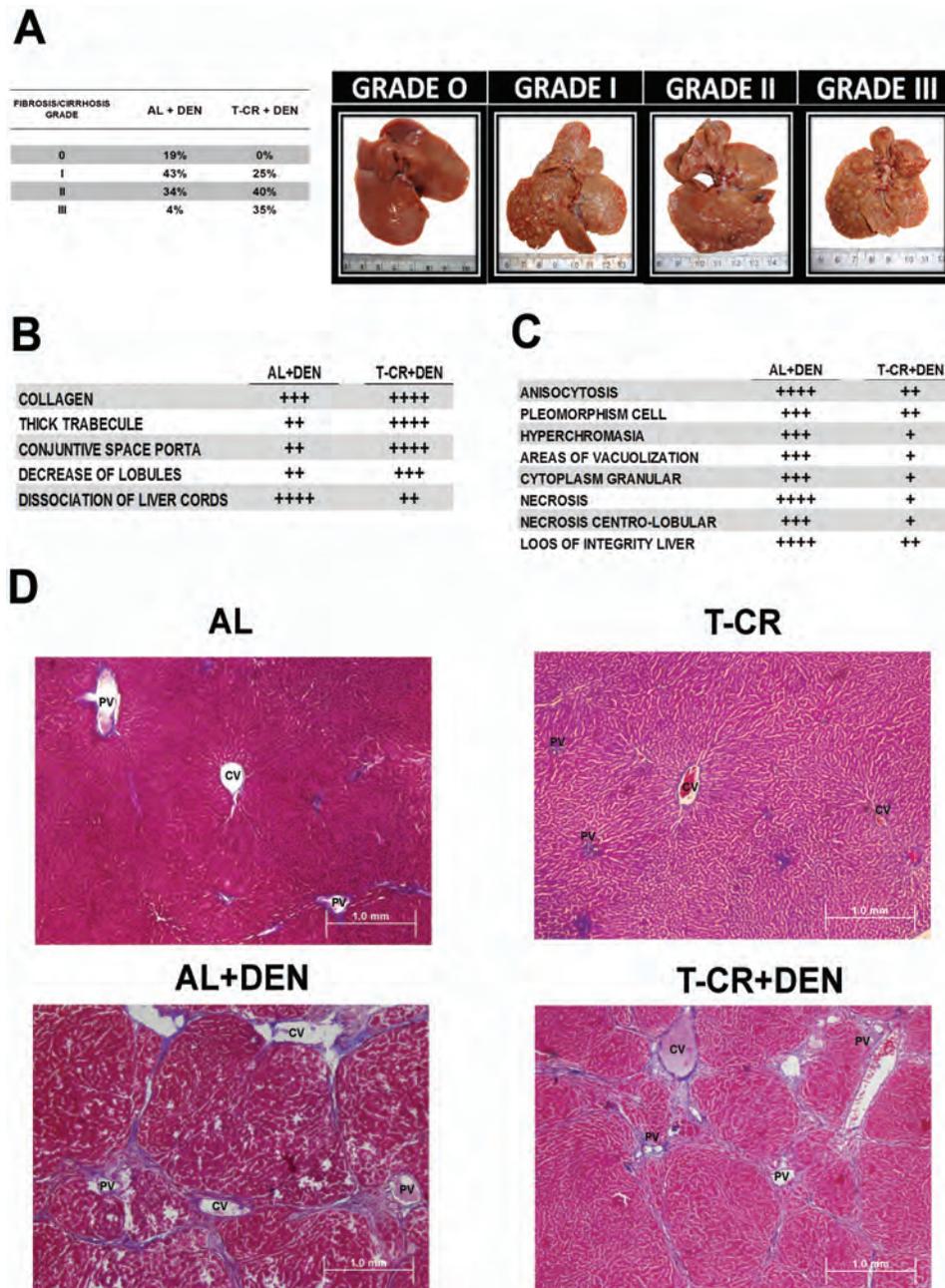


Figure 2. Cirrhotic evaluation. (A) Macroscopic evaluation of cirrhotic nodules, Degree 0 to III, represented as total liver percentage. Degree 0 corresponds to an absence of well-defined nodules; Degree I livers have micronodular development; Degree II livers express micronodular and macronodular development; Degree III livers only exhibit macroscopic nodulation. (B) Microscopic analysis of histological properties in fibrotic/cirrhotic areas of DEN-treated rat livers. Changes were compared with healthy groups and averages are represented by crosses: (+) slight changes throughout the liver and thin collagen fibers in the portal zone; (++) medium change throughout the liver and thickening of collagen fibers in the portal zone; (+++) high damage throughout the liver, thickening of collagen fibers in the portal zone, and invasion of intermediate zone (between portal and central zones); (++++) severe changes throughout the liver and destruction of acinus structure through collagen fiber invasion in the portal, central, and intermediate zones. (C) Cytological assessments in cirrhotic areas. The degrees of change in cytological levels are represented with crosses: (+) slight, (++) moderate, (+++) high, and (++++) diverse. (D) Masson Trichrome stains show collagen fibers in blue. Central vein (CV), portal vein (PV). All pictures were captured with $\times 4$ objective.

Fibrotic/Cirrhotic histological fields

The H&E stains showed in the AL + DEN group large zones with pleomorphic hepatocytes; extensive areas with anisocytosis (evidence of the inflammatory state), the presence of fat vacuoles and granular eosinophilic cytoplasm. It also showed nuclei with reactive chromatin and a high incidence of dismembered nuclei, pyknosis and karyolysis. This group presented signs of necrosis, inflammation, and active cicatrization. In contrast,

the T-CR + DEN group preserved its cellular and histological conditions with scarce regenerative fields and no evidence of inflammation (Figures 4 and Supplementary Figure S3).

Cancerous histological fields

Tumoural zones in the AL + DEN group were clearly marked by connective tissue with frequent vascular infiltration; most cells looked un-differentiated (malignant cells) and were arranged in

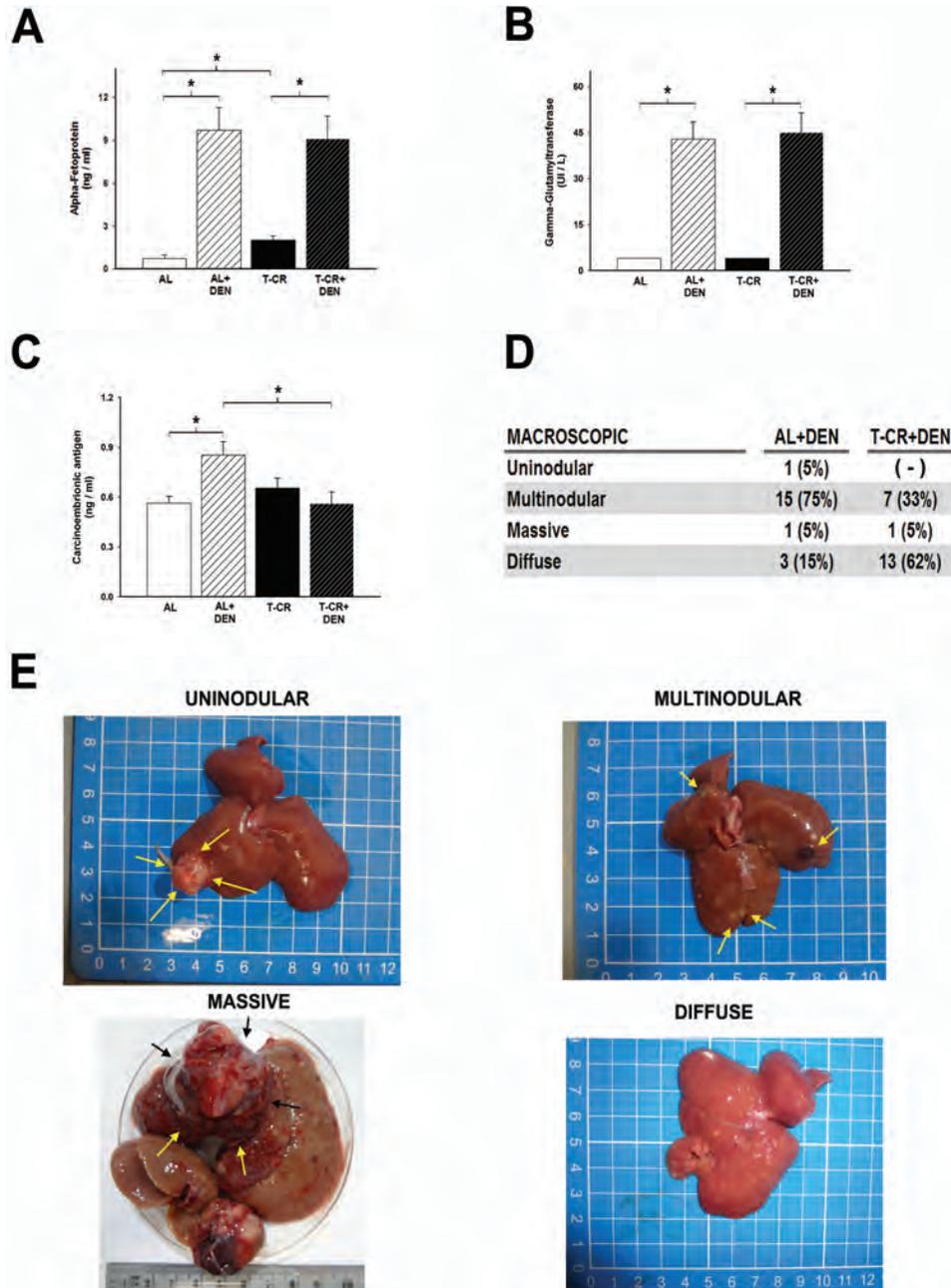


Figure 3. Macroscopic evaluation of HCC. (A) Serum concentration of α -fetoprotein (glycoprotein used as a tumour marker) in healthy groups (AL and T-CR) and DEN-treated groups (AL + DEN and T-CR + DEN); bars represent mean \pm SE. (B) Serum concentration of gamma-glutamyl transferase (enzyme used as an early marker of cancer in patients with cirrhosis) in healthy groups (AL and T-CR) and DEN-treated groups (AL + DEN and T-CR + DEN); bars represent mean \pm SE. (C) Serum concentration of carcinoembryonic antigen (used as a tumoural marker describes a set of highly related glycoproteins involved in cell adhesion) in healthy groups (AL and T-CR) and DEN-treated groups (AL + DEN and T-CR + DEN); bars represent mean \pm SE. (D) Macroscopic evaluation of HCC in four different kinds of mass differentiation: Uninodular, a liver with only one tumour mass that does not encompass all lobules; multinodular, a liver with two or more tumour masses that do not cover a complete lobe; massive, a liver with a large tumour mass that covers an entire lobe; diffuse, a liver with multinodular HCC development throughout the liver and a cirrhotic-like appearance. (E) Pictures that exhibit uninodular, multinodular, massive, and diffuse HCC development.

trabecular structures. Transformed cells had a reduced nucleus/cytosol ratio, larger nuclei and prominent nucleoli, and a grainy, basophilic cytoplasm (Figures 4 and Supplementary Figure S3). In contrast, tumoural zones in the T-CR + DEN group were clearly marked by connective tissue with lower vascular infiltration; they also had anaplastic and pleomorphic cells with cytosolic fatty degeneration and areas with malignant cells arranged into acinus and trabecular structures (Figures 4 and Supplementary

Figure S4). The diffuse and nodular tumours of the T-CR + DEN group showed well-differentiated cells that indicated hyperplasia and early stages of HCC; these results are consistent with lower CEA levels.

Cavernous hemangiomas

Surprisingly, DEN treatment also induced the formation of cavernous hemangiomas (benign tumours that were fluffy, reddish

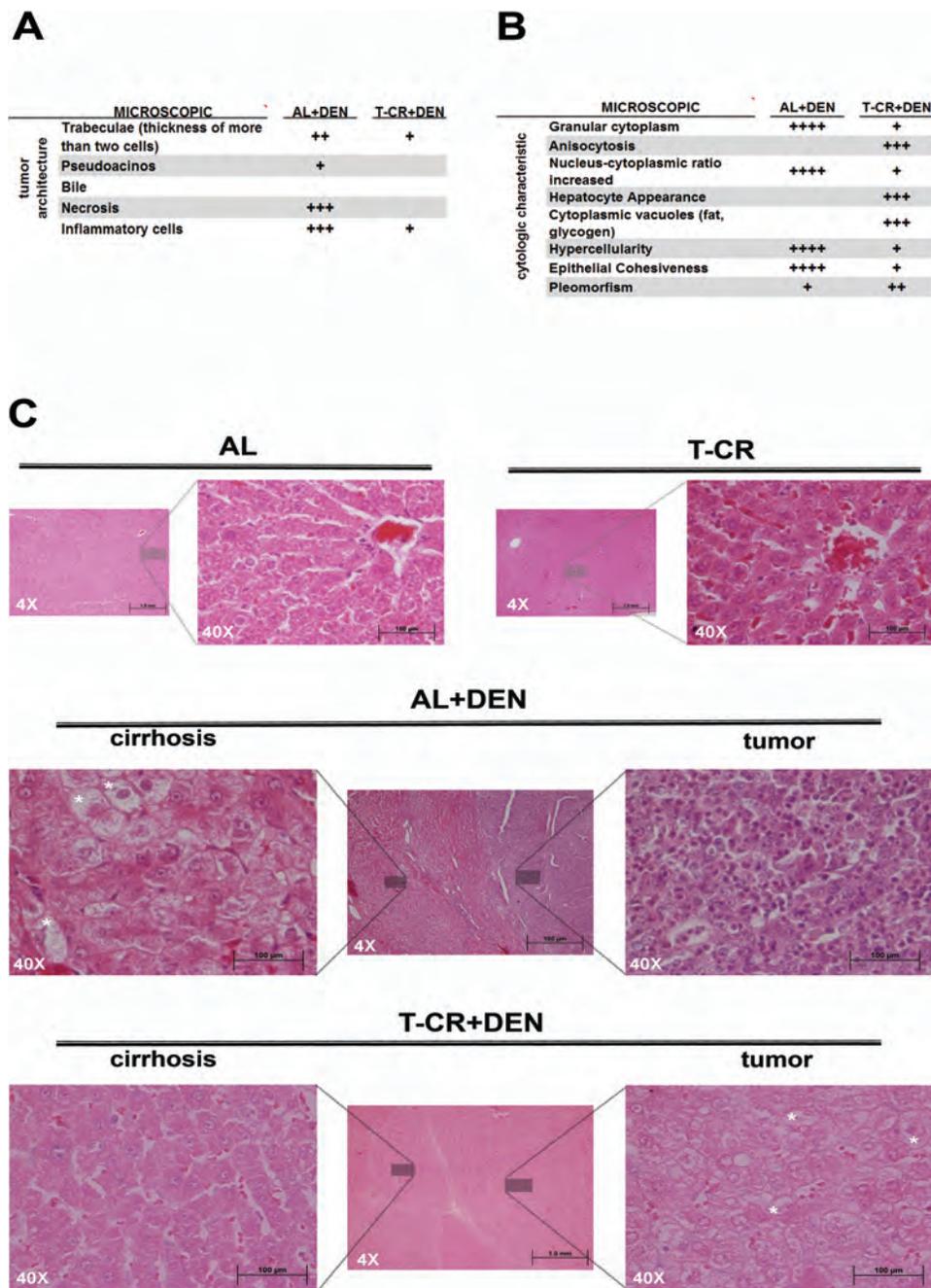


Figure 4. Histopathological evaluation of HCC. (A) Microscopic evaluation of the architectural characteristics of tumour masses in AL + DEN and T-CR + DEN groups. (B) Microscopic evaluation of the cytological characteristics of tumour masses in AL + DEN and T-CR + DEN groups. Crosses in panels A and B indicate the degree of change in tissue and cells as follows: (+) light, (++) moderate, (+++) advanced, and (++++) very advanced. The absence of crosses means that there were no changes. (C) Hematoxylin and eosin staining of representative tissues. Healthy groups (AL and T-CR) are presented at the top ($\times 4$ magnification) and are marked with gray square augmentation ($\times 40$). The middle of panel C has a panoramic image of cirrhotic and tumoural areas in the AL + DEN group ($\times 4$ magnification). Cirrhotic (left) and tumour (right) areas are presented with $\times 40$ magnification. The bottom of panel C has a panoramic image of the cirrhotic and tumour areas in the T-CR + DEN group; cirrhotic (left) and tumour (right) areas are presented with $\times 40$ magnification. All images have calibration bars in lower right corner. (*) Anisocytosis.

and had high blood vessel levels). Hemangiomas in the AL + DEN and T-CR + DEN groups were equal in number and size (data not shown).

Electron microscope evaluation

The AL group exhibited healthy hepatocytes with swollen mitochondria without obvious cristae, little endoplasmic reticulum,

and large areas of cytosolic clear spaces without organelles. The T-CR group presented mitochondria with clear cristae and better membrane integrity. Strikingly, this group showed an increase in smooth endoplasmic reticulum (SER) and the formation of concentric cisternae covering ~50% of the cytoplasmic area. Nuclei in both groups presented reactive chromatin and prominent nucleoli (Figure 4 and Supplementary Figure S3).

Electron microscope study of fibrotic/cirrhotic sections

Hepatocytes in the cirrhotic area of the AL + DEN group exhibited large sections without organelles in the cytosol; besides less SER with swelling and disrupted membranes, and no attached ribosomes. That hepatocytes presented fat vacuolization, pyknotic nuclei with slight indentations, and very reactive chromatin. Pleomorphic mitochondria presented loss of integrity in internal membranes (Supplementary Figure S5). In contrast, the cirrhotic area of the T-CR + DEN group presented hepatocytes with larger mitochondria with less swelling, fewer pleomorphic alterations, and enhanced membrane integrity; also a large increase in SER with formation of concentric cisternae covering ~70% of the cytoplasmic area was observed. They also showed nuclei with few indentations, reactive chromatin and evident nucleoli (Supplementary Figure S5).

Electron microscope study of cancerous sections

In the tumour areas, the AL + DEN group showed cells with a reduced nuclei/cytosol ratio with fewer mitochondria and a loss of inner membrane integrity. Cells contained less SER with swelling and disrupted cisternae (Supplementary Figure S5). In contrast, the T-CR + DEN group showed swelling and pleomorphic cells that had small and pleomorphic mitochondria with better membrane integrity. Again, T-CR induced the formation of concentric cisternae in hepatocytes formed by SER, which covered ~70% of their cytoplasmic area; also showed nuclei with less indentations, reactive chromatin and evident nucleoli (Supplementary Figure S5). These results suggest once more that

tumours in the AL + DEN presented a more advanced degree of carcinogenesis than tumours in the T-CR + DEN group.

DEN bioactivation and liver pro-oxidant reactions

Since DEN-treated rat livers are mosaics of fibrotic/cirrhotic and tumoural areas, Western blotting was used to measure the presence of α -FP and determine whether each of the dissected hepatic segments was tumoural (high α -FP) or fibrotic/cirrhotic (low α -FP). α -FP levels in fibrotic/cirrhotic homogenates were the same as those in the groups not treated with DEN. However, α -FP was significantly higher (~15 folds) in the cancerous liver tissues of both DEN-treated groups (Figure 5B).

We quantified CYP2E1 mRNA in the liver to test if T-CR could reduce DEN bio-activation and influence its hepatotoxic action. No differences were observed between the livers of DEN-treated animals. The expression of CYP2E1 mRNA was very low in cirrhotic sections and even lower in cancerous sections (Figure 5A), suggesting that DEN was metabolized equally in AL + DEN and T-CR + DEN groups.

Cancerous liver tissue in both DEN-treated groups showed a significant increase in conjugated dienes. However, this increase was not observed in the TBARS assay (Supplementary Figure S6).

Synchronization of the circadian molecular clock

Tissues from the fibrotic/cirrhotic and tumour sections of the liver were tested to determine the presence of clock proteins (Figure 5) and learn whether the T-CR protocol could entrain the CMC. Liver samples were collected from 10:00 h to 12:00 h in

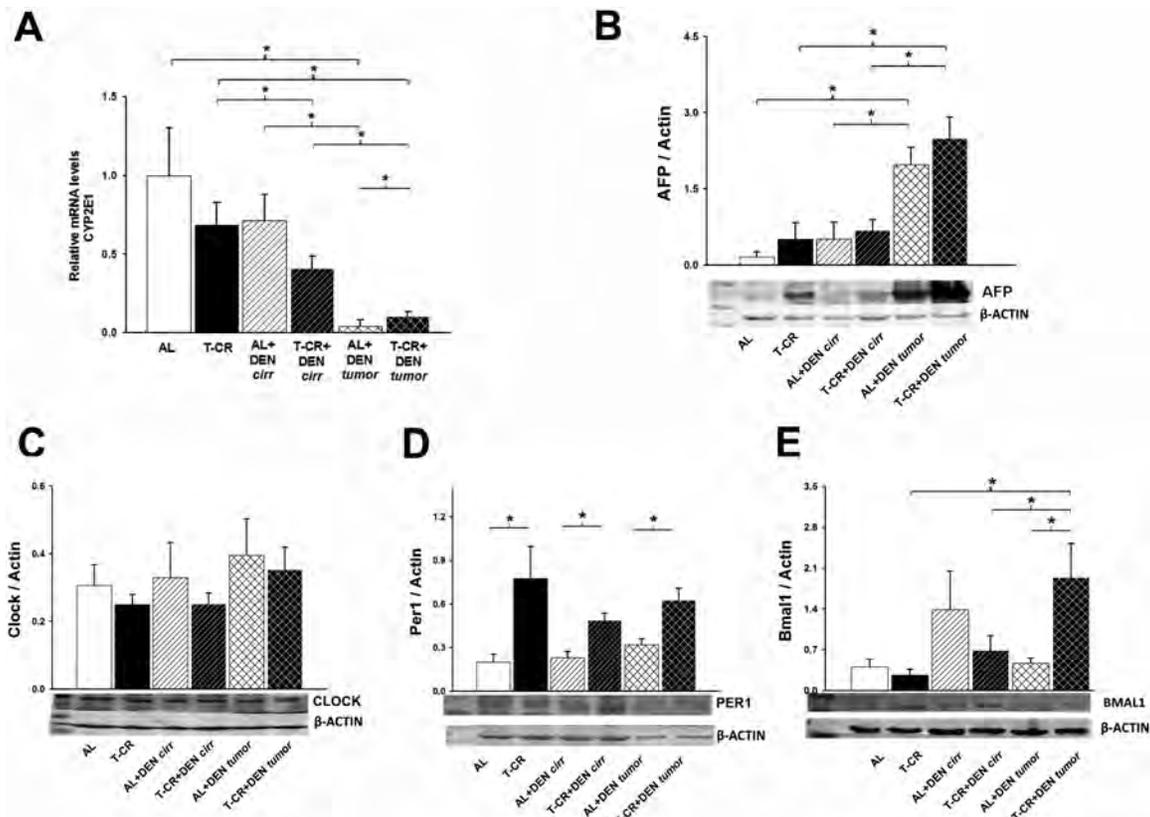


Figure 5. Molecular clock function. (A) Relative levels of mRNA for cytochrome CYP2E1 to represent healthy groups (AL and T-CR) and differentiate the cirrhotic and tumoural areas of DEN-treated groups (AL + DEN and T-CR + DEN). (B) Liver section homogenates (healthy, cirrhotic, tumour and hemangioma tissues) were identified and classified per α -fetoprotein blot (HCC marker). Homogenates of tissues listed in panel B were used to measure clock proteins shown in C, D and E panels. (C) Western blot of clock protein. (D) Western blot of PER1 protein. (E) Western blot of BMAL1 protein. Bars represent mean \pm SE. Asterisks represent significant statistical differences through Student's t-test ($P < 0.05$) analysis and using Bonferroni's post hoc test.

all groups; therefore, high levels of PER1 were expected in T-CR groups and lower levels were expected in AL groups (17,33). Indeed, Figure 5D shows that PER1 levels in the T-CR group were higher (~180%) than in the AL group. Strikingly, PER1 increased in the fibrotic/cirrhotic and tumoural liver fragments (~100–145%) by T-CR synchronization. These results indicate that T-CR entrained the CMC, even in the cirrhotic and tumoural sections of the livers (Figure 5D).

BMAL1 protein levels increased in T-CR tumours compared to AL + DEN tumours (300%); Furthermore BMAL1 was increased 333% compared with T-CR and 355% compared with T-CR + DEN cirrhotic areas (Figure 5E). CLOCK expression remained the same in both healthy and DEN-treated groups (Figure 5C). These data suggest that the T-CR protocol sustained CMC entrainment even after the liver had been altered by cirrhotic and carcinogenic processes.

Summary of results

Supplementary Figure 7 summarizes all results related to fibrotic/cirrhotic damage and HCC development, and the protection associated to the T-CR protocol.

Discussion

The use of DEN to induce fibrosis/cirrhosis and HCC is a convenient model to study and replicate the clinical condition. It is important to clarify that all DEN-treated rat livers had a mosaic-like appearance because they developed some degree of fibrosis/cirrhosis, pre-neoplastic and neoplastic areas; hence, histopathological evaluation was fundamental.

In this study, we used food access and time-caloric restriction to better understand how this protocol can be used as a potential therapeutic tool.

Systemic and tissue-specific disruption of the circadian machinery leads to changes in cellular functions, such as cell division and metabolism, which are highly related to cancer. Emerging evidence in different cellular and *in vivo* models points to an important role of core circadian genes in carcinogenesis. It is unclear how oncogenic events may cooperate with circadian clock disruption during cancer initiation and progression (12).

Time-caloric restriction as a synchronizer

Rats under the T-CR protocol for 3 weeks ate ~36% less than AL rats (17). T-CR is a synchronizing protocol that involves two variables: A feeding schedule and calorie restriction (9).

Timed feeding can reset peripheral oscillator phases with minor effects on SCN clockwork phases when animals are synchronized by light–dark cycles. Daytime food deprivation and calorie restriction lead to loss of body mass (~15%) and increased motor activity; they also affect the timing of daily activity, as nocturnal animals become partially diurnal (34). T-CR synchronizes liver CMC: it shifts the PER1 peak to the feeding schedule in the light period (33) and the BMAL1 peak to the dark period (17). Moreover, both peaks are in antiphase compared to the AL group.

As previously reported, T-CR affects liver metabolism; it increases β -oxidation and ketogenesis, upregulates gluconeogenic responses, intensifies mitochondrial activity and modifies daily profile of ATP synthesis (9,35–38). In addition, hepatic energy charge increases during T-CR, whereas cytoplasmic and mitochondrial redox states become oxidized (9). We have ruled out that T-CR induces an acute phase response (33) that increases apoptosis and cell cycle rates without loss homeostasis (39). These changes, produced by T-CR synchronization, might affect the initiation, development, and progression of cancer.

T-CR prevents fibrosis progression

The AL + DEN group developed clearly cirrhosis because it exhibited collagen deposits, chronic inflammation, oxidative stress and regenerative processes. Despite having more collagen deposits and equal oxidative stress levels, the T-CR + DEN group only developed fibrosis due to the absence of chronic inflammation and uncontrolled regenerative processes. Furthermore, the optimum liver function and nutritional condition in the T-CR + DEN group prevented the fibrosis from developing into cirrhosis. Since it has been reported that hypocaloric protocols exacerbate pro-fibrotic treatments increasing collagen deposits, we can relate the increase of collagen to caloric restriction (40).

DEN-treated rats held under constant lighting showed more severe carcinogenic hepatic damage, although the precise induction mechanism is unclear (41).

Anti-inflammatory effect of T-CR

Inflammatory responses play decisive roles at different stages of tumour development, from initiation to metastasis. Inflammation also affects immune surveillance and responses to anti-oncogenic therapy. Caloric restriction in mammals is recognized as the best strategy for extending life span, retarding physiological aging and delaying the onset of age-associated diseases (42).

T-CR preserved the histological properties of the liver and prevented its neoplastic transformation

Although the number and size of the tumours indicate a pathological condition, neoplastic transformation is the best indicator of cancer aggressiveness. Therefore, histopathological evaluation was essential for this study. The anti-inflammatory effect of T-CR (Table 1E) can be a crucial deterrent of the neoplastic transformation of tumours (Figure 4).

Tumoural cells in the AL + DEN group showed clear characteristics of an advanced neoplastic phenotype (Figure 4 and Supplementary Figure S4), consistent with the increase in CEA (marker of metastatic state) (Figure 3C). The normal levels of circulating CEA in the T-CR + DEN group suggest a lower degree of neoplastic transformation, which was confirmed by histological and electron microscope evaluations (Figures 3 and 4, and Supplementary Figure S5). Overall, the T-CR + DEN group preserved the hepatocyte phenotype and avoided neoplastic transformation, as the areas with damage remained in the early stage of HCC or did not exhibit neoplastic changes.

Nutritional state

Caloric restriction (CR) is an experimental manipulation focused on reducing calorie intake without causing malnutrition, and that induces life span extension in many species; but the underlying mechanism that modifies aging, inflammation and metabolism is unclear (42–44). That effect could involve the interaction of insulin/IGF1-like growth factor, AMPK, mTOR signaling pathways, and the sirtuin protein family (42,43). CR also influences the functional and molecular link between energy balance, chromatin remodeling, and circadian physiology (43,44).

Nutritional data for our T-CR protocol (using albumin, hemoglobin concentration, and mean corpuscular hemoglobin) (Table 1B and Supplementary Figure S2) indicate a normal state in spite of the significant reduction in food intake (~36%), suggesting a CR without malnutrition (typically 20–40% of AL consumption).

DEN treatment alone reduced weight gain by 22% in AL rats (Figure 1A) with signs of anemia (reduced albumin, hemoglobin concentration, and mean corpuscular hemoglobin) (Table 1B

and Supplementary Figure S2). In contrast, the T-CR + DEN group showed a normal nutritional state (Figure 1C, Table 1B, and Supplementary Figure S2).

DEN metabolism

Since the levels of the CYP2E1 mRNA were not altered (Figure 5A) and similar pro-oxidative activity was observed in cirrhotic and tumoural samples of the AL + DEN and T-CR + DEN groups (Supplementary Figure S6), it could be ruled out that the protective effects associated with the T-CR protocol were caused by alterations in DEN bioactivation. It has been shown that clock genes play an important role in DEN-induced cytotoxicity and in the susceptibility to apoptosis in drug-treated hepatocytes (5). Our results did not reveal changes in hepatic CLOCK signals (Figure 5C). Indeed, the molecular mechanism whereby circadian clock alterations influence cancer development and progression could be explained by its regulation of the cell cycle, as well as by DNA damage responses and cellular metabolism (44).

Circadian physiology as a counteractive mechanism of neoplastic transformation

As previously mentioned, CMC measures time and allows synchronization to different stimuli; however, recent studies prove that CMC also has antineoplastic effects. It has been discovered that BMAL1 could bind directly to the p53 gene promoter, thereby transcriptionally activating the downstream tumour suppressor pathway, increasing apoptosis levels, and decreasing cellular proliferation in pancreatic cancer (15).

Meal timing can reset CMC in peripheral tissues, thus slowing the growth of tumoural masses and producing fewer and smaller tumours. For example, Wu et al. (45) revealed that food restriction reduced the progression of inoculated Glasgow osteosarcoma. They compared mice fed AL to mice with restricted access to food for 4–6 h during the light and dark periods. Both restricted feeding conditions improved survival and delayed tumoural growth compared to the AL group, but the protective effect was more significant when food restriction was applied during the light period.

Chronotherapy has emerged as a therapeutic strategy that applies knowledge about how circadian rhythms can potentiate the effect of anti-cancer drugs (46,47). Identifying the best treatment schedule makes it possible to obtain similar or better results with reduced drug doses (46,47). Since circadian rhythmicity modulates the sensitivity of many therapeutic cytotoxic targets, controlling meal times might increase treatment efficacy (5).

Isolated hepatocellular carcinoma cells are capable of generating circadian rhythms *in vitro* (5). Temporal day-night restriction of food alters the phase of rhythms in both healthy and malignant tissues. However, hepatomas were more sensitive to food intake signals depending on meal times (5).

It has been shown that BMAL1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumour suppressor pathway, thereby inducing apoptosis and cell cycle arrest (15). These findings suggest that the T-CR-induced BMAL1 increase would be a useful target to continue researching about how T-CR affects HCC development.

In conclusion, the T-CR protocol reduced the underlying damage produced by DEN treatment (Figure 7). It also modified fibrotic/cirrhotic and HCC development sequences, thus preventing chronic inflammation and neoplastic transformation, and preserving liver function and nutritional state. T-CR was able to maintain cirrhosis and HCC entrainment. The data

support the notion that both the CR and circadian entrainment involved in T-CR could be important in the protective mechanism. The T-CR protocol could be considered a potential factor in strengthening current or future therapeutic approaches to ameliorate the development of cancerous processes.

Supplementary Material

Supplementary data are available at *Carcinogenesis* online.

Funding

Dirección General Asuntos del Personal Académico / Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN200815). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Christian Molina Aguilar is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and he received fellowship number CVU 409145.

Acknowledgements

We acknowledge the following individuals for their technical support: Fernando López-Barrera, María Lourdes Palma Tirado, Michael C. Jeziorski, Raúl Calderón Aguilera, Sandra Luz Hernández-Ojeda, Martín García Servín, Leonor Casanova, Osiel Ledesma Juárez, María de Lourdes Lara Ayala, Elsa Nydia Hernández Ríos, Erika Lizbeth Solorio García, Alejandra Guillén García, Norma Leticia Pescador Lona, Jorge Vázquez Carpizo and Jessica M. González Norris for technical support.

Conflicts of Interest Statement: None declared.

References

- Torre, L.A. et al. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.*, 65, 87–108.
- Fattovich, G. et al. (2004) Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 127, 35–50.
- Chagoya de Sánchez, V. et al. (2012) Recovery of the cell cycle inhibition in CCl₄-induced cirrhosis by the adenosine derivative IFC-305. *Int. J. Hepatol.*, 2012, 212530.
- Schiffer, E. et al. (2005) Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*, 41, 307–314.
- Matsunaga, N. et al. (2011) Influence of CLOCK on cytotoxicity induced by diethylnitrosamine in mouse primary hepatocytes. *Toxicology*, 280, 144–151.
- Heidelbaugh, J.J. et al. (2006) Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am. Fam. Physician*, 74, 767–776.
- Megdal, S.P. et al. (2005) Night work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. 41, 2023–2032.
- Filipski, E. et al. (2009) Circadian disruption in experimental cancer processes. *Integr. Cancer Ther.*, 8, 298–302.
- Aguilar-Roblero, R. et al. (2010) Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep Biol. Rhythms*, 8, 9–17.
- Lévi, F. et al. (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50, 377–421.
- Kelleher, F.C. et al. (2014) Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett.*, 342, 9–18.
- Savvidis, C. et al. (2012) Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Mol. Med.*, 18, 1249–1260.
- Gu, X. et al. (2012) The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Death Differ.*, 19, 397–405.
- Yang, X. et al. (2009) The circadian clock gene Per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day. *Chronobiol. Int.*, 26, 1323–1339.

15. Jiang,W. et al. (2016) The circadian clock gene Bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway. *Cancer Lett.*, 371, 314–325.
16. Delezie,J. et al. (2011) Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1243, 30–46.
17. Arellanes-Licea, E.D.C. et al. (2014) Daily patterns and adaptation of the ghrelin, growth hormone and insulin-like growth factor-1 system under daytime food synchronisation in rats. *J. Neuroendocrinol.*, 26, 282–295.
18. Portaluppi,F. et al. (2008) Ethical and methodological standards for laboratory and medical biological rhythm research. *Chronobiol. Int.*, 25, 999–1016.
19. Carmona-Alcocer,V. et al. (2012) Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Physiol. Behav.*, 105, 727–733.
20. López Panqueva,R.P. (2015) Hepatocarcinoma: papel de la biopsia hepática, estudios de inmunohistoquímica y otros aspectos importantes. *Rev. Colombiana Gastroenterol.*, 30, 232–242.
21. Colina,F. et al. (2016) Protocolo y guía para el diagnóstico histopatológico de carcinoma hepatocelular Subprotocolo de Anatomía Patológica para un protocolo general hospitalario de hepatocarcinoma carcinoma. *Rev. Española Patol.*, 40, 147–160.
22. Lee, G.L. (1968) Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 1st edn. McGraw-Hill, New York.
23. Squire,R.A. et al. (1975) Report of a workshop on classification of specific hepatocellular. *Cáncer Res.*, 35, 3214–3223.
24. Martínez-Alfaro,M. et al. (2014) Subsurface cistern (SSC) proliferation in Purkinje cells of the rat cerebellum in response to acute and chronic exposure to paint thinner: A light and electron microscopy study. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66, 323–332.
25. Hytioglou, P. et al. (2007) Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 36, 867–887, vii.
26. Nascimento,C. et al. (2007) Analysis of morphological variables and arterialization in the differential diagnosis of hepatic nodules in explanted cirrhotic livers. *Diagn. Pathol.*, 2, 51.
27. Kojiro,M. et al. (2008) Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*, 2, 658–664.
28. Iancu,T.C. et al. (2011) Electron microscopy of liver biopsies. In Takahashi, H., (ed) *Liver biopsy*. InTech, pp. 109–136.
29. McGarin,M.D. et al. (2000) Thomson's Special Veterinary Pathology. 3rd edn. Mosby, Maryland Heights, MO, pp. 81–124.
30. Livak,K.J. et al. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402–408.
31. Aguilar-Delfín,I. et al. (1996) Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CC14 administration. *Hepatology*, 24, 657–662.
32. Teresa,M. et al. (1997) Ryanodine Receptor Binding Constants in Skeletal Muscle, Heart, Brain and Liver of the Mexican Volcano Mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*; Rodentia: Cricetidae). Comparison with Five other Rodent Species. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 529–539.
33. Luna-Moreno,D. et al. (2009) Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiol. Int.*, 26, 1409–1429.
34. Challet,E. (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J. Comp. Physiol. B.*, 180, 631–644.
35. Rivera-Zavala,J.B. et al. (2011) Changes in the 24h rhythmicity of liver PPARs and peroxisomal markers when feeding is restricted to two daytime hours. *PPAR Res.*, 2011, 261584.
36. Pérez-Mendoza,M. et al. (2014) Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: adaptations in biochemical and endocrine regulators. *Chronobiol. Int.*, 31, 815–828.
37. Díaz-Muñoz,M. et al. (2000) Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279, R2048–R2056.
38. Báez-Ruiz,A. et al. (2005) Metabolic adaptations of liver mitochondria during restricted feeding schedules. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289, G1015–G1023.
39. Molina-aguilar,C. et al. (2012) Restricted food access during the daytime modifies the 24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver. *Biol. Rhythm Res.*, 43, 25–37.
40. Goldani,H.A. et al. (2007) The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 58, 331–337.
41. Isobe,Y. et al. (2008) Diethylnitrosamine-induced hepatic lesions are greater in rats maintained under a light-dark cycle than under constant light, related to the locomotor activity rhythm. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 9, 619–624.
42. Trepanowski,J.F. et al. (2011) Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr. J.*, 10, 107.
43. Bellet,M.M. et al. (2010) Mammalian circadian clock and metabolism - the epigenetic link. *J. Cell Sci.*, 123(Pt 22), 3837–3848.
44. Sahar,S. et al. (2009) Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat. Rev. Cancer*, 9, 886–896.
45. Wu,M.W. et al. (2004) Effects of meal timing on tumor progression in mice. *Life Sci.*, 75, 1181–1193.
46. Innominato,P.F. et al. (2010) Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62, 979–1001.
47. Lévi,F. et al. (2008) Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, 366, 3575–3598.