



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Papel de la Regulación Post-Transcripcional de las
Metionina Adenosiltransferasas (MATs) en un Modelo
Secuencial de Cirrosis-Cáncer Hepatocelular**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B María Guadalupe Lozano Rosas

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Instituto de Fisiología Celular**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Luis A. Vaca Domínguez
Dr. Emilio Rojas del Castillo**

**Instituto de Fisiología Celular
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

MÉXICO, D. F. Febrero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 305 sur del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Dirección de la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas con el financiamiento por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

Ahora al dar un paso nuevo y firme en este maravilloso camino quiero agradecer antes que nada a la vida, a Dios, y a mis Padres y Hermano por estas bendiciones.

Familia Lozano Rosas gracias por su apoyo siempre incondicional, por la comprensión y la motivación en cada momento de flaqueza y desesperación, por los abrazos, besos y risas en cada instante de dicha, por su sustento y su paciencia, pero sobre todo por creer en mí y respaldar cada decisión por más drástica que hubiera sido. Una vida entera sería poco para agradecerles TODO lo que han hecho y siguen haciendo por mí. Los AMO.

A ti, Héctor Hugo Vargas Calderón, por ser esa mano, ese corazón...ese hombre que me motiva, que me enseña, que me ayuda de forma incondicional, que me mimas...que me ama de una forma infinitamente. Gracias por traerme de vuelta al camino que deseo seguir tomada de tu mano. Gracias por tu colaboración siempre activa en este trabajo. Esto es solo el comienzo de nuestra historia juntos, Te Amo.

A mi Deysi, por ser mi compañera fiel durante más de 5000 días, por estar en noches de desvelo y por siempre haberme recibido con alegría y amor sincero. Gracias por haber llegado y cambiado mi vida, ahora sé que estas con nosotros en alma y espíritu. Y sobre todo gracias por dejarme a tus hijas como un recuerdo y extensión tuya.

Dra. Victoria Chagoya, gracias a usted por creer en mis ideas y aceptarme en su maravilloso grupo. A ustedes chicos; Enrique, Marisol, Jisus, Gabi, Mariana, Rebe, Jessie, Adrián, Nuria, el señor Jesús, y por supuesto a ti Lidia donde quiera que estés, por todos los momentos compartidos de trabajo duro y de diversión juntos, por amenizar de una u otra forma nuestra estancia en el Laboratorio 305-SUR y por seguir formando un excelente grupo.

A mi alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, por seguirme ofreciendo y apoyando, por haberme abierto un espacio en sus instalaciones ya durante varios años y ahora la permanencia en el Instituto de Fisiología Celular.

A mi comité tutorial; Dr Emilio Rojas del Castillo y Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez; por siempre ser objetivos y profesionales en todos sus comentarios y sugerencias y por su tiempo invertido en cada sesión. Además de su motivación semestre a semestre.

Al jurado asignado por sus valiosos comentarios y su participación proactiva para mejorar y continuar con este maravilloso proyecto.

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Dr. Julio Pérez Carreón

Dra. Ana María Salazar Martínez

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

También agradezco el apoyo proporcionado por CONACyT y DGAPA-UNAM IN207012 para la elaboración de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por financiar el apoyo al congreso internacional “EACR-23, The European Association for Cancer Research”.

Nuevos horizontes y nuevas metas que descubrir

Ahora y siempre es mi momento para ser feliz

成功と愛

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	8
1. RESUMEN	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUCCIÓN	13
3.1 El hígado	13
3.2 Cirrosis	15
3.3 Cáncer Hepatocelular	17
3.4 Metabolismo de S-adenosilmetionina (SAM)	19
3.5 Efecto de SAM en el crecimiento celular	22
3.6 Metionina Adenosiltransferasa: Genes e Isoenzimas	23
3.7 Regulación y Desregulación de genes MAT	23
3.8 Proteínas de unión a RNA: estructura y función	24
3.8.1 Función de HUR y relación en cáncer	24
3.8.2 Función de AUF1 y relación en cáncer	26
3.9 IFC305, derivado de adenosina.	28
4 ANTECEDENTES DIRECTOS	29
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
6 HIPÓTESIS	31
7 OBJETIVO GENERAL	31
8 OBJETIVOS PARTICULARES	32
9 MÉTODOS	32
9.1. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis y cáncer hepatocelular con DEN ...	32
9.2. Sustancias químicas	33
9.3. Cuantificación del nivel de ADO, SAH y SAM mediante HPLC y determinación del índice de metilación.....	34
9.4 Determinación de la abundancia de algunas proteínas involucradas en el proceso cirrótico y carcinogénico del hígado mediante la técnica de Western blot.....	34
9.5. Fraccionamiento nuclear y citosólico	39
9.6. Inmunohistoquímica de HuR y AUF1 en el hígado.....	40
9.8. Determinación de compuestos ribonucleoproteicos mediante RIP (Inmunoprecipitación de RNA-proteínas)	45

9.9. Análisis estadístico	47
10. RESULTADOS	48
10.1. Efecto del derivado de adenosina, IFC305, en el índice de metilación en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.	48
10.2.1. Efecto en el nivel de la proteína MAT1A, expresada exclusivamente en hígado adulto sano. 53	
10.2.2. Efecto sobre la expresión del gene <i>Mat1a</i>	54
10.2.3. Efecto del IFC305 sobre la abundancia de la proteína MAT2A en hígado con daño hepático.....	55
10. 3 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la activación de la proteína AMPK en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.	58
10.4 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la presencia de la proteína HuR en el compartimento nuclear y citosólico de muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular en Zona No Tumoral y Tumoral.	62
10.4.1 Análisis del nivel de la proteína HuR.....	62
10.4.2 Análisis inmunohistoquímico de la proteína HuR	63
10.5 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la presencia de la proteína AUF1 en el compartimento nuclear y citosólico de muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular en Zona No Tumoral y Tumoral.	66
10.5.1 Análisis del nivel de proteína AUF1.....	66
10.5.2 Análisis inmunohistoquímico de AUF1	67
10.6 Estandarización de las condiciones para realizar la Inmunoprecipitación de Complejos formados por ARN y proteína, en un modelo secuencial cirrosis-CHC inducido con DEN.70	
11. ANÁLISIS DE RESULTADOS	71
12. CONCLUSIONES.....	75
13. PERSPECTIVAS GENERALES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	77
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina monofosfato
APS	Persulfato de amonio
AREs	Elementos ricos en adenina y uracilo
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CHC	Cáncer hepatocelular
DAB	Diaminobencidina
DEN	Dietilnitrosamina
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
elav	Familia de proteínas (<i>Embryonic lethal abnormal vision</i>)
FasL	Ligando de Fas o Apo-1
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GNMT	Glicina- <i>N</i> -metiltransferasa
GSH	Glutati3n
HCl	Ácido clorhídrico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos

HSC	Células estelares hepáticas
HP	Hepatectomía parcial
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRP	Peroxidasa de rábano
HuR	Proteína de unión a ARN de la familia elav, compuesta por HuR, HuB, HuC y HuD
IgG	Inmunoglobulina G
INEGI	Instituto Nacional de Estadísticas Geografía e Informática
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KCl	Cloruro de potasio
MAT	Metionina Adenosiltransferasa
<i>Mat1a</i>	Metionina Adenosiltransferasa 1A
<i>Mat2a</i>	Metionina Adenosiltransferasa 2A
MT	Enzima Metiltransferasa
PKC	Proteína cinasa C
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPs	Proteínas fosfatasas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Q	Abreviatura de una letra para ácido glutámico
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
Ratones KO	Ratones <i>knockout</i>
RIP	Técnica de inmunoprecipitación del ARN
RBP	Proteínas de unión al Ácido ribonucleico

RRMs	Motivos de reconocimiento al ARN
RT	Retrotranscripción
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAHH	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIRT1	Sirtuina 1
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TBS	Amortiguador salino de Tris
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UTR	Regiones no traducidas de los genes
V	Voltio, unidad para el potencial eléctrico
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHD	Virus de la hepatitis D

1. RESUMEN

El 80% de los pacientes que presentan cirrosis evolucionan a Cáncer Hepatocelular (CHC). En un hígado cirrótico se presenta fibrosis que produce una distorsión estructural y la formación de nódulos de regeneración. El CHC presenta un patrón de hipometilación global, el cual correlaciona con niveles bajos de S-adenosilmetionina (SAM), el donador de grupos metilo.

En CHC existe una disminución en la síntesis de SAM, ésta se da a través del metabolismo de metionina con la participación del ATP, mediante las enzimas Metionina Adenosiltransferasa (*Mat1a* y *Mat2a*). En un hígado sano el gen *Mat1a* es el único activo; mientras que en CHC *Mat2a* se activa. Nuestro grupo de trabajo demostró que el IFC305 incrementó la metilación hepática de forma global en un modelo de cirrosis. La participación de proteínas de unión a ARN (RBP), AUF1 y HuR, tienen la capacidad de disminuir o aumentar la traducción de los genes *Mat1a* y *Mat2a*, respectivamente.

Nuestra hipótesis establece que el IFC305 tiene un efecto al prevenir y/o revertir el CHC restableciendo la expresión del gen *Mat1a*, y disminuyendo la de *Mat2a*. En el presente trabajo se analizó el nivel de las proteínas MAT mediante Western blot. El IFC305 indujo un aumento significativo de MAT1A y disminución de MAT2A, además de un incremento en el nivel de SAM determinado por HPLC. La modulación post-transcripcional de *Mat1a* y *Mat2a*, se evaluó midiendo la cantidad de proteína HuR y AUF1, en fracciones citosólicas y nucleares en muestras hepáticas. El IFC305 influyó en su localización hacia el núcleo favoreciendo la traducción del transcrito de *Mat1a*, pero no de *Mat2a*. Estos datos permiten concluir que el IFC305, favorece la presencia de la enzima MAT1A en un modelo *in vivo*. El hepatoprotector redujó la cantidad de enzima MAT2A en CHC a través de una regulación post transcripcional de los genes *Mat1a* y *Mat2a*, lo que sugiere que el aumento en los niveles de SAM podría estar relacionado con un estado de hipermetilación en el genoma.

2. ABSTRACT

The 80% of patients with cirrhosis evolve hepatocellular cancer (HCC). The cirrhotic liver presents fibrosis that produce a structural distortion resulting a nodule formation and regeneration. The CHC has a pattern of global hypomethylation, which correlates with low levels of S-adenosylmethionine (SAM), the methyl donor.

In CHC there is a decrease in the synthesis of SAM, it is through the metabolism of methionine with the participation of ATP by the enzyme S-adenosylmethionine synthetase enzyme (*Mat1a* and *Mat2a*). In a healthy liver the *Mat1a* gene is the only expressed; whereas in CHC *Mat2a* is activated. Our working group demonstrated that IFC305 increased hepatic methylation in a model of cirrhosis. Involving RNA binding proteins (RBP), AUF1 and HuR, have the ability to decrease or increase the translation of the *Mat1a* and *Mat2a* genes, respectively.

Our hypothesis is that the IFC305 has an effect to prevent and / or reverse the CHC by restoring *Mat1a* gene expression and decreasing of *Mat2a*. In this study, the level of MAT proteins was analyzed by Western blot. The IFC305 induced a significant increase of MAT1A and decrease MAT2A, and the level of the SAM was increase determined by HPLC. The post-transcriptional modulation of *Mat1a* and *Mat2a*, was evaluated by measuring the amount of protein HuR and AUF1 in cytosolic and nuclear fractions in liver samples. IFC305 influenced the location to the nucleus promoting transcript translation of *Mat1a* but not *Mat2a*. These data support the conclusion that the IFC305, favors the presence of MAT1A enzyme in an *in vivo* model. The hepatoprotective reduced the amount of enzyme MAT2A in CHC through a post transcriptional regulation of *Mat1a* and *Mat2a* gene, suggesting that the increase in SAM levels could be related to a state of genome hypermethylation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El hígado

El hígado es el segundo órgano más grande del cuerpo humano después de la piel, y es el órgano interno con mayor volumen (1). Representa del 2 al 5 % del peso corporal del adulto (en promedio 1.5 kg) y 5% en el neonato. Su color es pardo rojizo. Está formado por dos lóbulos principales, de los cuales, el derecho es mucho mayor que el izquierdo(2).

El parénquima o tejido hepático comprende células epiteliales de origen endodérmico llamadas *hepatocitos*; mientras que la zona del estroma deriva del mesodermo y consiste en tejido conectivo ordinario (2).

Este órgano se compone de distintos tipos de células (Figura 1), entre las cuales destacan los hepatocitos, células endoteliales y células endoteliales del sinusoides, células estelares (HSC), células de Kupffer, dispuestas en diversas capas estructurales y metabólicas, responsables de más de 5000 diferentes funciones entre las que destacan desintoxicación de endo y xenobióticos de la sangre y metabolismo de carbohidratos (2).

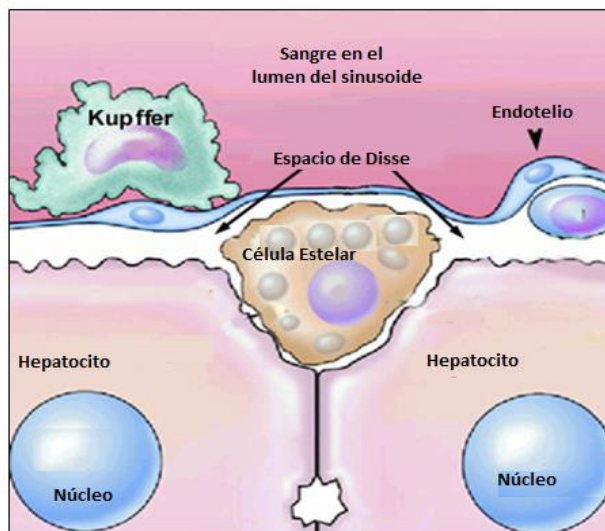


Fig. 1. Representación de las poblaciones celulares hepáticas en el hígado sano (3).

El hepatocito forma diversas columnas o tabernáculos que se ramifican interconectándose a través de sinusoides o capilares. Los sinusoides se constituyen por diversas células endoteliales aplanadas entre ellas células macrofágicas de Kupffer, linfocitos y células perisinusoidales que las separan de la superficie del hepatocito. Los sinusoides llevan a cabo el intercambio de metabolitos entre la sangre y la célula hepática a través del espacio de Disse, que separa la pared endotelial y el polo sinusoidal del

hepatocito (2). El espacio de Disse cuenta con diversas moléculas entre sus componentes figuran fibras de reticulina, nervios, células estelares, colágena tipo I, III, IV, V, VI y VIII, así como fibronectina, laminina, tenacina y proteoglicanos. Estos componentes de la matriz extracelular son esenciales para mantener el fenotipo y funciones específicas de los hepatocitos y de las células que cubren los sinusoides, además de modular, de acuerdo con su fisiología, distintos factores de crecimiento, la diferenciación celular y el almacenamiento de citocinas esenciales en la comunicación intercelular (2).

La unidad funcional del hígado es el acino hepático (Figura 2) (2, 3). Está constituido por pequeños segmentos de dos lobulillos clásicos delimitados y dos venas hepáticas terminales (venas centrales del lobulillo clásico). Su forma es oval o romboidal y se encuentra centrado por un eje terminal portal que contiene ramas de los diferentes componentes del espacio porta (3).

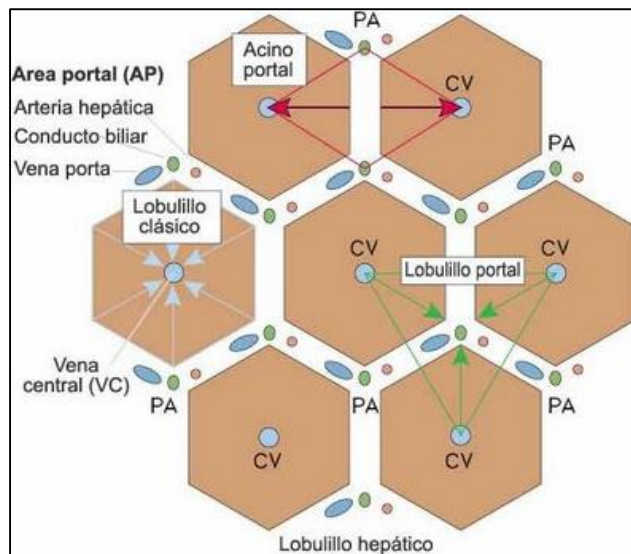


Fig. 2. Representación gráfica de la unidad funcional del hígado. Lobulillo clásico; Lobulillo portal y Acino hepático (3).

A lo largo del acino hepático, los hepatocitos presentan diferencias morfológicas y bioquímicas, que se reflejan de manera directa en su función especializada. El hígado importa una gran cantidad de endobióticos y xenobióticos. Realiza diversas funciones de biotransformación, convirtiendo sustancias hidrofóbicas en productos hidrosolubles que pueden excretarse en la bilis o en la orina. Además dispone de múltiples y complejos sistemas enzimáticos que transforman los xenobióticos en metabolitos, determinando su inactivación o mayor actividad biológica. Asimismo, el hígado es responsable de la síntesis, degradación y almacenamiento de hidratos de carbono y lípidos. Además, secreta la mayor parte de las proteínas del plasma, como por ejemplo la albúmina (2).

El hígado puede presentar una amplia variedad de trastornos, algunos causados por exceso de alcohol o medicamentos, otros por infecciones como la hepatitis vírica, o trastornos metabólicos. La consecuencia del daño crónico al hígado provoca patologías, principalmente, como cirrosis y cáncer hepatocelular (CHC).

3.2 Cirrosis

En 1826, Laennec al describir esta patología la llama por primera vez *cirrosis*, por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se llama *kirrhos*. Los primeros intentos para entender esta patología se remontan hasta 1930 en que Roessle la sugiere como un proceso degenerativo en donde hay cicatrización de una lesión y proliferación del tejido (4).

La cirrosis es un trastorno hepatocelular que puede ser producida por diferentes causas, entre ellas se encuentran: cirrosis alcohólica, cirrosis debida a hepatitis vírica, cirrosis biliar y otras causas menos comunes de cirrosis como cirrosis cardiaca, criptógena o con otras causas (5). En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran las principales causa de cirrosis hepática (6).

Tabla 1
Etiología de la cirrosis hepática
Metabólica-tóxica
*Alcohol *Enfermedad de hígado graso no alcohólico (síndrome metabólico) *Arsénico, metotrexato, isoniazida, amiodarona, α-metildopa, CCl ₄
Infeciosas
*Virus de las hepatitis VHB, VHC, VHD *Eschistosomiasis
Autoinmune
*Hepatitis autoinmune *Cirrosis primaria biliar *Colangitis autoinmune *Síndromes de solapamiento o superposición *Cirrosis infantil de la India
Genético-hereditaria
*Hemocromatosis hereditaria *Enfermedad de Wilson *Déficit de α1-antitripsina *Enfermedades por depósito de glucógeno *Galactosemia *Tirosinemia *Abetalipoproteinemia *Fibrosis quística

Enfermedades biliares
<ul style="list-style-type: none"> *Cirrosis biliar secundaria (obstrucción biliar por estenosis, litiasis de larga evolución) *Colangitis esclerosante primaria *Colangitis asociada IgG4 *Colangiopatía isquémica *Ductopenia *Atresia de vías biliares *Síndrome de Alagille
Vascular
<ul style="list-style-type: none"> *Insuficiencia cardíaca crónica derecha ("cirrosis cardíaca") *Pericarditis constrictiva crónica *Síndrome de Budd-Chiari *Síndrome de obstrucción sinusoidal (enfermedad venooclusiva) *Telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad Rendu-Osler-Weber)

Tabla 1. Causas de la cirrosis hepática (6).

Independientemente de la etiología de la cirrosis, ésta se caracteriza por presentar fibrosis difusa con nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura lobular y vascular del tejido hepático (4,7), esto da por resultado una disminución de la masa hepatocelular y por tanto en su función, así como alteraciones en el flujo sanguíneo (5).

La fibrosis hepática es una exacerbación de un proceso de lesión-cicatrización en el hígado que está definido por un exceso de síntesis y deposición de componentes de matriz extracelular (ECM) (Figura 3), entre los que predomina la colágena tipo I (8).

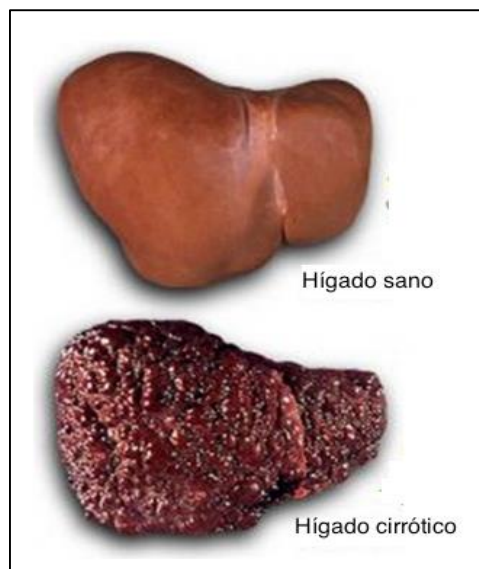


Fig. 3. Representación gráfica del hígado cirrótico (8).

La acumulación de ECM en el espacio subendotelial de Disse puede interrumpir la microcirculación hepática acentuando el daño y la muerte de células parenquimales (8, 9). La estimulación de la fibrosis ocurre cuando se activan las células estelares hepáticas lo cual lleva a la formación de mayores cantidades de colágena y otros componentes de la matriz extracelular (Figura 4) (10).

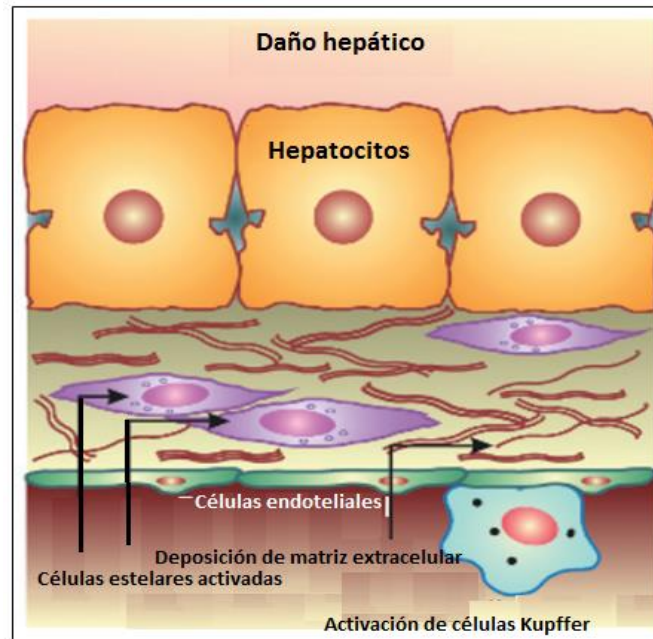


Fig. 4. Representación gráfica del hígado cirrótico a nivel del contexto celular hepático.

Las manifestaciones clínicas de la cirrosis son resultado de cambios patológicos y reflejan la gravedad de la hepatopatía. Los pacientes con cirrosis tienen grados variables de compensación de la función hepática y es necesario distinguir entre los que presentan una cirrosis estable y compensada y los que tienen una cirrosis descompensada. Los enfermos que han desarrollado complicaciones de su hepatopatía y que se han descompensado deben ser considerados para un trasplante hepático (5). Las personas con cirrosis tienen un riesgo aumentado de CHC, ya que un 80% de los casos de las personas que padecen cáncer de hígado ya tienen cierta evidencia de cirrosis.

3.3 Cáncer Hepatocelular

El carcinoma hepatocelular es la forma más común de cáncer de hígado en adultos. A veces también se le llama hepatoma. Alrededor del 90% de las neoplasias originadas en el hígado son de este tipo (Figura 5) (10, 11).

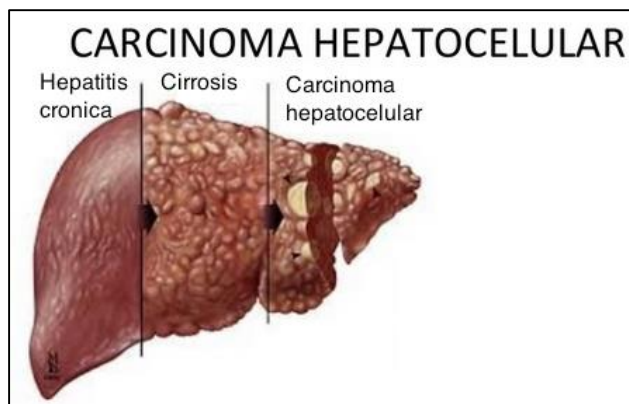


Fig. 5. Representación gráfica del daño progresivo en hígado (10).

Este tipo de neoplasia ocupa el segundo tipo de cáncer más común en el mundo ya que más de 700,000 personas son diagnosticadas con este padecimiento cada año, afectando principalmente a habitantes de África subsahariana, el sureste de Asia y el sur oriente de Europa (10,11). Dada la heterogeneidad etiológica del CHC, junto con la existencia de posibles interrelaciones en la carcinogénesis, la complejidad de las funciones de los hepatocitos y la fase en la que normalmente se detecta la enfermedad hacen difícil el estudio de los eventos moleculares implicados en el desarrollo de este tumor.

El CHC aparece a partir de uno o la combinación de varios factores etiológicos que conducen al aumento del recambio celular hepático, la inflamación y el daño al ADN.

El resultado final puede ser la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor, acompañado de inestabilidad genómica, sobreexpresión de factores de crecimiento y pro angiogénicos, junto con la activación de la telomerasa (38). Durante el proceso de hepatocarcinogénesis, múltiples alteraciones genéticas van a conferir ventajas a las células tumorales, favoreciendo tanto la proliferación como la supervivencia. Así, durante el estado pre-neoplásico, existe una sobreexpresión de las vías mitogénicas celulares que conducen a la selección de ciertos clones de células displásicas. Estos clones, organizados como nódulos displásicos y rodeados por un septo fibroso de tejido conjuntivo, pueden evolucionar a un fenotipo maligno (39). Por lo tanto, resulta difícil diagnosticar el cáncer de hígado en sus etapas iniciales, ya que las señales y los síntomas a menudo no aparecen sino hasta que la enfermedad se encuentra en sus etapas más avanzadas. Los tumores pequeños del hígado son difíciles de detectar mediante un examen físico porque las costillas derechas cubren la mayor parte del hígado. Para cuando un tumor puede ser palpado, puede que ya sea bastante grande (39,40).

Algunos de los síntomas más comunes de pacientes con cáncer de hígado son (12):

- Pérdida de peso, pérdida de apetito, sensación de llenura tras comer poco, náusea o vómito, un agrandamiento del hígado (se siente como una masa debajo de las costillas del lado derecho), un agrandamiento del bazo (se siente como una masa debajo de las costillas del lado izquierdo), dolor en el abdomen o cerca del omóplato derecho, hinchazón o acumulación de líquido en el abdomen, picazón, coloración amarillenta de la piel y los ojos (ictericia).

Algunos otros síntomas que pueden ocurrir incluyen fiebre, venas agrandadas en el abdomen que se pueden observar a través de la piel y sangrado o moretones anormales (12).

Al comparar patrones de expresión génica entre CHC y tejido hepático sano, utilizando microarreglos de DEN (40-42) se ha encontrado un incremento de la expresión de genes relacionados con la proliferación y división celular, junto con la expresión de algunos genes específicos de hepatocitos diferenciados (40-46). Entre los genes desregulados se encuentran los genes Metionina Adenosiltransferasa (MAT), genes que catalizan la síntesis de S-adenosilmetionina (AdoMet o SAM) (13,14).

3.4 Metabolismo de S-adenosilmetionina (SAM)

El descubrimiento de la SAM ocurrió hace cerca de 60 años y evidencia reciente la colocan con un papel principal en procesos como crecimiento y muerte celular; puesto que es el principal donador fisiológico de grupos metilo (13, 14, 16). Aunque SAM es sintetizado en todas las células de mamíferos, el hígado puede ser considerado como el principal productor de SAM, puesto que es aquí donde aproximadamente el 85% de las reacciones de transmetilación y el 50% del metabolismo de metionina tienen lugar (Figura 6) (13, 15).

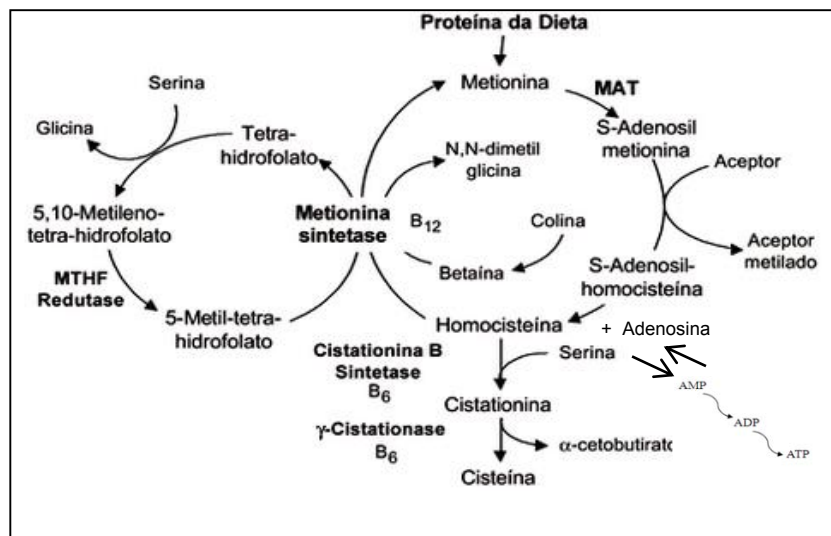


Fig. 6. Metabolismo de Metionina y del ciclo del ácido fólico (Modificado 19).

Metionina Adenosiltransferasa (MAT; EC 2.5.6.1) es la única enzima responsable de llevar a cabo la biosíntesis de SAM a partir de ATP y L- metionina, un aminoácido esencial, haciéndola indispensable para la sobrevivencia de un organismo (Figura 7) (13-18).

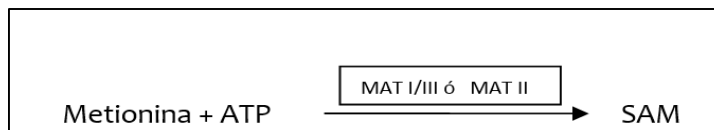


Fig.7. Reacción catalizada por MAT

En mamíferos todas las células y tejidos expresan MAT, pero la mayor actividad enzimática ocurre en el hígado (13). De los genes que codifican MAT, *Mat1a* y sus productos génicos MAT I/III son principalmente expresados en el hígado adulto, mientras que *Mat2a* y el producto de este gen (MAT II) son expresados en todos los tejidos extra-hepáticos, aunque son predominantes en hígado fetal y son progresivamente reemplazados por *Mat1a* durante el desarrollo (13-15). En el hígado, la expresión de *Mat1a* es principalmente en hepatocitos y está asociada con un fenotipo diferenciado, mientras que la expresión de *Mat2a* está asociada con un rápido crecimiento y proceso de des-diferenciación (13, 14, 18, 19).

SAM es la unión para tres vías metabólicas clave: síntesis de poliaminas, transmetilación y trans-sulfuración. En condiciones normales, SAM (menos del 10%) puede ser descarboxilado para ser usado como precursor de la síntesis de poliaminas. En reacciones de transmetilación, SAM dona su grupo metilo a una gran variedad de moléculas aceptoras, catalizado por la enzima Metiltransferasa (MT) provocando que SAM sea convertido a S-adenosilhomocisteína (SAH) (14, 17,18). Estas enzimas transfieren el grupo metilo proveniente de SAM a átomos de oxígeno, sulfuro, nitrógeno y carbono de más de 500 proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y moléculas pequeñas. La MT dependiente de SAM más abundante en el hígado es la Glicina-*N*-metiltransferasa (GNMT). La importancia clínica de esta enzima se ha observado en pacientes con deficiencia genética de GNMT desarrollan hepatomegalia y daño hepático a edades tempranas (13).

De las reacciones de metilación dependientes de SAM se produce SAH. Esta molécula es un potente inhibidor de las reacciones de transmetilación. La relación de SAM versus SAH (SAM/SAH) es frecuentemente considerada como una medida de control metabólico de las reacciones de metilación *in vivo*, en donde si se presenta una disminución en esta relación se puede predecir una reducida capacidad de metilación en la célula (13,18,19).

El contenido celular de SAH es regulado por la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH), la cual rompe reversiblemente a esta molécula en homocisteína y adenosina. *In vivo*, la reacción procede en la dirección únicamente de la hidrólisis de SAH, en donde los productos son rápidamente removidos para prevenir la acumulación de SAH y por ende una subsecuente inhibición de las reacciones de transmetilación (18-20).

SAHH es una enzima reversible que favorece la biosíntesis de SAH, lo cual conduce a la acumulación de este sustrato. En el hígado, las reacciones de trans-sulfuración unen a SAM con la biosíntesis de cisteína, donde la homocisteína es convertida a cisteína. Este aminoácido es utilizado para la biosíntesis de Glutación (GSH) por lo que la vía de trans-sulfuración es particularmente activa en el hígado (13). La remetilación de homocisteína para formar metionina ocurre por dos enzimas: metionina sintetasa (MS) la cual requiere niveles normales de folato y de vitamina B₁₂ y de betaina metiltransferasa (BHMT), la cual requiere a su vez betaina, un metabolito de colina.

Por su parte, MS cataliza la remetilación de homocisteína con requerimientos de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), la cual es un derivado de 5,10-metilentetrahydrofolato (5,10-MTHF) en una reacción catalizada por la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR). 5-MTHF es convertida a tetrahydrofolato (THF) donando su grupo metilo y el THF por su parte es convertido a 5,10-MTHF para completar el ciclo del folato (13, 14).

Los niveles bajos de folatos plasmáticos interfieren con la síntesis y reparación del ADN, produciendo hipometilación de ADN, la cual se ha involucrado como *hallmark* en procesos neoplásicos, ya que se ha asociado con la activación de oncogenes y con la pérdida de supresores de tumores. Los portadores homocigotos del polimorfismo 5,10-MTHFR 677 C-T presentan 30% de actividad enzimática con respecto al polimorfismo nativo mientras que los heterocigotos para MTHFR C677T presentan 65% de la actividad. Los portadores homocigotos del polimorfismo MTHFR TT han sido asociados con patologías como cáncer de mama, colorectal, displasia cérvico-uterina, hígado y adenocarcinoma gástrico proximal (55).

Por otra parte SAM, esta críticamente involucrada en la síntesis de poliaminas; moléculas de bajo peso molecular como la Espermidina (SPD) y Espermina (SPM), cargadas positivamente que son ubicuas en todas las células (13, 21). La biosíntesis de poliaminas juega un papel crucial en muchos procesos bioquímicos, incluyendo crecimiento celular y apoptosis. Para poder entrar a esta vía, SAM sufre una descarboxilación, catalizada por la enzima SAM descarboxilasa, en donde se lleva a cabo la formación de SPD y SPM como poliaminas predominantes, catalizadas por Espermidina sintetasa (SPD sintetasa) y Espermina sintetasa (SPM sintetasa) respectivamente (13, 14). Recientes hallazgos, en células como

en modelos animales deficientes en las vías biosintéticas de SAM, indican que el flujo metabólico a través de las vías de transmetilación y poliaminas, conducen a cambios críticos en los niveles de varios metabolitos, lo cual puede ser determinante en el desarrollo de tumores (13, 14, 22).

3.5 Efecto de SAM en el crecimiento celular

En hepatocitos, SAM está relacionado a un estado de diferenciación en donde células quiescentes presentan altos niveles de S-adenosilmetionina, mientras que hepatocitos proliferantes cuentan con niveles depletados de este sustrato. Esto es ilustrado por el modelo de ratones KO para *Mat1a*, los cuales exhiben deficiencias de SAM hepático acompañado de una proliferación basal además de hiperplasia hepática, regeneración anormal del hígado después de una hepatectomía parcial (HP), desarrollo espontáneo de esteatohepatitis y CHC. Correlacionado a lo que sucede en los pacientes con cirrosis, en los cuales se observa frecuentemente una hipermetioninemia, provocando una reducción en la síntesis hepática de SAM, además de una mayor predisposición al desarrollo de CHC (15, 16, 22).

La alteración en la regeneración hepática también se observa en el modelo de ratones KO para Glicina N-metiltransferasa (*GNMT*), donde el nivel de SAM es elevado (23). Mientras que, en un tratamiento crónico de etanol a ratas, se demostró un incremento relativo de la expresión de MAT2A, lo cual influyó en una disminución de SAM hasta en un 43%, correlacionado con una disminución del 50-60% de la actividad de MAT específica de hígado, MAT1A, mientras que el nivel de SAH no se veían alterado significativamente (15, 22).

S-adenosilmetionina tiene la habilidad de inhibir la actividad mitogénica del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); principal mitógeno de hepatocitos, el cual es esencial para la regeneración hepática; y de leptina. Ambos factores de crecimiento activan transcripcionalmente a *Mat2a* e inducen la síntesis de DNA en los hepatocitos (13). Sin embargo, SAM previene la inducción de *Mat2a* e inhibe la actividad mitogénica de HGF.

La SAM, un regulador clave del metabolismo y síntesis de GSH (principal antioxidante celular soluble), puede también controlar el metabolismo de lípidos hepáticos y el metabolismo de glucosa a través de la regulación de la actividad de AMPK (proteína cinasa activada por AMP) (17). AMPK es activado en respuesta a diversos tipos de estrés (privación de glucosa, hipoxia, isquemia, choque térmico, entre otros) que depletan las reservas de energía (18, 24). Así entonces, el HGF induce la fosforilación de AMPK en hepatocitos, mientras que SAM inhibe la activación de esta cinasa a través de un mecanismo que involucra la activación de PPs (proteínas fosfatasa), probablemente PP2A (15, 17, 24, 25). Sugiriendo fuertemente que el arresto del ciclo celular en hepatocitos es forzada por altas

concentraciones de SAM a través de un mecanismo que involucra la desfosforilación e inactivación de AMPK (17).

En el caso de los hepatocitos, SAM puede ejercer un efecto inhibitorio para mitógenos (24). Cuando los niveles de SAM están muy bajos, las señales de crecimiento como el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) pueden progresar (18, 25). En hepatocitos primarios, la SAM bloquea el HGF, incluyendo la sobrerregulación de ciclina D1 y A2 obtenida después del estímulo mitogénico (24, 25, 26).

3.6 Metionina Adenosiltransferasa: Genes e Isoenzimas

Existen dos genes expresados en células de mamíferos, *Mat1a* y *Mat2a*, los cuales codifican para dos subunidades catalíticas homólogas, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (13, 18, 21). *Mat1a* es mayormente expresado en hígado adulto normal, y la subunidad $\alpha 1$ se encuentra dispuesta en dos isoenzimas de MAT, MAT III (dímero) y MAT I (tetramero). *Mat2a* es ampliamente distribuida, y este gen codifica para una subunidad catalítica $\alpha 2$ (13, 18). Las células de mamíferos también expresan un tercer gen, *Mat2b*, el cual codifica para la subunidad β que regula la actividad de MAT II (13). *Mat2b* es expresado en muchos pero no en todos los tejidos por ejemplo próstata, pulmón, tiroides, glándulas adrenales, hígado fetal, cerebro, músculo esquelético, corazón y riñón.

Las isoenzimas de las MAT difieren en sus propiedades cinéticas y regulatorias, MAT III tiene una muy alta constante de afinidad por su sustrato, metionina, que va desde 215 μM a 7 mM, siguiendo en orden de aparición MAT I (23 μM a 1 mM), y finalmente MAT II (4–10 μM) (13-15). SAM inhibe muy fuertemente a MAT II (IC₅₀ de 60 μM), mientras la inhibición hacia MAT I es mínima (IC₅₀ de 400 μM) presentándose una estimulación por parte de SAM hacia MAT III.

Tanto MAT III y MAT I son predominantemente activas bajo condiciones fisiológicas con lo cual se asumen cantidades equivalentes de ambas isoenzimas presentes en las células. Pero, dadas las diferencias en las propiedades cinéticas y regulatorias, el tipo de isoenzima de MAT expresada en tiempo y tejido específico influye en los niveles de SAM disponibles para la célula (13, 16-18).

3.7 Regulación y Desregulación de genes MAT

El hígado fetal expresa *Mat2a* y *Mat2b* pero no *Mat1a* (18, 23-24, 27). La expresión de *Mat1a* incrementa pocos días después del nacimiento y progresivamente va aumentando en el desarrollo hasta el hígado adulto, expresando principalmente *Mat1a*, y muy poco *Mat2a* o *Mat2b* (13, 18).

3.8 Proteínas de unión a RNA: estructura y función

La expresión del gen *Mat1a* en hígado se encuentra bajo regulada en CHC en relación a un hígado sano (16), durante la desdiferenciación (14, 25, 28) en muchos pacientes cirróticos y en pacientes con hepatitis alcohólica (17). Los mecanismos de bajo regulación del gen *Mat1a* podrían ocurrir tanto a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional, post-traduccional e inclusive regulación a nivel epigenético donde los cambios heredables en la expresión de los genes son independientes a cambios en la secuencia del ADN (51).

En el caso de una regulación a nivel post-transcripcional, puede ocurrir a nivel del pre-ARNm, a nivel del splicing y maduración del transcrito, o bien a nivel del transporte, edición, almacenamiento, estabilidad y traducción del ARNm blanco (29).

Entre estos pasos, el control citoplásmico del recambio y la traducción del ARNm son particularmente efectivas al realizar rápidos cambios adaptativos en cuanto a la expresión de las proteínas en respuesta a múltiples estímulos internos y externos (29).

La regulación post-transcripcional requiere de factores *trans* representados por ARNs no codificantes; especialmente microARNs; y proteínas de unión a ARN (RBP) que se asocian con factores *cis* específicos presentes en el ARNm blanco para llevar a cabo su regulación (18, 20).

Los elementos ricos en adenina y uracilo (AREs) son un tipo de elementos que actúan en *cis* mediante los cuales el control de la estabilidad y traducción de diversos mRNAs inducibles se lleva a cabo. La capacidad regulatoria de las RBPs se ha estimado que afecta aproximadamente a un 16% de los genes humanos codificantes para alguna proteína y que contienen en su extremo 3'-UTR, alguna secuencia ARE (30). Las RBPs usualmente pueden encontrarse en varios compartimientos celulares dependiendo de los estímulos y las modificaciones post-transcripcionales a las que están sujetas los transcritos maduros que la célula requiere, por ejemplo, fosforilación y metilación (18, 16).

3.8.1 Función de HUR y relación en cáncer

HuR una proteína de unión al ARN ubicuamente expresada; pertenece a la pequeña familia de las proteínas *elav* (del inglés *embryonic lethal abnormal vision*) esta familia está compuesta por HuR, HuB, HuC y HuD (13). Aunque HuR se localiza principalmente en el núcleo (más del 90% de la proteína existente en la célula) y el reconocimiento de sus transcritos blanco ocurre en este compartimiento

celular, HuR puede ser translocada al citosol bajo diversos estímulos como proliferación, estrés, apoptosis, diferenciación y estabilizar y/o aumentar la traducción de sus ARNm blanco (15–21).

El transporte de HuR a través de la envoltura nuclear requiere de un dominio específico de HuR (HNS) y varias proteínas de transporte, incluyendo transportinas 1 y 2, importina 1 α (46-49), sin embargo, el transporte de HuR también es influenciado por diversas cinasas entre ellas Cdk1, proteína cinasa activada por AMP (AMPK), proteína cinasa C (PKC) las cuales pueden fosforilar a HuR y a las proteínas transportadoras. (29, 30).

HuR, se une a elementos ricos en AU (AREs) que comúnmente se encuentran localizados en la región no traducida 3' (3'-UTR) de los transcritos maduros blanco para promover su estabilización. Esta unión se da a través de sus tres motivos de reconocimiento de ARN (RRMs) a través de los cuales se unen con gran afinidad y especificidad a su ARNm blanco.

Tanto la fosforilación como metilación de HuR en diferentes residuos dentro de los RRRMs afectan la unión de HuR a su ARNm blanco, mientras que la modificación de los residuos dentro o muy cerca al dominio HNS puede alterar la localización subcelular de HuR (Figure 8) (29).

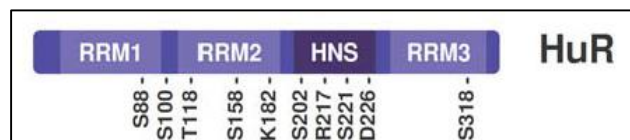


Fig. 8. Representación gráfica de la proteína de unión al ARN, HuR, en la cual se muestran los residuos modificables (29).

Las proteínas HuR estabilizan una gama amplia de ARNm, incluyendo algunos los cuales codifican para proteínas implicadas en diferentes patologías, particularmente cáncer e inflamación. En años recientes, el HuR citoplásmico ha sido catalogado como un regulador clave de una gran variedad de respuestas celulares a través de sus efectos en diversos ARNm. HuR ha mostrado efecto en ARNm templados para proteínas como c-Fos, el inhibidor de cinasas dependiente de ciclina p21, ciclinas como A2, B1, E1 y D1, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), sirtuina 1 (SIRT1), factor de necrosis tumoral (TNF α), ligando Fas (FasL), entre otros blancos (6, 24, 29).

Sin embargo, HuR puede llevar a cabo una autorregulación, al unirse al ARNm *HuR*; por lo que al unirse a la región 3'UTR de su propio ARN mensajero también se incrementa la exportación citoplasmica de ARNm *HuR* (29, 35). Además HuR también se une selectivamente a la región 3'UTR del ARNm de

Mat2α estabilizando al transcrito de este gen, aumentando así los niveles del ARNm, prolongando el tiempo de vida media y/o su traducción (17, 22, 24-27). Sin embargo, HuR es susceptible a metilación por parte de SAM, lo cual provoca que HuR-metilado al unirse de forma selectiva al ARNm de *Mat2α* desestabilice este transcrito y cause una inhibición de la traducción de esta molécula (27).

Antagonizando el papel de HuR, existen otras varias RBPs como por ejemplo AUF1 (Factor 1 de unión a RNA rico en sitios AU) que promueven el decaimiento del mRNA al que se unen (18, 20, 31).

3.8.2 Función de AUF1 y relación en cáncer

AUF1 comprende una familia de proteínas formada por cuatro isoformas derivadas de un precursor común de ARNm, obteniendo p37, p40, p42 y p45, basadas cada una en su peso molecular, resultado del splicing alternativo del exón 2 y 7 (31, 32).

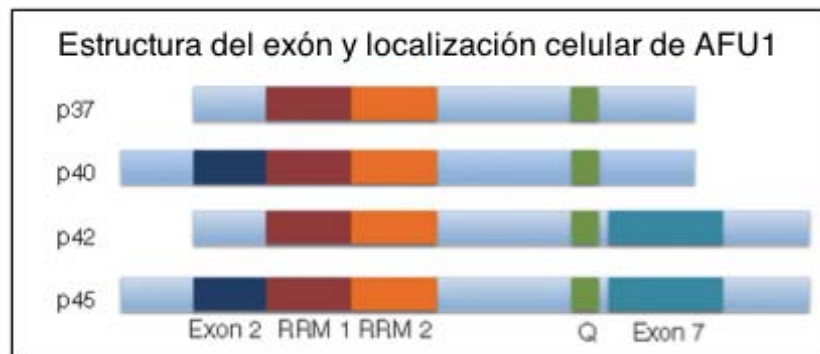


Fig. 9. Representación gráfica de las diferentes isoformas, en base a su peso molecular, de la proteína de unión al ARN, AUF1 (32).

Las cuatro isoformas contiene proteínas conservadas, incluyendo los motivos de reconocimiento a ARN (RRMs), y un motivo de ocho acidos glutámico (Q) localizado cerca del carboxilo terminal. Sin embargo, a p37 se le ha propuesto como la isoforma con mayor afinidad, en el rango de nanomolar, a las secuencias AREs presentes en sus ARNm blanco. Los elementos AREs muy frecuentemente están compuestos de copias de la secuencia pentamérica AUUUA que puede ser organizado en varias clases dependiendo el número de motivos repetidos o si estos motivos están contiguos uno con el otro o no (31, 32). Sin embargo, proteínas como AUF1 no presentan actividad enzimática y solamente actúan reclutando la maquinaria de degradación o inhibiendo su traducción (30).

En el caso del ARNm de *Mat1 α* , este transcrito también sufre una desestabilización por parte de AUF1, el cual se asocia a la región 3'UTR, provocando una disminución en la traducción de este gen, reflejando daños importantes en la biosíntesis de SAM (13,25- 28).

En la Tabla 2, se mencionan algunas otras características de proteínas de unión a ARN como HuR y AUF1.

Tabla 2. Características del recambio metabólico y la regulación traduccional de las proteínas de unión al RNA			
	Proteína de unión al ARN	Tamaño, kDa	Principal función
HuR	Antígeno R Humano	36	Splicing de ARN: mejora de la estabilidad del ARN y la traducción: represión traduccional en la unión con el 5'-UTR : interacción con los miARN y ARN largo no codificante y regulación génica
AUF-1	Proteína 1 de unión a ARN en elementos ricos en AU	Cuatro isoformas: 37, 40, 42 y 45	Decaimiento de la promoción en el ARN: activación de la telomerasa y transcripción del ARN de la telomerasa: estabilización de ARNm en algunos casos; regulación de la traducción

Tabla 2.Regulación traduccional de las proteínas de unión a ARN (RBPs) (Modificada 27,28)

La expresión de AUF1 es alta en el hígado fetal y disminuye durante el desarrollo lo cual coincide con el incremento en la expresión de *Mat1a* (25). Pero, en CHC los niveles de la proteína AUF1 también se ve incrementada. Mientras que el gen *Mat1a* es considerado un marcador del hígado normal diferenciado, *Mat2a* es un marcador de rápido crecimiento hepático y desdiferenciación y es transcripcionalmente inducido en el CHC (13, 19, 26). De forma semejante a *Mat1a*, *Mat2a* involucra regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional en la sobreexpresión del gen en CHC (21, 26).

HuR y HuR-metilado regulan la expresión de *Mat2a* a nivel post-transcripcional (24, 30). Mientras HuR es ubicuamente expresado como una proteína de unión a ARN que estabiliza su ARNm blanco; HUR-metilado ejecuta la desestabilización del ARNm de *Mat2a*. Durante la des-diferenciación de los hepatocitos en el CHC, el nivel de HUR-metilado disminuye mientras que el nivel de HuR incrementa; resultando en un aumento incremento del nivel de ARNm de *Mat2a*. La situación opuesta ocurre durante el desarrollo fetal, resultando en una baja expresión de *Mat2a* (24). De forma similar a *Mat2a*, *Mat2b* es también expresado de forma mínima en el hígado adulto normal y sobre expresada en cirrosis y CHC (15, 22).

3.9 IFC305, derivado de adenosina.

Debido a que la cirrosis es una causa común de mortalidad a nivel mundial y ésta es inducida por un daño crónico hepático de diferentes tipos como se menciona en la Tabla 1. En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el efecto hepatoprotector de la adenosina y de un derivado de ésta, el IFC305, en el desarrollo y en la reversión de hepatopatías como cirrosis y CHC.

La adenosina es un nucleósido de purina, el cual está presente dentro y fuera de las células y que actúa como mensajero químico. Éste es principalmente formado de *novο* por la síntesis de purinas que se lleva a cabo principalmente en el hígado (56), por fosfohidrolisis de nucleótidos de adenina vía endo y ecto de 5' nucleotidasas o por hidrolisis de SAH en la vía de metilación (57). La adenosina extracelular puede ser interiorizado a través de la activación de sus receptores (A1, A2a, A2b y A3) o transportadores.

Este nucleósido puede ejecutar diversas acciones metabólicas a nivel de tejido específico como son incrementar la carga energética del hepatocito, inhibir la oxidación de los ácidos grasos, modular el estado redox de la célula a través del mantenimiento de la estructura y función de la mitocondria. En un estado cirrótico preestablecido, la adenosina incrementa la degradación de la colágena, previene su y preserva el estado energético y funcional del hígado (55-60).

Efectos como la prevención de la acumulación y el incremento en la síntesis de DNA, entre otros han sido reproducidos con el IFC305, favoreciendo la reparación del ADN dañado por la inestabilidad cromosómica establecida en cirrosis y CHC (36). Además de poder evidenciar que este derivado de adenosina también participa activamente en la recuperación de los niveles de SAM, aumentando la disposición del principal donador de grupos metilo en la célula y favoreciendo la reversión del contexto de hipometilación general en estas hepatopatías (datos no publicados).

4 ANTECEDENTES DIRECTOS

El 80% de los casos diagnosticados con CHC manifiestan una etapa cirrótica previa independientemente de la etiología que la originó. La evolución del CHC es larga, aproximadamente de 15 a 20 años, siendo las etapas iniciales asintomáticas por lo que el diagnóstico es difícil. Sin embargo, a pesar de los avances científicos en el entendimiento sobre las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, no existe un tratamiento curativo para estos padecimientos que afectan a millones de personas a nivel mundial. En este momento, todas las estrategias terapéuticas existentes únicamente retrasan la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis y a la no evolución a hepatocarcinoma. Sin embargo, el único tratamiento efectivo por el momento es el trasplante ortotópico de hígado con el cual se logra una supervivencia de los pacientes de hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, no todos los pacientes son candidatos a trasplante, el procedimiento tiene un costo alto, la obtención de donadores es difícil y el tratamiento con inmunosupresores necesarios después de la cirugía también es caro, además de que existe la posibilidad de reincidencia de infección y de fibrosis en el hígado trasplantado (7).

Por lo que una alternativa terapéutica muy promisoriosa para el tratamiento de la cirrosis desarrollado en el equipo de investigación de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez es el uso de un nuevo fármaco derivado de la adenosina, denominado IFC-305 (Patente UNAM 207422).

Sin embargo, algunos de los efectos farmacológicos de la adenosina en la hepatotoxicidad aguda inducida por agentes hepatotóxicos; por ejemplo mantenimiento del equilibrio redox entre citosol y mitocondria (33), prevención de la necrosis inducida por CCl_4 (34) y recuperación del estado energético basal, disminuido por los tóxicos (35); fueron claves para poder vislumbrar al IFC-305 como una alternativa efectiva. Además de haber obtenido resultados (20) desde los años 90, donde el flujo metabólico de SAM y adenosina podría estar influyendo positivamente en las reacciones de metilación a diversos fosfolípidos.

El efecto del IFC-305 se ha probado en un modelo de hepatotoxicidad crónica como la cirrosis, la cual se induce experimentalmente por el tratamiento con CCl_4 en ratas. Estos estudios en el modelo de prevención de cirrosis con la administración simultánea del tóxico y del derivado de adenosina, mostraron una disminución de la fibrosis inducida por el tóxico al inhibir en un 50% la acumulación de colágena en el tejido hepático, como resultado de un aumento en la actividad colagenolítica del hígado, observándose una normalización del metabolismo de colágena e induciendo un aumento en la

proliferación hepática del hígado cirrótico (4). Estos efectos se acompañaron de una mejoría en el estado energético de la célula, además de estabilizar el estado redox de la célula (36).

Por lo que a medida que avanza el conocimiento de los mecanismos que desencadenan cirrosis y su evolución a Hepatocarcinoma, se mantiene latente el interés de muy diversos grupos de investigación por revertir la cirrosis y poder prevenir el cáncer de hígado (7).

Derivado de ello y sabiendo ya que la adenosina es un modulador metabólico y que la mayor parte de las células poseen receptores de adenosina de cuatro tipos A1, A2a, A2b y A3; y además dicha molécula puede penetrar a la célula por transporte facilitado (7); el compuesto derivado de adenosina se somete a estudios preclínicos detectando un efecto anti carcinogénico en un modelo llamado del hepatocito resistente (36).

Sin embargo, debido a la necesidad de establecer el efecto en un modelo secuencial cáncer–cirrosis inducido con Dietilnitrosamina (DEN) se comprobó el efecto dual del fármaco como anti cirrótico y anti carcinogénico, ya que éste proceso secuencial ocurre en hasta un 80% de los pacientes que desarrollan cirrosis y llegan al CHC (datos no publicados).

Al estudiar el transcriptoma por medio de microarreglos de muestras de hígados de ratas a las que se les indujo cirrosis con CCl₄ se observaron 414 diferentes genes desregulados, mientras que al administrar el hepatoprotector IFC305 a ratas cirróticas la expresión de 243 de tienden a normalizarse. Por lo que de acuerdo a los genes implicados se consideró la hipótesis de un mecanismo que está favoreciendo la reparación del ADN dañado por la inestabilidad cromosómica característica de la cirrosis y CHC. Esta posibilidad se comprobó al recuperar por el tratamiento la capacidad proliferativa del hígado (36).

De entre los genes bajo y sobre regulados se observan los genes de *Mat1a* y *Mat2a*, respectivamente, aunado a datos que reportaban el grupo de Mato et al 2012, entre otros grupos donde se vislumbraba a estos genes como claves en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis y el efecto en la biodisponibilidad de SAM, que como se mencionó en la introducción de este escrito, es principal donador de grupos metilo; que a su vez está relacionado al presentarse una hipometilación en células tumorales.

Es por esto que se midió por qPCR los mensajeros de ambos genes, encontrándose una disminución importante de *Mat1a* y un aumento considerable de *Mat2a* en CHC, efectos que se revirtieron con el tratamiento con IFC305 (datos no publicados), con lo cual ahora se encuentra interesado en determinar si las acciones farmacológicas del compuesto IFC305 involucran a nivel molecular una recuperación de la expresión de estos genes mediante posibles modificaciones post-transcripcionales.

Y así entonces, debido al aumento de las enfermedades hepáticas en nuestro país según el Instituto Nacional de Estadísticas Geografía e informática (INEGI) y a la inexistente cura para estas patologías es indispensable poder elucidar uno de los posibles mecanismos moleculares que provocan la cirrosis y el hepatocarcinoma, que pueden ser normalizados mediante la administración de este derivado de adenosina, IFC305.

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el grupo de trabajo se ha desarrollado un fármaco para el tratamiento de la cirrosis y posible prevención del cáncer hepatocelular, el cual se ha denominado IFC-305 (Patente UNAM 207422), cuyas evidencias experimentales demuestran la normalización de la función hepática. Con el interés por entender el mecanismo de acción de éste nuevo compuesto, se ha planteado la evaluación molecular, a nivel post-transcripcional con la participación de RBPs, de los cambios que ocurren en dos genes de gran importancia en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis, *Mat1a* y *Mat2a*, durante el proceso cirrótico así como en una etapa de cáncer y el efecto que tiene dicho fármaco a este nivel durante la reversión de la cirrosis y prevención del cáncer.

6 HIPÓTESIS

En el modelo secuencial cirrosis-cáncer inducido con DEN existe intercambio (switch) en la regulación de los genes *Mat1a* y *Mat2a*. Considerando esto proponemos que la reversión de la cirrosis y prevención del cáncer hepatocelular por la administración del hepatoprotector IFC305 esta mediada por la normalización de la expresión de los genes *Mat1a* y *Mat2a* a través de modificaciones post-transcripcionales donde intervienen las proteínas de unión a ARN específicas como HuR y AUF1.

7 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el mecanismo de acción del hepatoprotector IFC305 involucra la regulación post-transcripcional en la expresión de *Mat1a:Mat2a* bajo el modelo secuencial de reversión de cirrosis y prevención de CHC.

8 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el balance de los metabolitos asociados a la metilación; los niveles de Adenosina, SAM y SAH en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC en ratas mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).
2. Evaluar la presencia de las proteínas MAT1A y MAT2A en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC en ratas mediante Western blots.
3. Evaluar la abundancia de la proteína AMPK fosforilada y AMPK total en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC en ratas mediante western blots.
4. Corroborar el nivel de expresión de los ARN mensajeros de *Mat1a* y *Mat2a* en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC en ratas mediante qPCR.
5. Determinar la localización sub-celular hepática de HuR y AUF1 en muestras de los diversos grupos experimentales del modelo de cirrosis-CHC.
6. Estandarizar la técnica de inmunoprecipitación del ARN (RIP), en un modelo secuencial *in vivo* cirrosis-cáncer hepatocelular.

9 MÉTODOS

9.1. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis y cáncer hepatocelular con DEN

Modelo secuencial cirrosis-CHC.

Se indujo cirrosis y cáncer a ratas Wistar macho de 200-210 g a través del tratamiento crónico con DEN vía intraperitoneal (IP) (47). Se les administró a los animales una solución de DEN a una dosis de 50 mg/kg de peso, una vez por semana durante 12 o 16 semanas. Los animales tratados se dividieron en siete grupos (Figura 10) para evaluar el efecto del IFC305 administrado durante tres veces a la semana.

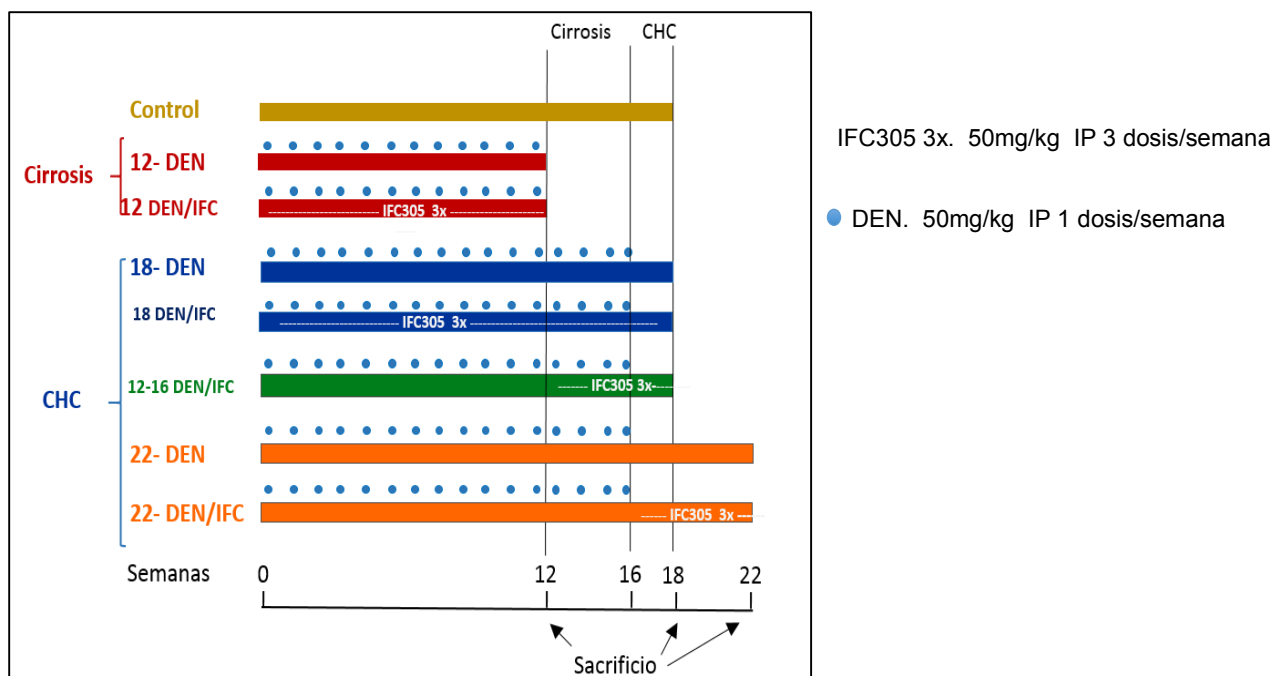


Fig. 10. Representación gráfica del modelo secuencial cirrosis-CHC. La cirrosis es inducida a las 12 semanas después de la administración de DEN, el cáncer hepatocelular se presenta a la semana 16 de ser administrado el DEN. Por otra parte, el IFC305 se administra tres veces a la semana, mientras que la dietilnitrosamina una vez a la semana.

En cada grupo los animales fueron sacrificados 24 horas después haber terminado el tratamiento respectivo, mediante la administración de pentobarbital sódico y exanguinación. Recuperando el hígado, fraccionarlo y congelarlo en nitrógeno líquido y preservarlo a -70°C hasta su utilización. Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las guías institucionales de uso y manejo de animales de laboratorio.

9.2. Sustancias químicas

La dietilnitrosamina (DEN) es convertida por las enzimas hepáticas a una forma electrofílica, alquilando y dañando el ADN provocando aductos y por consiguiente, causando inestabilidad genómica y la muerte de las células y la regeneración del tejido hepático, que posteriormente conduce a la formación del carcinoma hepatocelular. La DEN utilizada fue de la compañía Sigma Aldrich (1001503816). El IFC305, se preparó en el laboratorio de acuerdo a la patente UNAM 207422 y se obtuvo como un sólido blanco con las siguientes propiedades: masa molar de 400.34 g/mol , punto de fusión de 285°C , soluble en agua.

9.3. Cuantificación del nivel de ADO, SAH y SAM mediante HPLC y determinación del índice de metilación.

Objetivo: Cuantificar el nivel de ADO, SAH y SAM en los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

A partir de tejido hepático congelado, de cada grupo experimental, se tomaron 300mg y se homogenizaron en 2 volúmenes de 0.4M HClO₄ frío. Los homogenados obtenidos se centrifugaron.

Antes de ser inyectado al equipo, el homogenado resultante se filtró por membranas de 0.2um TITAN HPLC. Y se determinaron los tiempos de retención, áreas y alturas de cada molécula de interés.

Los estándares para cada molécula fueron preparados a las siguientes concentraciones: Adenosina y SAH 1:100 y SAM 1:10.

La estandarización de las condiciones cromatográficas se realizó de acuerdo a Tsuge et al 1994 (54), se utilizó una columna ACE 5 C18, obteniendo los siguientes tiempos de retención para cada molécula: Adenosina 6.1-6.5 min, SAH 15.7- 16.1 min y para SAM 19.0-19.4 min. Mientras que las áreas promedio de cada pico de interés fueron 8.98 para ADO, 8.53 y 14.04 para SAM.

Una vez estandarizado el método de cuantificación, se procedió a inyectar 50uL de cada muestra por duplicado o triplicado dependiendo la disponibilidad de la muestra.

Cada vez que se procedió a realizar una determinación se realizaron las corridas de los estándares.

El índice de metilación que puede ser referido como el cociente de SAM/SAH corresponde a los datos obtenidos para cada muestra individual del nivel de SAM entre el valor obtenido para SAH.

9.4 Determinación de la abundancia de algunas proteínas involucradas en el proceso cirrótico y carcinogénico del hígado mediante la técnica de Western blot

Objetivo: Identificar el nivel de abundancia de proteínas MAT1A, MAT2A, AMPKp, GADPH y AMPK total que participan en el proceso hepatocarcinogénico en los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

- **Obtención de proteínas totales**

Se prepararon, de forma manual en homogenizadores de vidrio y vástagos de teflón, los homogenados con 100 mg de tejido de los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer inducida con DEN (Figura 10), utilizando 1 mL de Buffer RIPA 1x con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Una vez desintegrado el tejido, se transfirió a tubos Eppendorf® de 1.5 mL, nuevos y estériles, y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó a 14000 rpm y 4°C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf® y se sometió nuevamente al proceso de centrifugación y se recuperó el sobrenadante en un tercer Eppendorf®. Estas muestras se almacenaron a -70°C en alícuotas de 100 uL.

- **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, uno de los métodos colorimétricos es el método de Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante, *Coomassie Blue G-250*, a las proteínas. El colorante en solución ácida, existe en dos formas químicas, una azul y otra naranja, las proteínas mediante los residuos de lisina se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible en un rango de 1-1.5 µg, además de ser un método simple, rápido, barato, y pocas sustancias interfieren en la determinación, entre las que se encuentran detergentes y soluciones básicas (48).

Se siguió el protocolo del ensayo estándar en placa de ELISA proporcionado por el fabricante del reactivo *Quick Start Bradford 1x Dye Reagent* (BioRad® 500-0205), para lo cual se pesaron 2 mg de albúmina sérica bovina Fracción V (USB Corporation 10857) y se llevaron a 1 mL con PBS 1x con inhibidores de proteasas y se procedió a preparar las siguientes concentraciones de la curva estándar de proteína de la siguiente manera:

No. Tubo	Volumen del Estándar [µL]	Fuente del estándar	Volumen de diluyente** (µL)	[Proteína] (µL/mL)
1	20	Stock 2mg/mL	0	2000
2	30	Stock 2mg/mL	10	1500
3	20	Stock 2mg/mL	20	1000
4	20	Tubo 2	20	750
5	20	Tubo 3	20	500
6	20	Tubo 5	20	250
7	20	Tubo 6	20	125
8 (Blanco*)	-	-	20	0

*El Blanco utilizado fue agua MilliQ® estéril. **El diluyente fue PBS 1x con inhibidores de proteasas NOTA: El fabricante refiere que la linealidad de esta curva se encuentra entre las concentraciones 125-1000 µg/mL

Tabla 3. Curva de proteína para el ensayo estándar en microplaca [BioRad® 500-0205].

Se colocaron 5 µL de cada estándar y muestra problema en pozos independientes de la microplaca. Se agregó 250 µL de 1x *Dye Reagent* (BioRad® 500-0205) a cada pozo.

Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se registró la absorbancia de la curva y las muestras a una longitud de onda de 595 nm.

- **Western Blot**

La determinación de las proteínas se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot utilizando el sistema de Laemmli publicado en 1970 (49).

Tras la obtención de los homogenados hepáticos totales y la posterior determinación de la concentración de proteínas, se tomaron 30 µg de proteína de cada muestra para su análisis, así como 4 µL de marcador de peso molecular *Dual color* (BioRad 161-0374EDU).

En todos los casos se usó una relación de 1:1 del Buffer de carga (2x) (sacarosa 0.27 M, SDS 0.27 M, β-mercaptoetanol 2.8 M, azul de bromofenol 1.4 mM y Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8). Las muestras se incubaron durante 15 min a 65°C.

- a) Electroforesis

A continuación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en tampón de electroforesis. Dicha electroforesis se realizó en un gel discontinuo con dos zonas diferenciadas: *Running* (10X, Tris-HCl 30.3 g, glicina 144.2 g, SDS 10g a pH 8.8 para preparar 1L) (en la zona inferior) y *Stacking* (10X, Tris-HCl 30 g, SDS 2g a pH 6.8 para preparar 0.5L) (en la zona superior).

En la zona de *Stacking* se concentra la muestra mediante isotacoforésis, mientras que en la zona de *Running* se produce la separación de los diversos componentes proteicos de cada muestra. Para la realización del gel *Running* (12% para 20mL) se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- * 8 ml de mezcla acrilamida/bis acrilamida al 30%
- * 6.8 ml de H₂O milliQ o desionizada.
- * 200 µL de persulfato amónico (APS) al 10%.
- * 8 µL de TEMED.

Tras la preparación de esta parte del gel, la mezcla se introdujo entre los cristales con objeto de que la acrilamida polimerice. A continuación se procedió a realizar la mezcla de la parte concentradora (*Stacking*) (12% para 5mL).

Para ello se preparó la siguiente mezcla reactiva:

- * 0.83 mL de mezcla acrilamida/bis acrilamida al 30%.
- * 2.9 mL de H₂O milliQ.
- * 50 µL de APS al 10%.
- * 5 µL de TEMED.

Una vez preparada la mezcla se introdujo entre los cristales, encima de la parte separadora (*Running*) del gel, y a continuación el peine para que se formen los pozos en los cuales se cargara la muestra.

La electroforesis se realizó con amortiguador de corrida 1X a 100 V durante aproximadamente 1 h 20 min.

b) Transferencia

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con objeto de fijarlas a este soporte favoreciendo su exposición a los anticuerpos.

Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibró con agua desionizada, metanol y posteriormente en el Buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0.2 M, y metanol 20%).

La transferencia se realizó a 100 V durante 60 minutos, mediante la denominada transferencia húmeda. A continuación, la membrana, donde se hallaban fijadas las proteínas transferidas, se incubó durante una hora en solución de bloqueo conteniendo 5% leche en polvo desnatada en TBS Tween 1x a temperatura ambiente.

c) Incubación con anticuerpo primario y secundario

Posteriormente, se incubó la membrana durante una noche con anticuerpos específicos, según la proteína objeto de análisis, disueltos en leche preparada al 0.5% en TBS-Tween 1X.

Transcurrido ese tiempo se lavó durante 10 minutos con TBS-Tween 1x. A continuación, se incubó durante 120 minutos con un anticuerpo secundario, anti-inmunoglobulina de conejo o de ratón, unido a peroxidasa de rábano (HRP).

Transcurrido el tiempo indicado se volvió a lavar 3 veces durante 5 minutos y 3 veces más durante 10 minutos con TBS-Tween 1X. La tabla 4 describe los anticuerpos primarios utilizados, así como las condiciones de incubación:

Anticuerpo	Marca	Condiciones de incubación
MATIA (F-6)	Santa Cruz Biotechnology sc-13142 (hecho en conejo)	1:1000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
MATIIA (H-48)	Santa Cruz Biotechnology sc-99170 (hecho en conejo)	1:1000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche

pAMPKalfa (T172)	Cell Signalling 2535S (hecho en conejo)	1:1000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
AMPK total	Cell Signalling (hecho en conejo)	1:10000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
HuR (H-280)	Santa Cruz Biotechnology sc-20694 (hecho en conejo)	1:500 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
AUF1	Abcam ab61193 (hecho en conejo)	1:500 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
Histona H4 total	Millipore (hecho en ratón)	1:2000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación toda la noche
GAPDH	Millipore MAB374 (hecho en ratón)	1:2000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación toda la noche

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión de proteínas por Western blot.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron a lavados con TBS-Tween 1X para eliminar el anticuerpo que no se unió a su antígeno blanco. En seguida se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes como lo describe la tabla 5.

Anticuerpo	Marca	Condiciones de incubación
Anti-conejo IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación 2h
Anti-ratón IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:10000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación 2h

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación de la expresión de proteínas por Western blot.

a) Revelado

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial *West Femto* (Thermo Scientific 34095), exponiendo la membrana durante 5 minutos a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introdujo en una cassette radiográfica junto con una película de alta sensibilidad (Kodak 190 0943, 190 1875 y 604 0331) durante tiempos variables de entre 1-5 minutos. Tras el revelado y secado de la película se llevó a cabo la cuantificación de las bandas por densitometría utilizando para ello el programa Scion Image 4.02

Para remover los anticuerpos y volver a explorar la membrana (con otros anticuerpos o determinar un control de carga) se lavó la membrana a 65° C en agitación durante 10 min con amortiguador de *stripping* y posteriormente se lavó durante 10min con TBS-Tween 1X y 3 lavados posteriores durante 5min.

A continuación se bloquearon durante 1 hora en leche al 5% disuelta en TBS-Tween 1X para posteriormente cuantificar la abundancia de las proteínas que sirven como control de carga; *GADPH* y AMPK total.

9.5. Fraccionamiento nuclear y citosólico

Objetivo: Identificar la abundancia de las proteínas HuR y AUF1 en distintos compartimientos celulares en los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

A partir de tejido congelado se tomó aproximadamente 300 mg de tejido, se homogenizó con 10-15 golpes en un homogenizador tipo Potter a 1700 rev/min; en 2 volúmenes de Buffer 1 (Sacarosa 0.25 M en TKM {Tris-Cl 0.05M pH 7.5 20°C, KCl 0.05M, MgCl₂ 0.005M}) complementado con Inhibidores de proteasas y fosfatasas.

El homogenado total fue filtrado en una membrana de 0.2 nm. A la solución resultante se agregó 1.5 ml de Buffer 2 (Sacarosa 2.3M en TKM) complementado con Inhibidores de proteasas y fosfatasas y se mezcló ligeramente por inversión.

Posteriormente se colocó 1.5 mL de Buffer 2 en TKM al tubo respectivo del rotor (SW40Ti), y se colocó en seguida de forma muy cuidadosa la mezcla del homogenado resultante. Para poder calibrar cada tubo fue necesario agregar TKM sin inhibidores hasta alcanzar un peso constante en cada tubo. Se centrifugó a 39,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se retiró cuidadosamente el TKM de la parte superior y desechó. Los extractos de proteína citosólica fueron retirados cuidadosamente (Fracción de color

rojizo). Una vez obtenido el pellet nuclear, se agregaron 300 μL de TKM más Inhibidores y se homogenizó suavemente hasta disgregar. Cuando la solución de proteínas nucleares fue totalmente homogenizada, se colocó en un micro tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 min. Se agregaron 40 μL de Buffer Hipotónico, se mezcló suavemente y se añadieron 40 μL de Buffer Hipertónico, pero de 10 en 10 μL hasta completar el volumen requerido. Se incubó durante 20 min a 4°C en agitación constante.

Finalmente se agregaron 20 μL de Solución C, y se centrifugó a 15,000 durante 20 min. El sobrenadante resultante contiene las proteínas nucleares.

Las proteínas obtenidas se preparan como se describe en el apartado anterior y se observan bajo una electroforesis SDS-PAGE como se describe anteriormente, tomando en cuenta el fraccionamiento en proteínas nucleares y citosólicas.

9.6. Inmunohistoquímica de HuR y AUF1 en el hígado.

Objetivo: Identificar presencia de proteínas HuR y AUF1 en zonas nucleares o citoplásmicas en muestras de los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

Se colocaron las muestras en el horno a 60°C durante 45 min y posteriormente se siguió con el siguiente tren de hidratación:

Xilol absoluto, posteriormente etanol absoluto, seguido de etanol al 95%, a continuación etanol al 70%, posteriormente etanol al 50%, y finalmente agua desionizada.

Se realizó el precalentamiento del Buffer de Citratos (recién preparado) durante 1 min, se colocaron las laminillas deshidratadas y desparafinadas en el Buffer de Citratos precalentado, todo encima de un recipiente plástico y se calentó todo por 10 min en el horno de microondas. Transcurrido este periodo de tiempo se enfrió durante 30 min a temperatura ambiente.

Se enjuagó en agua desionizada 2 veces durante 2 min cada uno y se colocaron las laminillas a tratar en TBS nuevo. Con la finalidad de delimitar el área de cada corte, se rodeó el tejido a tratar con PAD Pen, cuidando de no permitir que el tejido pueda secarse.

Se enjuagó con TBST nuevo, se retiró el excedente y se incubó 20 min a temperatura ambiente con Peroxidase Block (el cual es parte del Kit). Posterior a la incubación, se lavó con TBST nuevo, se retiró el excedente y se incubó por 20 min a temperatura ambiente con Protein Block (Obtener del Kit).

Posterior a este bloqueo no se debe lavar, solo se colocó el anticuerpo primario y se incubó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Se preparó el anticuerpo primario (HuR 1:50; AUF1 1:75) diluyéndolo en Antibody Diluent (Obtener del Kit). Se incluyó al menos un control sin anticuerpo. Se lavó 3 veces durante 5 min cada uno con TBST nuevo. Se retiró el excedente de TBST y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con Anticuerpo Secundario (IgG de Conejo o Ratón dependiendo de cada anticuerpo primario). Se lavó 3 veces durante 5 min cada uno con TBST nuevo. Se retiró el excedente y se reveló cada laminilla colocando 40uL por corte de DAB (Diaminobencidina), se tomó el tiempo de reacción; tiempo en que aparece una coloración café al mismo tiempo que el blanco debe permanecer blanco. Se preparó el DAB del kit considerando 40 µL por corte. Se mezcló 1 mL de Buffered Substrate con 20 µL de Liquid DAB. El tiempo de revelado fue el mismo para cada muestra. Se colocaron las lamillas en agua para detener la reacción de revelado.

Se realizó contra tinción con Hematoxilina-Eosina de Harris, por máximo 1 minuto. Se viró la coloración de las laminillas en agua tibia o preferentemente en NaOH 37mM. Posteriormente las laminillas se deshidrataron pasando por el siguiente tren:

Agua desionizada, en seguida etanol al 50%, posteriormente etanol al 70%, continuando con etanol al 95% y finalizando con xilol absoluto.

Una vez deshidratadas las muestras, se realizó el montaje de las muestras con Entellan bajo la campana de flujo laminar para su posterior observación.

9.7. Análisis de la expresión génica por retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Esta técnica se basa en la cuantificación del ADN complementario (ADNc) obtenido mediante retrotranscripción (RT) a partir del ARN mensajero (ARNm) en las muestras de objeto de estudio.

En el caso de la PCR cuantitativa (qPCR), se utilizan sondas específicas para la secuencia a amplificar que van a estar unidas a fluoróforos siendo posible la monitorización continua de la fluorescencia y por ello la cuantificación del nivel de expresión del gene de interés.

1) Aislamiento del ARN mediante el uso de columna.

A partir de 500 mg de tejido congelado se agregaron 500 uL de Tripure (ROCHE) para poder homogenizar el tejido de forma manual. El reactivo Tripure utiliza fenol y tiocianato de guanidina para inhibir rápidamente la actividad de las ARNasas, además la adición de cloroformo permite la separación

mediante centrifugación del ARN, ADN y las proteínas en tres fases acuosa, interfase y fase orgánica respectivamente.

Una vez realizada la homogenización del tejido, se centrifugó a 13,000 RPM a 4°C durante 1 minuto para poder remover las partículas de tejido de mayor tamaño. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5 mL. Se agregaron 500 µL de etanol absoluto (relación 1:1 respecto a la cantidad de Tripure utilizada), se mezcló vigorosamente durante 10 segundos.

La suspensión obtenida se transfirió a una columna para realizar el aislamiento del ARN (Direct-trizol RNA mini Prep R205S, Zymo Research, The Epigenetics Company). Posteriormente, se centrifugó a 13,000 RPM a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se desechó la solución obtenida y se transfirió la columna a otro tubo colector.

Se trató la muestra con DNAsa, agregando 80 µL volumen final de una solución que contiene (DNasa 5U, 10 X Buffer 8 µL, Agua libre de DNasa y RNasa 3 µL, RNA Wash Buffer 64 µL). Las muestras fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó 13,000 RPM a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se desechó la solución filtrada por la columna y se agregaron 400 µL de RNA Pre Wash y se centrifugó durante 1 minuto a 13,000 RPM a temperatura ambiente, se desechó el filtrado, y se repitió este paso 1 vez más.

Finalizados estos lavados, se agregaron 700 µL de RNA Wash y se centrifugó a 13,000 RPM a temperatura ambiente por 1 minuto. Los residuos fueron descartados y se procedió a centrifugar a 13,000 RPM a temperatura ambiente por 2 minutos.

El ARN extraído se disolvió en agua libre de RNAsa y DNAsa (proveniente del Kit) (se prefiere partir a partir de 20 µL) y se centrifugó 1 min a temperatura ambiente a 14,000 RPM.

2) Aislamiento de ARN mediante el uso de Tripure

A partir de 300 mg de tejido hepático congelado se agregó 1mL de reactivo Tripure y se homogenizó totalmente. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, permitiendo la disrupción de los complejos de nucleoproteínas, se añadieron a cada tubo 200µL de cloroformo. La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y después se agitó vigorosamente con un vórtex durante 30 segundos y posteriormente se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 15 minutos.

Al término de la centrifugación la fase acuosa se recolectó, fase superior, en un tubo. A esta fracción, se añadieron 500 µL de isopropanol y se agitó 15 segundos e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó el pellet y se lavó con 1mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 10000 RPM a 4°C durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet se colocó bajo la campana de flujo laminar durante 30-40 minutos.

El pellet obtenido se solubilizó en agua libre de RNAsas y DNAsas y permaneció a -70°C hasta el momento de su uso.

3) Cuantificación de la concentración de ARN

Para la cuantificación del ARN total se colocaron 2 µL de muestra en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), y se realizó la lectura.

La pureza del ARN se comprobó a través de la relación de Densidad Óptica (DO) a A260/280 y A260/230, debiendo encontrarse dicho valor entre 1.8-2.0.

4) Retrotranscripción

Este paso consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc), a partir de ARN, el proceso inverso de la transcripción. Para ello son necesarias ADN polimerasas específicas, llamadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Las enzimas utilizadas proceden de algunos retrovirus, que son virus que presentan ARN como biomolécula en su genoma, en lugar de ADN. Para la síntesis de ADNc se utilizó el sistema High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies). Para ello se utilizaron 2 µg de ARN de cada muestra. Para proceder a la RT, por muestra se preparó la siguiente mezcla:

*2 µL de Tampón RT 10X

*0.8 µL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP)

*2 µL de cebadores al azar 10X

*1 µL de Retrotranscriptasa Multiscribe (50U/ µL)

*4.2 µL de agua grado inyectable.

A continuación se incubaron las muestras a 25°C durante 15 minutos, y posteriormente se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta el momento de usarse.

5) Amplificación del ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (RT-qPCR).

Una vez sintetizado el ADNc, se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un método que permite amplificar de forma selectiva secuencias específicas de ADN.

El método de PCR está basado en la síntesis de una hebra complementaria de ADN, utilizando una hebra simple como molde. La PCR utiliza dos fragmentos cortos de ADN (oligonucleótidos) como iniciadores de la síntesis. Estos iniciadores o cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, uno en cada uno de las cadenas de ADN. En este caso se utilizó el sistema TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies) donde además de los cebadores se utiliza una sonda fluorescente.

Esta sonda, unida a uno de los cebadores, por medio de la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa, se libera al medio, libera fluorescencia y es detectada por el termociclador.

El proceso básico consta de tres pasos que se repiten sucesivas veces, según el gene a amplificar.

Desnaturalización:

Las cadenas de ADN se separan mediante la incubación a una temperatura superior a 70°C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir el anillamiento de los cebadores.

Alineamiento de cebadores:

Los cebadores utilizados son (sentido y antisentido) capaces de unirse a secuencias específicas del ADN de la región que se pretende amplificar. La temperatura óptima para el alineamiento debe ser estimada de forma empírica y viene determinada por la composición de los nucleótidos de los dos cebadores.

Elongación a partir de los cebadores:

El resultado del proceso es la formación de copias de las cadenas de ADN del gen a amplificar. En el presente estudio, se utilizó la metodología de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) para la estimación de la concentración de ARN mensajero, ya que es posible cuantificar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de PCR. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región blanco del ADN, que viene dado por la expresión de 2^n (siendo n el número de ciclos) hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima, y la reacción deja de ser exponencial (fase Plateau).

Se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 15uL para cada muestra. A continuación se detalla la distribución de los reactivos por muestra individual:

*0.75 µL de Sonda Taqman

*7.5 µL de Master Mix

*3.75 µL de Agua grado Inyectable

*3 µL de ADNc diluido 1:10

Gene	Sonda Taqman
<i>Mat1a</i>	1074102 E5
<i>Mat2a</i>	1151674 H8
<i>GADPH</i>	1273360 E3

Tabla 6. Sondas utilizadas en la RT-PCR

Como control patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH) en cada una de ellas como *housekeeping*. Cada experimento incluyó además un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no fue sometido a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o de producto de PCR que pudiera haber contaminado la muestra previamente.

Los cambios relativos en la expresión génica se determinaron mediante el cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (50).

9.8. Determinación de compuestos ribonucleoproteicos mediante RIP (Inmunoprecipitación de RNA-proteínas)

Objetivo: Identificar la formación de complejos ARN-proteínas; ARNm *Mat1a*-AUF1, ARNm *Mat2a*-HuR en los diferentes estados del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

El tejido congelado (aproximadamente 200mg) fue fraccionado en trozos muy pequeños (lo más pequeños posibles). Los trozos obtenidos se colocaron en un Eppendorf nuevo de 2mL. Se agregó, a cada tubo, 1mL de solución PBS complementado con Inhibidores de Proteasas, Fosfatasas y RNasas.

Se agregaron 13.5 µL de formaldehído al 37% por cada 200mg de tejido (concentración final del Formaldehído 0.5%). Las muestras se agitaron de forma constante durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 75µL de Glicina 2.5M y se incubaron durante 10 minutos con agitación constante a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 5,000 RPM a 4°C, se desechó el sobrenadante usando micropipeta y se lavó con 1mL de PBS adicionado con Inhibidores de Proteasas, Fosfatasas y RNAsas.

Se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 5,000 RPM, se desechó el sobrenadante. Se agregó 1.5mL de Buffer RIP (150mM KCl, 25mM Tris pH 7.4, 5mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5% NP40, adicionado con Inhibidores de RNAsas, Proteasas y Fosfatasas) al pellet y se homogenizó con vástago de teflón a mano, aproximadamente 15-30 golpes y se centrifugó 10 minutos a 4°C a 13,000 RPM. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó proteína, como se describió anteriormente.

Se realizó electroforesis SDS-PAGE para evaluar integridad de proteínas y la cuantificación realizada. Posteriormente se realizó fraccionamiento del homogenado total para evaluar Input, IgG, Anticuerpo(s) a probar y Perlas magnéticas con un equivalente a 800 µg de proteína para cada uno.

La muestra destinada para el INPUT se mantuvo a 4°C hasta su uso. Para las fracciones restantes se agregaron 5µg; HuR, AUF1 e IgG del hospedero, de cada anticuerpo al sobrenadante destinado, y se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante.

Al término, se agregaron 40µL de Perlas Magnéticas de proteína A/G y se incubaron 2 horas a 4°C con agitación constante. Se centrifugó durante 30seg a 2,500 RPM, se removió el sobrenadante y se agregaron 500µL de Buffer RIP complementado con Inhibidores de RNAsas, Proteasas y Fosfatasas. Los lavados se repitieron 2 veces más, hasta un total de 3. Posteriormente se agregaron 500µL de PBS adicionado con Inhibidores de RNAsas, Proteasas y Fosfatasas y se lavó. Se centrifugó 30 seg a 4°C a 2,500 RPM y se desechó el sobrenadante.

Para poder aislar el co-precipitado de RNA-Proteína, se resuspendieron el pellet de perlas magnéticas en 1mL de Tripuro y se realizó la extracción de ARN y Proteína de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En este momento se incorporó el INPUT y se trató como muestra.

El ARN fue eluido con 10µL de agua libre de DNAsa y RNAsas, y se transformó a ADNc y se realizó qPCR dependiendo las necesidades de cada análisis como fue detallado en los apartados previos.

Las proteínas aisladas por las perlas magnéticas pueden ser detectadas mediante un análisis de Western Blot, con previa cuantificación de proteínas (Biorad). Utilizando curva de BSA bajo las siguientes concentraciones: 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/mL. Como se describe anteriormente.



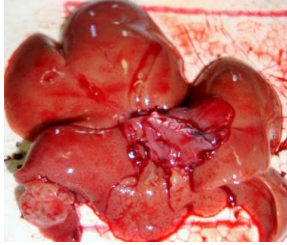
9.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se calculó el valor de la media y el error estándar de la media, utilizando la prueba de *t Student* pareada. Las diferencias significativas fueron consideradas cuando el valor de p estuviera por debajo de 0.05. Para el tratamiento de los datos y su análisis estadístico se utilizó el software comercial Prisma.

10. RESULTADOS

10.1. Efecto del derivado de adenosina, IFC305, en el índice de metilación en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.

Como se mencionó en el apartado previo, el modelo experimental de trabajo para este proyecto consta de un desarrollo secuencial cirrosis-CHC. Las muestras experimentales fueron obtenidas a partir de los grupos con cirrosis y carcinoma hepatocelular desarrollado por la administración de la Dietilnitrosamina (DEN) durante 12 y 16 semanas. Las muestras fueron catalogadas por observación macroscópica entre zonas donde estaba instalado el tumor claramente, como Zona Tumoral; y otras secciones e incluso lóbulos distintos del hígado donde no se observaba los nódulos los cuales fueron considerados como Zona No Tumoral. Mientras que el caso de las muestras cirróticas, no había esta distinción de zonas dañadas. En la Tabla 7 se muestran fotografías representativas de grupos que desarrollaron cirrosis y su tratamiento con el hepatoprotector y también de grupos a los cuales se les indujo CHC y a los que se les administró el IFC305, todo ello para tener un mejor panorama al hablar posteriormente de zona tumoral y no tumoral.

Muestra	Imagen
Control	
12 D (Cirrosis)	
12 D/IFC (Cirrosis + IFC)	

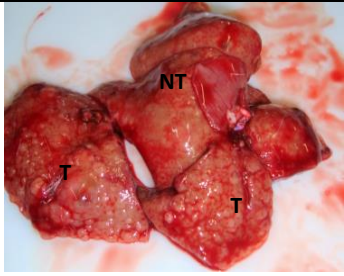

<p>18 D (Cáncer)</p>	
<p>18 D/IFC (Cáncer + IFC)</p>	
<p>(T, Tumor) y (NT, No Tumor)</p>	

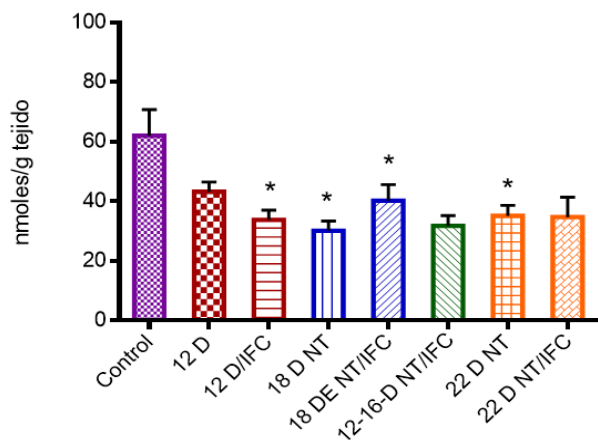
Tabla 7. Imágenes representativas de los grupos de cirrosis y cáncer analizados en el presente trabajo.

El IFC305, es un derivado de adenosina y ácido aspártico, el cual es metabolizado rápidamente por el hígado. Por lo tanto, fue necesario medir el nivel Adenosina en el tejido y evaluar si éste fue afectado por la administración de nuestro compuesto. El nivel de adenosina también fue medido a través de la técnica de HPLC.

A continuación se muestran los niveles de Adenosina, SAM y SAH medidos en zonas no tumorales y zonas tumorales; además de los índices de metilación obtenidos para las diferentes zonas evaluadas.

A. ZONA NO TUMORAL

Adenosina (ADO)



B. ZONA TUMORAL

Adenosina (ADO)

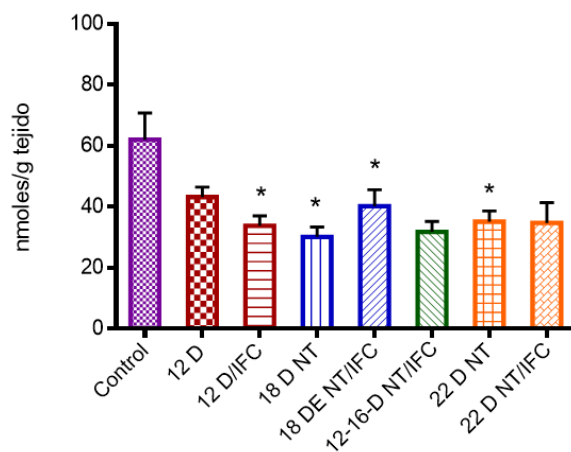


Figura 11. Cuantificación del nivel de Adenosina (ADO) detectado en muestra de hígado de ratas administradas con DEN bajo

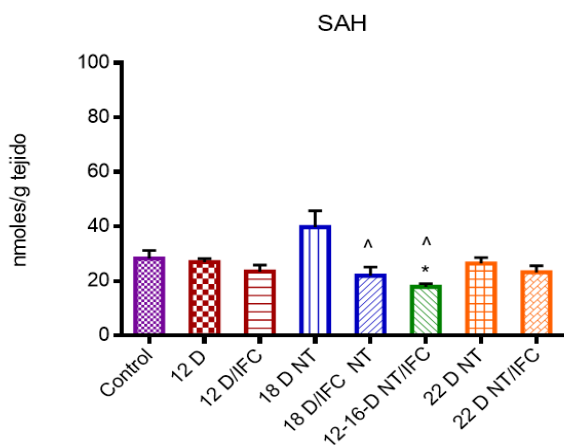
el modelo secuencial cirrosis-CHC. A) Cuantificación de ADO en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT). B) Cuantificación de ADO en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T). Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo (tiempo) experimental que no fue tratado con IFC305.

Para conocer el índice de metilación fue indispensable evaluar el nivel disponible de la S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH), los cuales se determinaron a través de una técnica cromatográfica como lo fue el HPLC.

En el ciclo metabólico de la metionina, sustrato indispensable para la formación de SAM, se lleva a cabo la formación de SAH como resultado de la donación del grupo metilo proveniente de la SAM a diversos sustratos celulares. Sin embargo, SAH es considerada una molécula capaz de poder inhibir las reacciones de metilación, al detener el flujo metabólico para la formación de SAM y acumulación, por ende de SAH.

En la figura 12, se observó que el nivel de SAH aumenta en muestras con carcinoma hepático (18 D NT) respecto a muestras control, lo cual podría detonar una alteración en el flujo metabólico y estancamiento de la vía catabólica de la metionina.

A. ZONA NO TUMORAL



B. ZONA TUMORAL

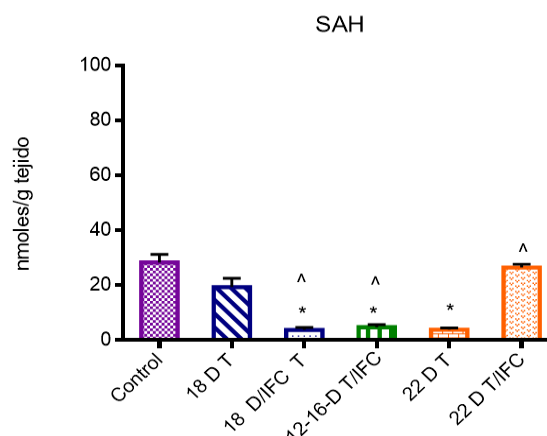


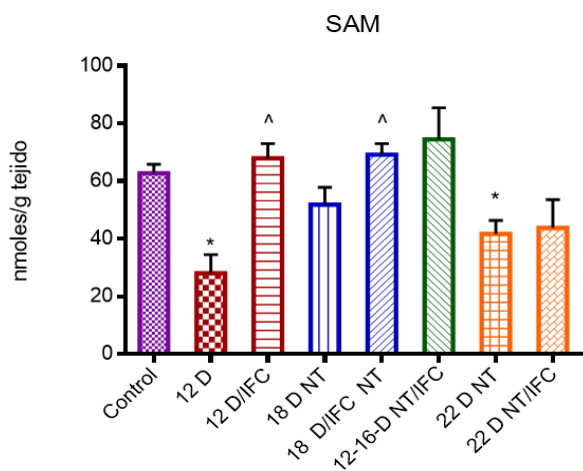
Figura 12. Cuantificación del nivel de S-adenosilhomocisteína (SAH) detectado en muestra de hígado de ratas administradas con DEN bajo el modelo secuencial cirrosis-CHC. A) Cuantificación de SAH en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT). B) Cuantificación de SAH en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T). Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo (tiempo) experimental que no fue tratado con IFC305.

Al analizar grupos con CHC con la administración concomitante de DEN e IFC305, se observó que el nivel de SAH, disminuye considerablemente (18 D/IFC NT y 18 D/IFC T), y esto podría favorecer favoreciendo la transformación de metionina junto con la participación de ATP (Adenosina Trifosfato) a SAM, catalizado únicamente por las Metionina Adenosiltransferasas.

En el caso particular de la determinación del nivel de ADO se observaron en general, bajas concentraciones de este sustrato aún en grupos tratados con IFC305, sin embargo, es importante considerar que el catabolismo de este sustrato es ampliamente distribuido en el tejido y en el organismo completo. Sin embargo, los bajos niveles de adenosina pueden estar favoreciendo un mayor uso de este sustrato para la formación de ATP; lo cual favorecería una mejora en el metabolismo energético a nivel del organismo completo.

A continuación se muestra el nivel de SAM medido por HPLC en zonas no tumorales y zonas tumorales.

A. ZONA NO TUMORAL



B. ZONA TUMORAL

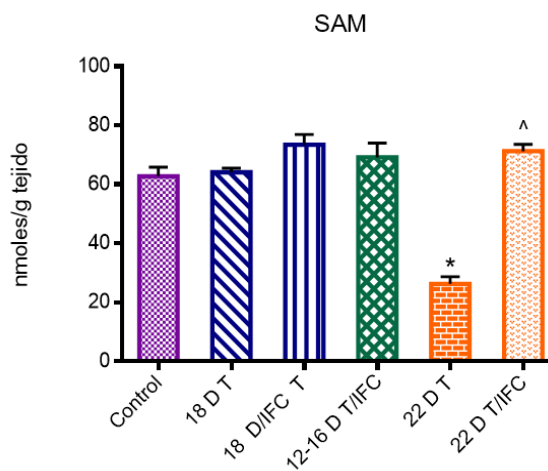


Figura 13. Cuantificación del nivel de S-adenosilmetionina (SAM) detectado en muestra de hígado de ratas administradas con DEN bajo el modelo secuencial cirrosis-CHC. A) Cuantificación de SAM en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT). B) Cuantificación de SAM en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T). Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; [^]P<0.05 contra mismo grupo (tiempo) experimental que no fue tratado con IFC305.

Nuestro compuesto fue capaz de incrementar el nivel de SAM tanto en grupos con daño cirrótico como en grupos donde se ha inducido un carcinoma hepatocelular, como es posible observar en la figura 13.

El que el IFC305 favorezca altos niveles de SAM está indicando una mayor disponibilidad del único sustrato capaz de donar grupos metilo a diferentes biomoléculas. Es ampliamente reconocido que en el contexto de una modulación epigenética, hablando particularmente de patrones de metilación asociados al cáncer, se sabe que predomina un ambiente hipometilado y únicamente zonas discretas se encuentran con patrones aberrantes de hipermetilación, como zonas de genes reconocidos como oncogénicas. En este contexto, es posible que el compuesto pueda influir en el mejoramiento de un microambiente hipometilado encontrado de forma anormal en células transformadas.

Para poder dilucidar si nuestro compuesto influye de manera distinta en zonas con diverso grado de daño hepático, se procedió a evaluar los índices de metilación dado por el cociente entre el nivel de SAM y SAH; tanto en zonas tumorales como no tumorales.

A continuación se muestra la relación de SAM disponible respecto a SAH determinados por HPLC tanto en zonas no tumorales y zonas tumorales.

A. ZONA NO TUMORAL

B. ZONA TUMORAL

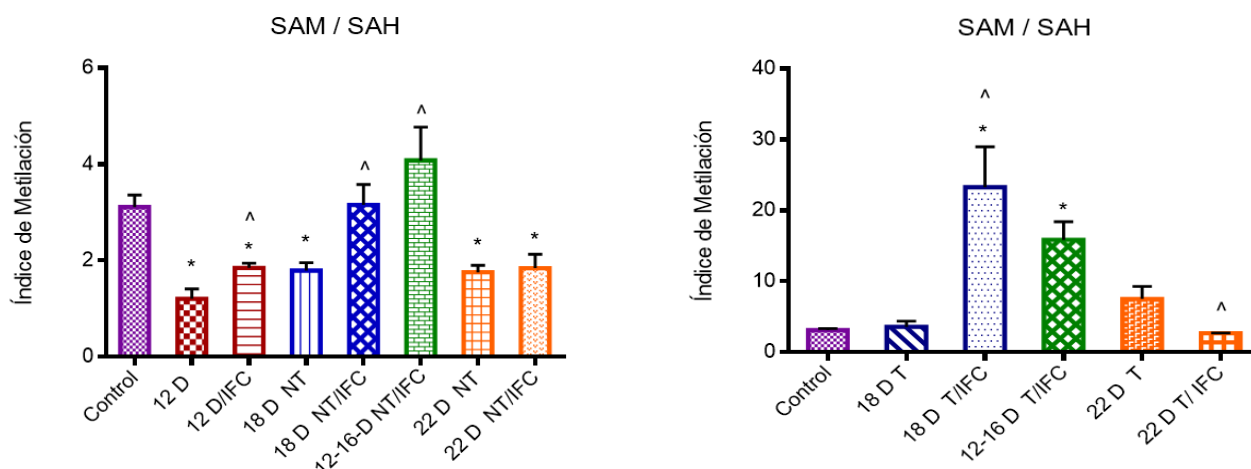


Figura 14. Índice de metilación (SAM / SAH) detectados en muestra de hígado de ratas administradas con DEN bajo el modelo secuencial cirrosis-CHC. A) Correlación del nivel de SAM encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) entre el nivel de SAH en las mismas zonas de daño. B) Correlación del nivel de SAM encontrado en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) entre el nivel detectado de SAH en las mismas zonas de daño. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D I/FC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

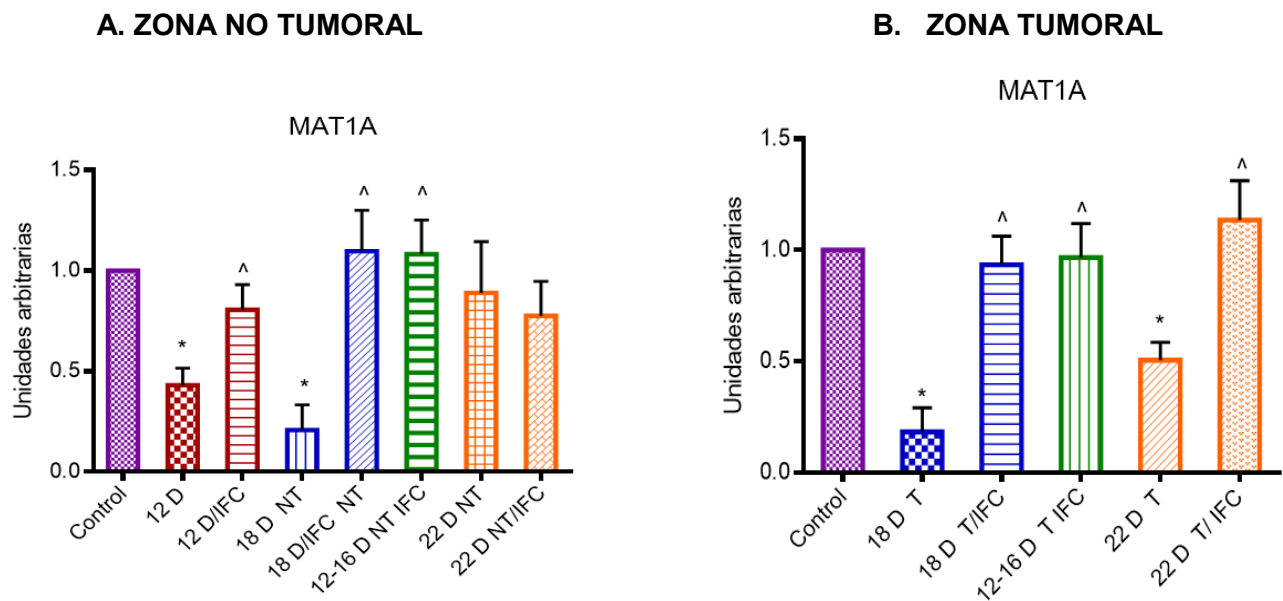
10.2. Efecto del hepatoprotector, IFC305, en el nivel de abundancia de las enzimas encargadas de llevar a cabo la síntesis de SAM, las Metionina Adenosiltransferasas (MAT) en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.

10.2.1. Efecto en el nivel de la proteína MAT1A, expresada exclusivamente en hígado adulto sano.

Las enzimas MAT son las únicas capaces de poder llevar la síntesis de SAM, único donador fisiológico de grupos metilo. Estas enzimas tienen una expresión diferencial en hígado respecto a tejidos extrahepáticos.

A continuación se muestran el nivel proteico de MAT1A, la cual es la única enzima ampliamente activa únicamente en el hígado que lleva a cabo la síntesis de SAM a partir de metionina proveniente de la dieta y del ATP proveniente del metabolismo energético. La expresión de esta proteína sirve como marcador de daño pues cuando el CHC se instala en el órgano la cantidad de expresión de esta enzima se observa disminuida, afectando directamente a los niveles de SAM disponibles en el organismo, puesto que del hígado puede ser transportado al resto de los órganos.

La determinación de esta proteína se realizó mediante la técnica de Western blot, en los diversos grupos experimentales teniendo consideradas ambas zonas de daño no tumoral y tumoral, como se describió anteriormente.



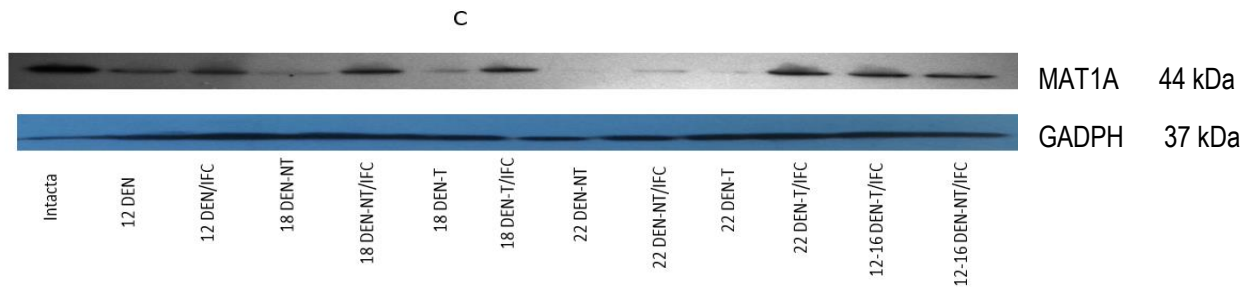


Figura 15. IFC305 incrementa el nivel de la proteína MAT1A en zona no tumoral (NT) y tumoral (T) tanto para grupos evaluados como cirróticos y como cancerosos. A) Cuantificación del nivel de proteína MAT1A encontrados en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) normalizados con la proteína constitutiva GADPH. B) Cuantificación del nivel de proteína MAT1A encontrados en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) normalizados con la proteína constitutiva GADPH. C) Película representativa de las muestras analizadas. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D//IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

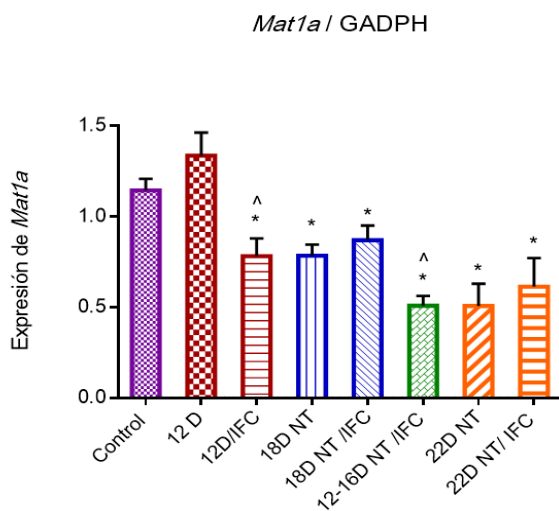
Como se observa en la figura 15, la cantidad de proteína MAT1A detectada en muestras con daño cirrótico y con carcinoma hepatocelular, en general, está ampliamente disminuida, haciéndose evidente la bajo regulación de esta enzima en zonas tumorales.

Tras analizar muestras tratadas con IFC305, se observó que la cantidad de proteína MAT1A, se recupera satisfactoriamente llegando a mostrar niveles muy parecidos a muestras control. Por lo tanto, podemos proponer que el IFC305 estaría revirtiendo el nivel bajo la proteína MAT1A en el hígado tratado con DEN. Esto puede contribuir directamente sobre el nivel de SAM determinado en este modelo *in vivo*.

Además es importante mencionar que de acuerdo a lo descrito, la proteína MAT1A al ser la única expresada de forma normal en el hígado adulto sano es considerada como un marcador de hepatocitos diferenciados e indicativo de un órgano funcional.

10.2.2. Efecto sobre la expresión del gene *Mat1a*

A. ZONA NO TUMORAL



B. ZONA TUMORAL

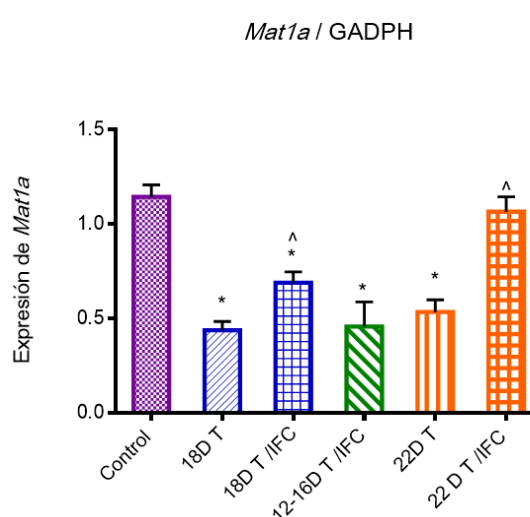


Figura 16. IFC305 tiende a regular positivamente el nivel de expresión del gen *Mat1a* en zona no tumoral (NT) y tumoral (T) tanto para grupos evaluados como cirróticos y como cancerosos. A) Cuantificación del nivel del transcrito del gen *Mat1a* encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) normalizados con el *housekeeping GADPH*. B) Cuantificación del nivel del transcrito del gen *Mat1a* encontrado en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) normalizados con el *housekeeping GADPH*. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

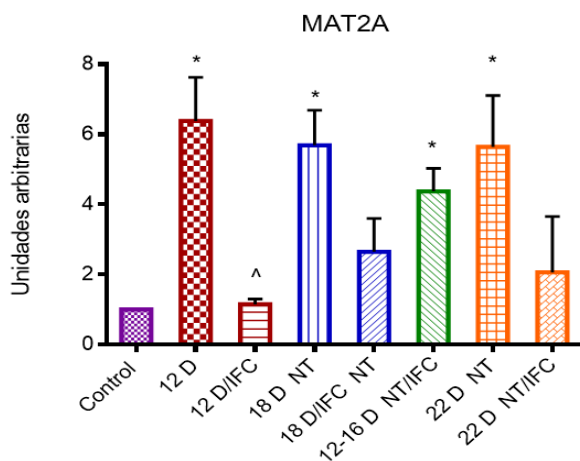
Como se observa en la Figura 16, el efecto del IFC305 en una zona no tumoral (panel izquierdo) mostró una tendencia a incrementar la cantidad de transcrito del gen *Mat1a*, en muestras consideradas ya como cancerosas; sin embargo, en una etapa cirrótica este derivado de adenosina presenta un efecto contrario, al disminuir significativamente los niveles del transcrito.

Se observó en una zona tumoral de muestras con la inducción de carcinoma hepatocelular que el efecto del IFC305 es capaz de incrementar significativamente el nivel de transcrito del gen *Mat1a*, el cual se encontró disminuido en muestras únicamente tratadas con el carcinógeno.

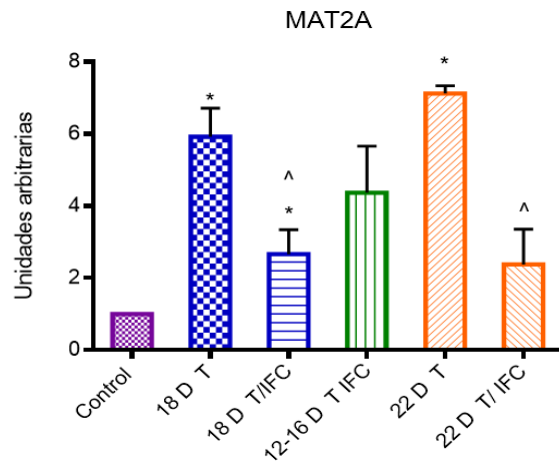
A continuación se muestran el efecto de este derivado de adenosina sobre la presencia de la proteína MAT2A expresada preferentemente en tejidos no hepáticos, donde la demanda de SAM no es tan alta como lo que se observa en el hígado adulto sano.

10.2.3. Efecto del IFC305 sobre la abundancia de la proteína MAT2A en hígado con daño hepático

A. ZONA NO TUMORAL



B. ZONA TUMORAL



C

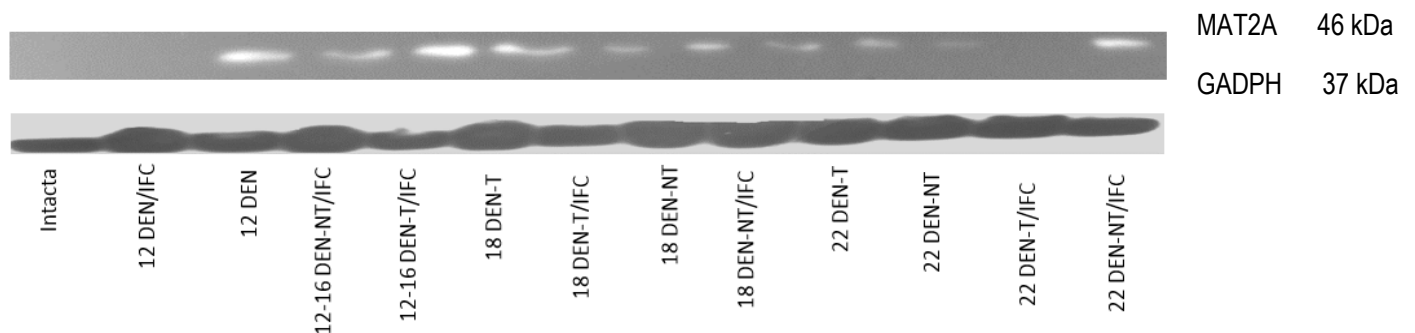


Figura 17. IFC305 disminuye el nivel de la proteína MAT2A en zona no tumoral (NT) y tumoral (T) tanto para grupos evaluados como cirróticos y como cancerosos. A) Cuantificación del nivel de proteína MAT2A encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) normalizados con la proteína constitutiva GADPH. B) Cuantificación del nivel de proteína MAT2A encontrado en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) normalizados con la proteína constitutiva GADPH. C) Película representativa de las muestras analizadas. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

En el caso de la proteína MAT2A se observa que tanto en muestras cirróticas como en muestras con CHC hay una alta expresión de la proteína respecto del hígado intacto. Después de la administración del compuesto hepatoprotector se encuentra una importante baja en la expresión de esta enzima.

La sobreexpresión de la proteína MAT2A está asociada a un proceso de des-diferenciación hepática y proliferación exacerbada, características presentadas en un hígado dañado. Además, se conoce que los estudios enzimáticos han mostrado que la proteína MAT2A es fácilmente saturable por su sustrato; la metionina. Mientras que el producto de la reacción catalizada por esta proteína, SAM, participa en una autoregulación negativa; con lo cual la reacción biosintética queda limitada. Por ende aunque la proteína MAT2A sea capaz de llevar a cabo la formación de SAM, su eficiencia es limitada.

Caso contrario, la proteína MAT1A tiene una alta eficiencia de reacción, con lo cual la biosíntesis de SAM es altamente favorecida y el nivel fisiológico de este sustrato se ven normalizados para poder ser destinados a diferentes biomoléculas.

10.2.4. Efecto sobre la expresión del gene *Mat2a*

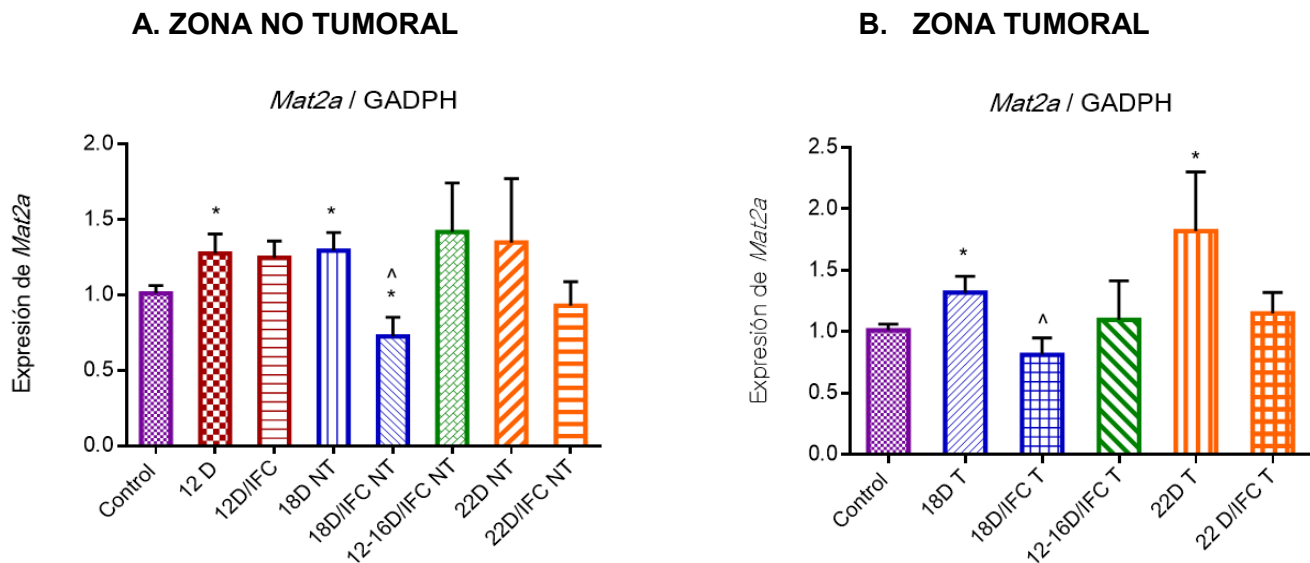


Figura 18. IFC305 tiende a normalizar el nivel de ARNm del gen *Mat2a* en zona no tumoral (NT) y tumoral (T) tanto para grupos evaluados como cirróticos y como cancerosos. A) Cuantificación del nivel de transcrito del gen *Mat2a* encontrados en muestras experimentales en Zonas No Tumoraes (NT) normalizados con el *housekeeping GADPH*. B) Cuantificación del nivel de transcrito del gen *Mat2a* encontrados en muestras experimentales en Zonas Tumoraes (T) normalizados con el *housekeeping GADPH*. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

En la figura 18, podemos observar que el nivel del transcrito de *Mat2a* presentó cambios discretos en un estadio cirrótico respecto a un tejido hepático control, sin embargo, es posible observar que en una zona no tumoral en general el efecto del IFC305 sobre la cantidad de transcrito disponible de *Mat2a* es mantenerlo a la baja o en niveles parecidos a las muestras control puesto que a diferencia de los grupos experimentales únicamente tratados con DEN se observa un incremento en los niveles de expresión del gen *Mat2a*.

En el panel derecho, en muestras de zonas tumorales, se observa claramente que el nivel del transcrito incrementó en una etapa de daño como lo es el carcinoma inducido con el DEN, al igual que en una zona no tumoral, pero después de la administración de nuestro compuesto, es posible disminuir el nivel de expresión del gen *Mat2a*, incluso a niveles de las muestras Control.

La reacción que catalizan las MAT a partir de metionina también es dependiente de ATP, sin embargo cuando existe daño hepático crónico como lo son la cirrosis y CHC, el metabolismo energético proveniente de la mitocondria se ve afectado, mermando en el nivel de ATP disponible en el órgano dañado.

Al estar disminuido el nivel de ATP, la cantidad de AMP (Adenosina Monofosfato) en la célula es mucho mayor. A nivel metabólico la relación entre el nivel de ATP y AMP es considerada clave para determinar el nivel energético en un determinado contexto celular. Este aumento en el nivel de AMP aunado a otros tipos de estrés puede ser detonantes para la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (AMPK), y así entonces facilitar la liberación de proteínas de unión a RNA (RBPs) hacia el citosol.

Es por ello, que se determinó la cantidad de proteína AMPK activada presente en las muestras hepáticas de los grupos experimentales evaluados bajo el modelo secuencial cirrosis-CHC; los cuales se muestran a continuación.

10. 3 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la activación de la proteína AMPK en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.

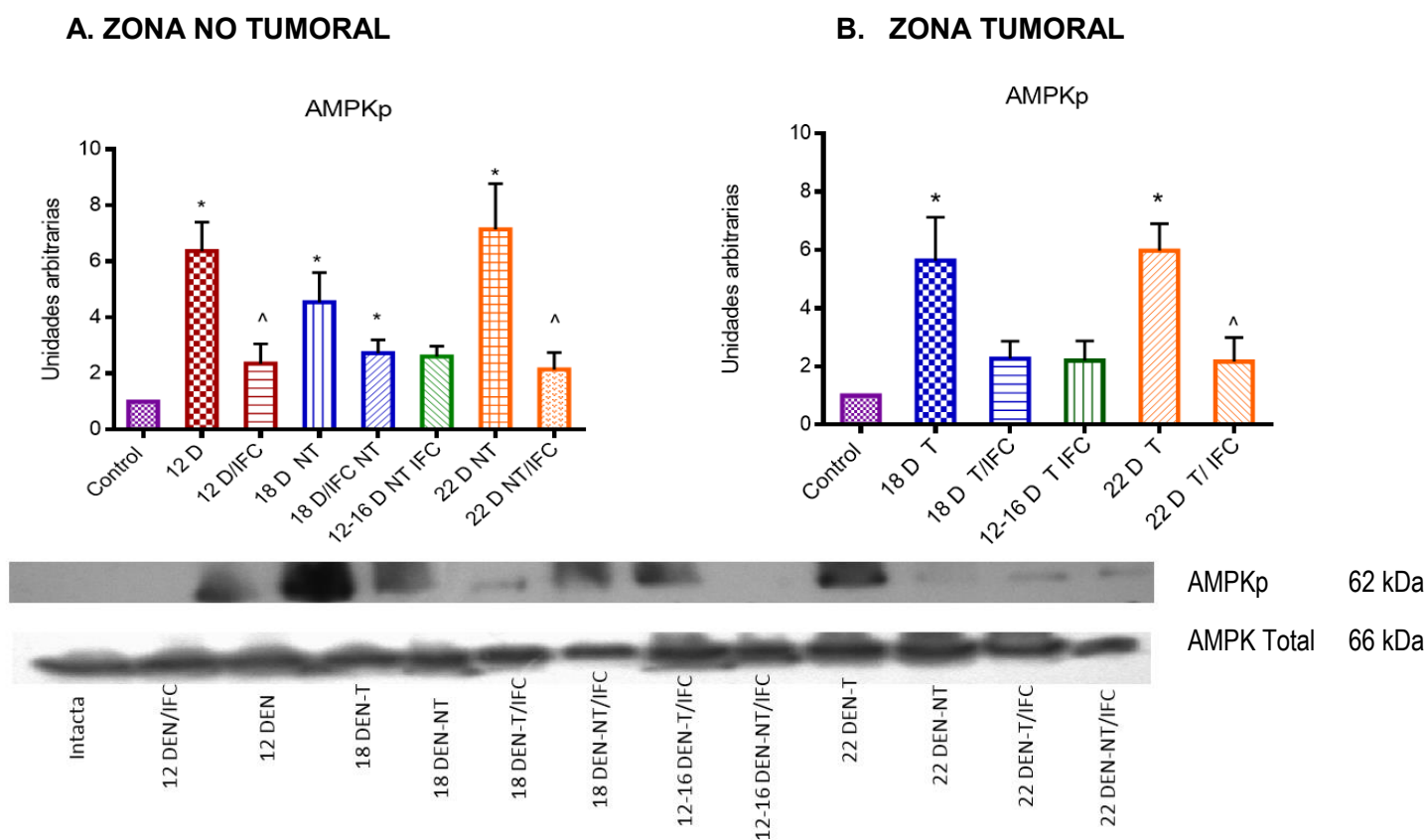


Figura 19. IFC305 disminuye el nivel de la proteína AMPK activada en zona no tumoral (NT) y tumoral (T) tanto para grupos evaluados como cirróticos y como cancerosos. A) Cuantificación del nivel de la proteína AMPKp encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumoraes (NT) normalizados con la proteína AMPK total. B) Cuantificación del nivel de proteína AMPK activada encontrados en muestras experimentales en Zonas Tumoraes (T) normalizados con la proteína AMPK total. C) Película representativa de las muestras analizadas. Los valores representan la media con barras de error estándar de la

media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; ^P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305

La activación de la proteína AMPK depende de una fosforilación previa por otra cinasa; sin embargo, como se mencionó antes esta activación es característica de una desregulación a nivel energético y metabólico.

Como se observa en la figura 19 la proteína AMPK activada se encuentra de forma abundante, tanto en muestras cirróticas como muestras con carcinoma hepatocelular en zonas no tumorales y tumorales. Interesantemente con la administración de nuestro compuesto el nivel de esta proteína disminuyeron favorablemente en la célula. Así entonces, el IFC305 está contribuyendo a mantener no activada esta proteína indicando de forma directa niveles óptimos de ATP y bajos niveles de AMP.

Aunado al estrés energético, la inducción tanto de cirrosis como de CHC con un compuesto altamente tóxico también detona otros cambios no favorables para la célula y para el órgano blanco, entre ellos la capacidad de síntesis de SAM, la cual cabe recordar es llevada principalmente en el hígado. Sin embargo, como se demostró con los resultados previos en un modelo *in vivo* existe una desregulación en las enzimas MAT; MAT1A y MAT2A; en un estadio cirrótico y en otro donde ya existe la presencia de CHC (Figura 15-18).

Esta desregulación puede estar afectada por diversos factores, entre ellos moléculas que actúen a nivel *trans* como lo son las proteínas de unión a ARN (RBPs). En la actualidad, se sabe de la existencia de varias RBP que participan de forma activa en la regulación post-transcripcional de genes importantes tanto para la regulación del ciclo celular como para la proliferación, por mencionar algunos aspectos. Sin embargo, trabajos realizados por Mato y colaboradores (13-17) apuntan a que son proteínas como HuR (Antígeno Humano R) y AUF1 (Factor 1 de unión a secuencias ricas en A y U) las que están involucradas en la regulación de los genes MAT.

Es por ello que al encontrar en nuestro modelo experimental esta desregulación del transcriptoma y proteoma en específico a las metionina adenosiltransferasas, es posible que esto sea consecuencia de factores pos-transcripcionales.

A continuación se muestran diagramas en los que se ejemplifica la unión de RBPs a un transcrito específico de las MAT.

En el caso de HuR, la regulación ocurre en el gen *Mat2a* de forma diferencial para un estado patológico y no patológico.

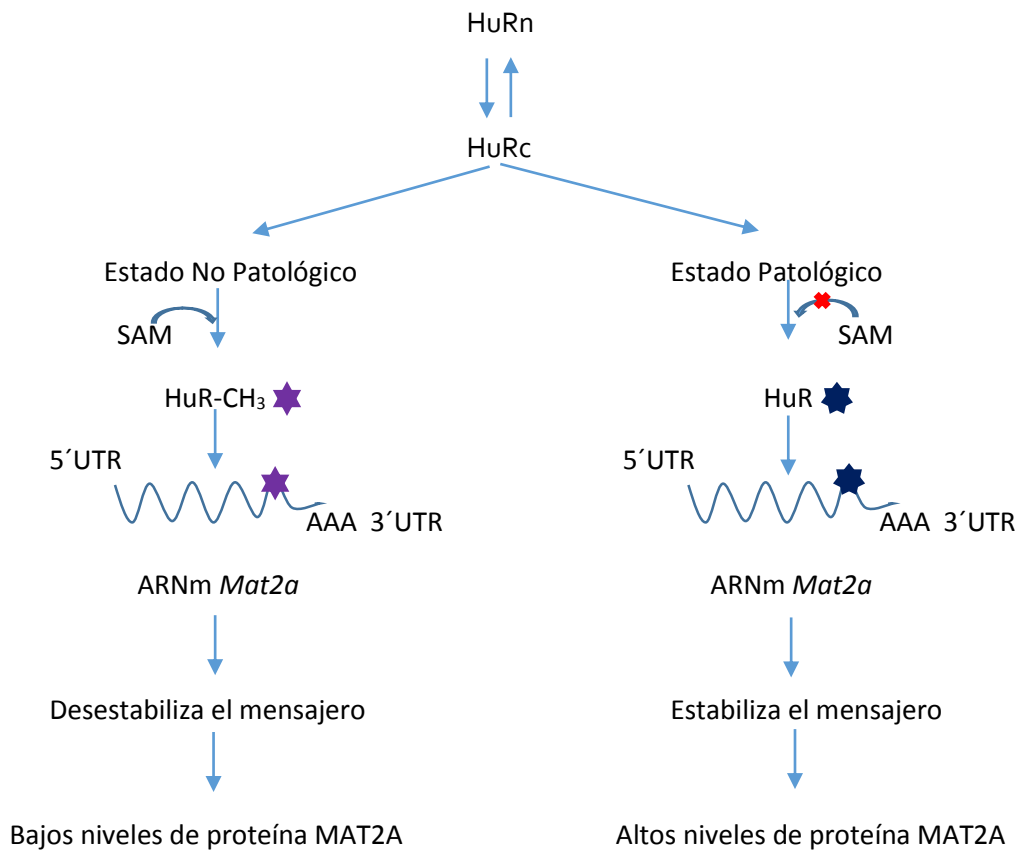


Figura 20. HuR, una proteína de unión a ARN, afecta la transcripción de gen *Mat2a* influenciado por la presencia o ausencia de SAM (Condensado de 13-17).

En el caso particular de AUF1, su efecto se da sobre el gen *Mat1a* de forma diferencial para un estado patológico y no patológico, como se describe con el diagrama siguiente.

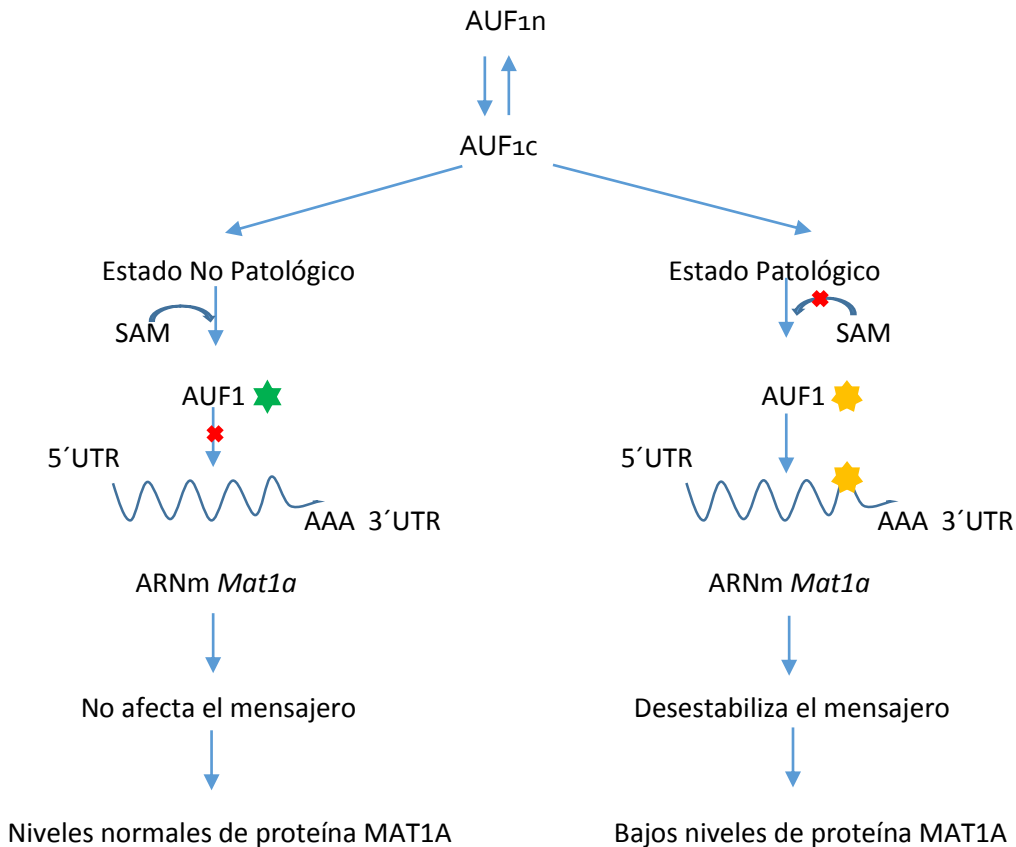


Figura 21. AUF1, una proteína de unión a ARN, afecta la transcripción de gen *Mat1a* influenciado por la presencia o ausencia de SAM (Condensado de 13-17).

El switch que se observa con la expresión de los genes MAT favorece la hepatocarcinogénesis, sin embargo, el compuesto IFC305 es capaz de regular de forma positiva la abundancia de la proteína MAT1A y negativamente a la proteína MAT2A.

Como se describe en los diagramas anteriores, ambas RBPs tienen que estar presentes en el citosol para poder establecer la regulación a nivel post-transcripcional, por ello se evaluó la presencia y/o ausencia de estas proteínas de unión a ARN en el compartimento nuclear; donde está de forma preferente en un estado fisiológico; y en el citosol; donde se transloca después de haber recibido señales de estrés celular.

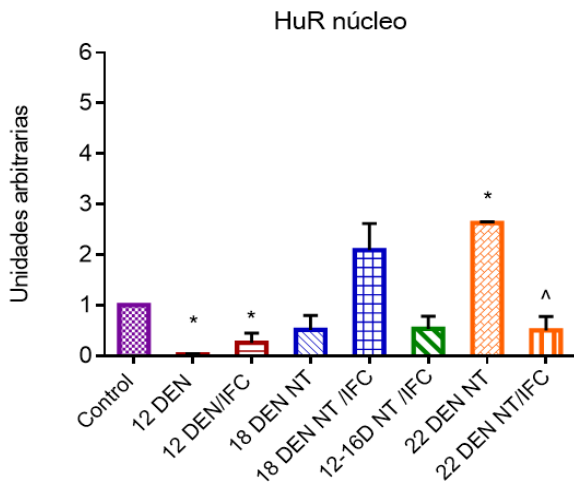
A continuación se muestra la cuantificación de los niveles de proteína HuR analizada en ambos compartimentos celulares a lo largo de 9 grupos experimentales del modelo secuencial cirrosis-CHC, tomando en cuenta zonas con presencia o no de tumores.

10.4 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la presencia de la proteína HuR en el compartimento nuclear y citosólico de muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular en Zona No Tumoral y Tumoral.

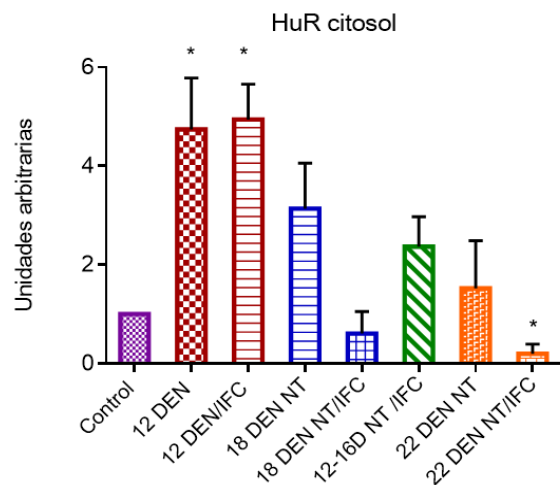
10.4.1 Análisis del nivel de la proteína HuR

ZONA NO TUMORAL

A.

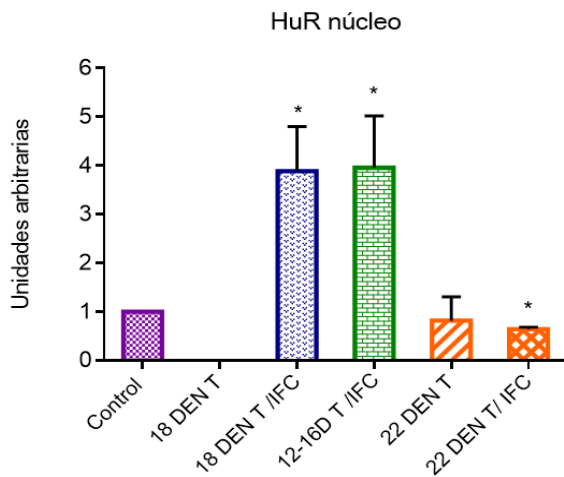


B.

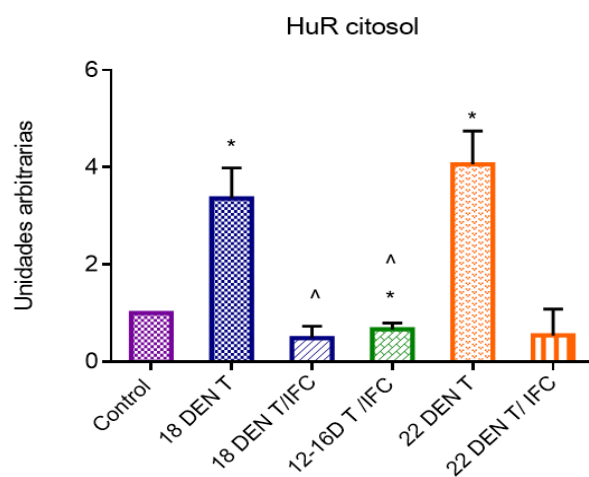


ZONA TUMORAL

C.



D.



E.

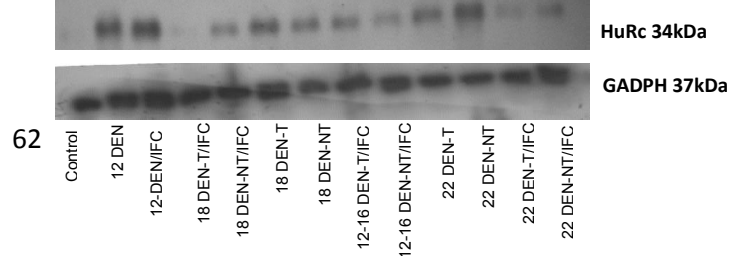
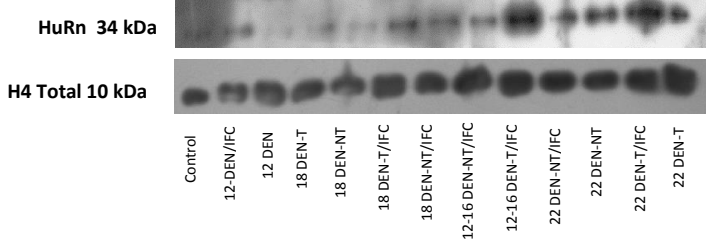


Figura 22. IFC305 facilita una retranslocación de la proteína HuR de citosol a núcleo. A) Cuantificación del nivel de proteína HuR encontrada en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) en muestras de proteína nuclear normalizada con la proteína Histona 4 (H4) total. B) Cuantificación del nivel de proteína HuR encontrada en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) en muestras de proteína citosólica normalizada con la proteína GADPH. C) Cuantificación del nivel de proteína HuR encontrada en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) en muestras de proteína nuclear normalizadas con la proteína Histona 4 (H4) total. D) Cuantificación del nivel de proteína HuR encontrada en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) en muestras de proteína citosólica normalizados con la proteína GADPH. E) Película representativa de las muestras analizadas. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. *P<0.05 contra Intacta; #P<0.05 contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

A nivel de proteína se observó que el compuesto IFC305 tiene la capacidad de llevar a cabo una retranslocación hacia el núcleo de la proteína HuR citosólica. Esta movilización de un compartimento celular a otro afecta directamente la cantidad de RBP que pueda estar modulando la transcripción de su transcrito blanco, *Mat2a* en muestras con un daño crónico como lo es el CHC.

En muestras experimentales con cirrosis, el nivel citosólico de la proteína HuR no disminuye con la administración del IFC305, sin embargo, tomando en cuenta que es un estadio previo al carcinoma hepatocelular el daño crónico establecido en el órgano blanco es diferente y menor por lo que eventos como una degradación excesiva de proteína se pueden estar llevando a cabo y afectando la cantidad de proteína detectada. Los resultados inmunohistoquímicos de HuR se presentan a continuación.

10.4.2 Análisis inmunohistoquímico de la proteína HuR

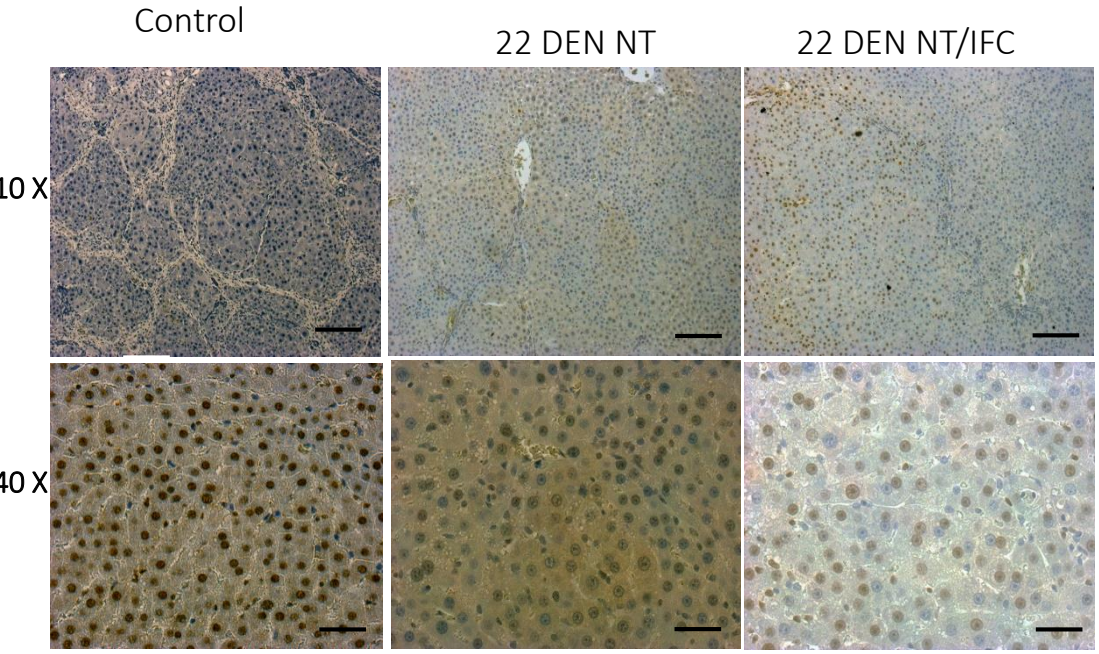
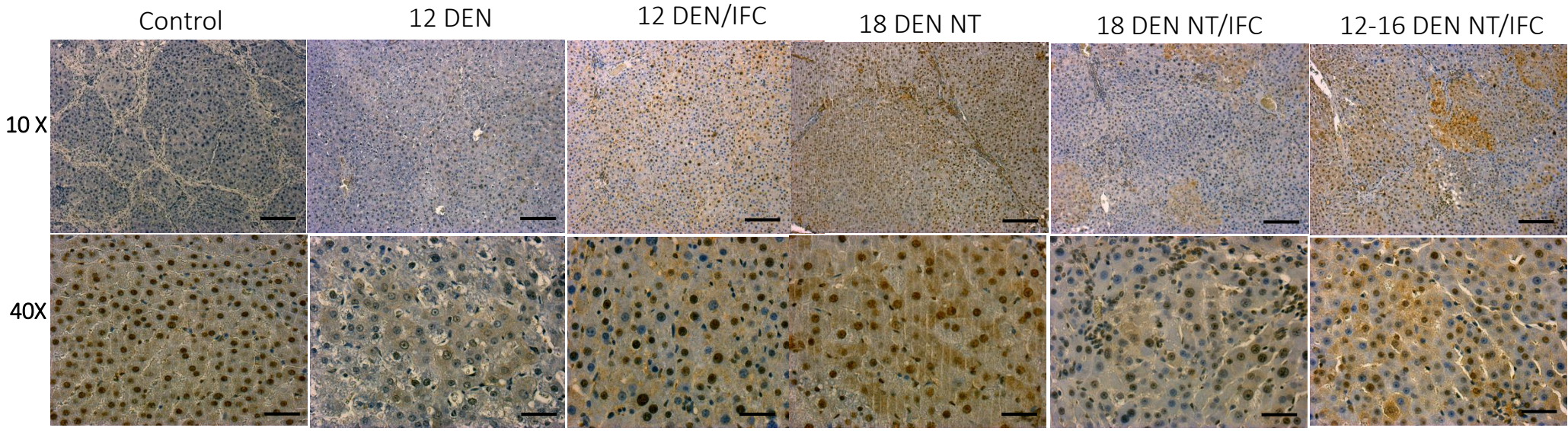


Figura 23. Inmunohistoquímica de la proteína HuR de muestras hepáticas de los diversos grupos experimentales de zonas no tumorales. Aumento de 10x y 40x. Tinción Hematoxilina - Eosina. Barra de escala 20um.

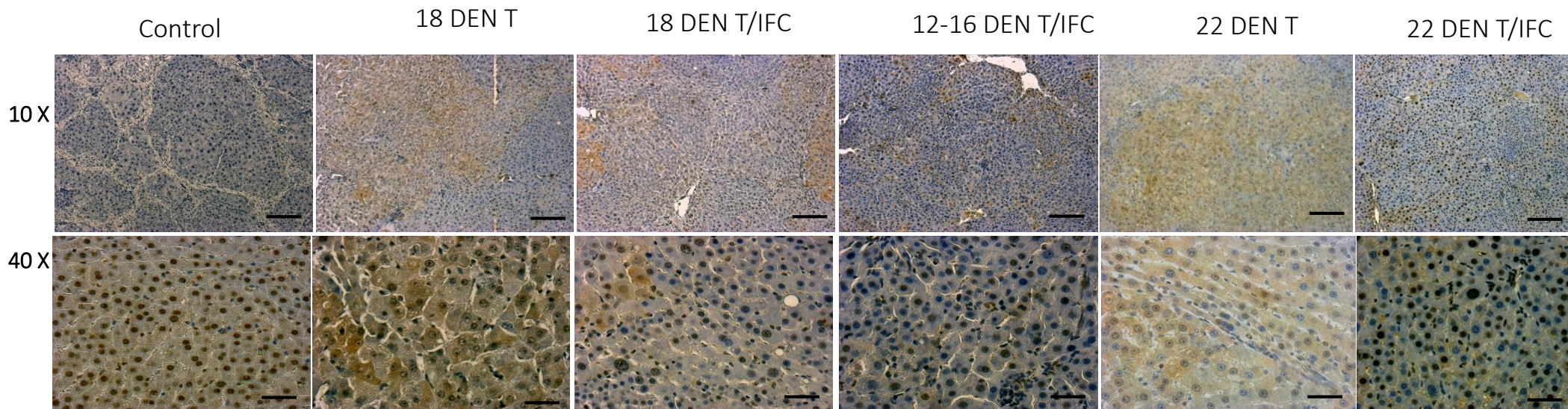


Figura 24. Inmunohistoquímica de la proteína HuR de muestras hepáticas de los diversos grupos experimentales de zonas tumorales. Aumento de 10x y 40x. Tinción Hematoxilina – Eosina. Barra de escala 20um.

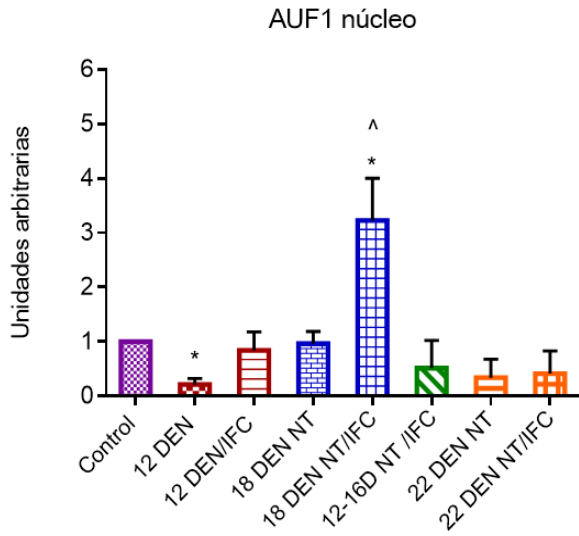
En los paneles anteriores se muestran las inmunohistoquímicas realizadas para la proteína HuR, tanto en zonas tumorales como no tumorales. Muestras cirróticas tratadas con el derivado de adenosina denotan una cantidad elevada de proteína HuR a nivel citosólico. Cortes realizados de grupos experimentales a los cuales se les indujo CHC durante 16 semanas de tratamiento con DEN y además estuvieron expuestos al IFC305 muestran una tinción de la proteína HuR más localizada en núcleos de células parenquimales, con lo cual este hepatoprotector podría estar actuando de manera diferencial en las etapas de daño hepático.

Por otra parte, para el caso de la RBP AUF1 también se realizaron análisis a nivel de proteína nuclear y citosólica mediante Western blots y un análisis de inmuno localización por la técnica de Inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

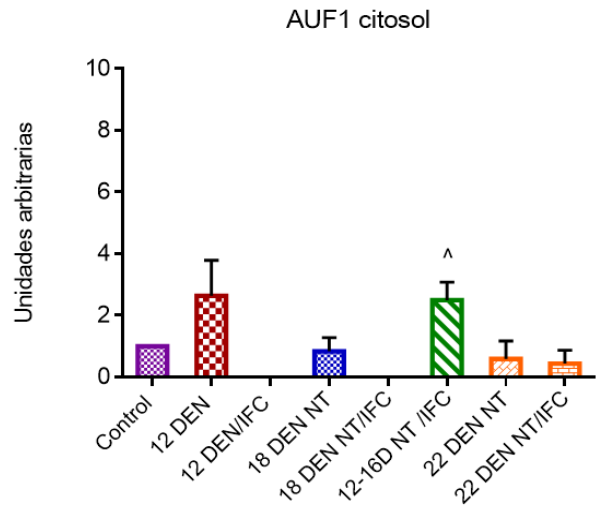
10.5 Efecto del hepatoprotector, IFC305, sobre la presencia de la proteína AUF1 en el compartimento nuclear y citosólico de muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular en Zona No Tumoral y Tumoral.

**10.5.1 Análisis del nivel de proteína AUF1
ZONA NO TUMORAL**

A.

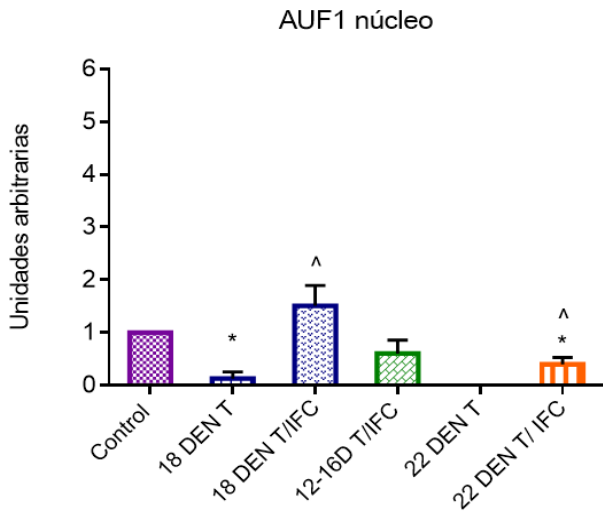


B.

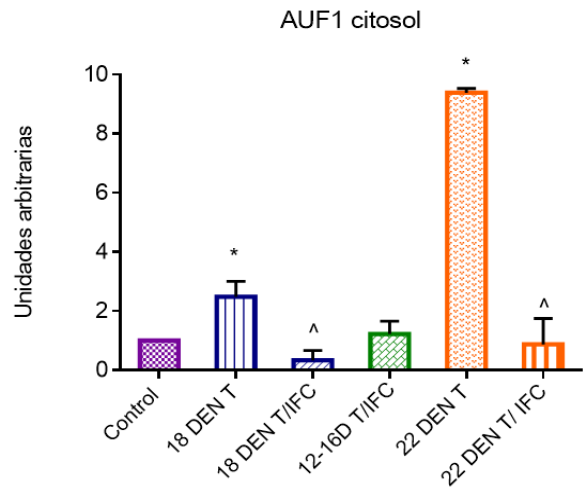


ZONA TUMORAL

C.



D.



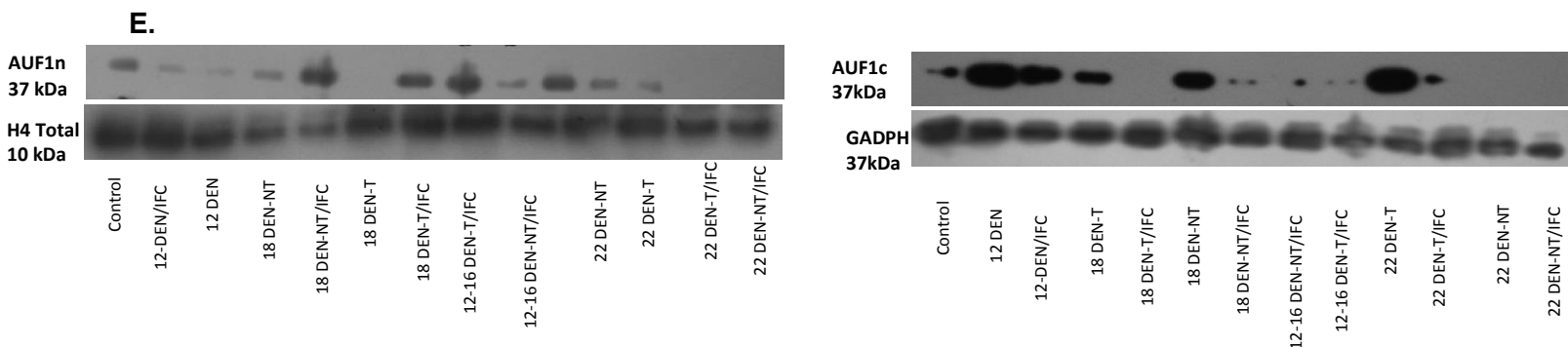


Figura 25. IFC305 facilita una la movilidad de la proteína AUF1 del citosol al núcleo. A) Cuantificación del nivel de la proteína AUF1 encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) de proteína nuclear normalizados con la proteína Histona 4 (H4) total. B) Cuantificación del nivel de la proteína AUF1 encontrado en muestras experimentales en Zonas No Tumorales (NT) de proteína citosólica normalizados con la proteína GADPH. C) Cuantificación del nivel de proteína AUF1 encontrados en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) de proteína nuclear normalizados con la proteína Histona 4 (H4) total. D) Cuantificación del nivel de la proteína AUF1 encontrados en muestras experimentales en Zonas Tumorales (T) de proteína citosólica normalizados con la proteína GADPH. E) Película representativa de las muestras analizadas. Los valores representan la media con barras de error estándar de la media (EEM) de 5 muestras para los grupos Intacta-22 D; incluyendo NT y T; y de 3 muestras para grupos 22 D/IFC; incluyendo NT y T. * $P < 0.05$ contra Intacta; # $P < 0.05$ contra mismo grupo experimental tratado con IFC305.

AUF1 se encuentra predominantemente en el núcleo de los hepatocitos, sin embargo, cuando el microambiente celular denota daño o desequilibrio producto de estrés, está proteína puede ser translocada a áreas citosólicas, efectuando ahí la regulación para su mensajero blanco, en este caso particular el gen *Mat1a* disminuyendo directamente la cantidad de proteína MAT1A existente en el hígado.

Los resultados obtenidos, muestran que tanto en tejido cirrótico como en tejido canceroso el IFC305 relocaliza al núcleo la cantidad de proteína AUF1 que estaba predominantemente en el citosol tras haber sido expuestos al DEN.

Para poder corroborar estos datos se realizaron cortes histológicos de las muestras de tejido hepático de todos los grupos experimentales además de áreas con y sin tumor, y se analizaron mediante la técnica de inmunohistoquímica. A continuación se muestran las imágenes obtenidas.

10.5.2 Análisis inmunohistoquímico de AUF1

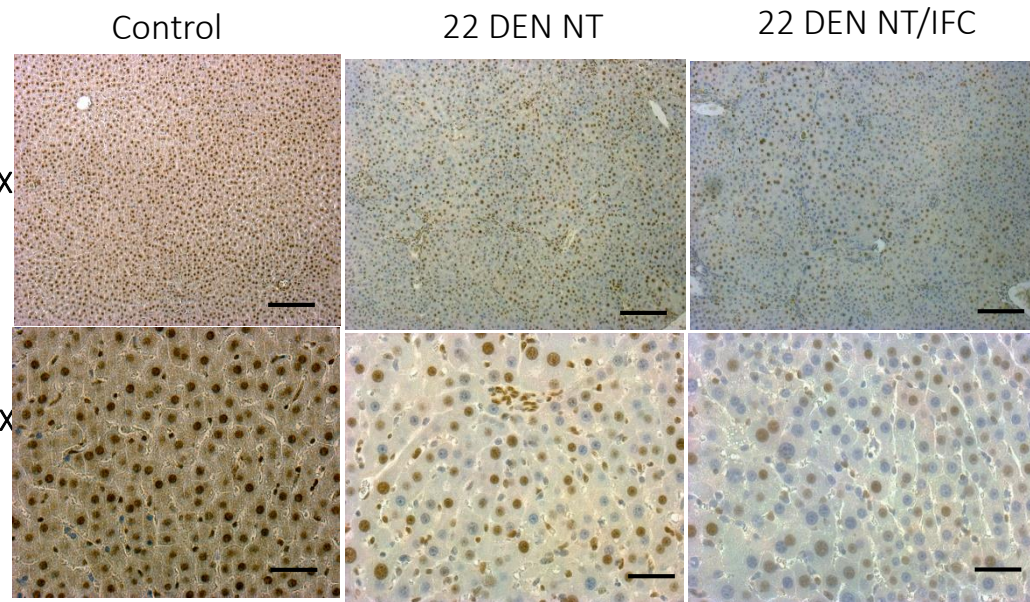
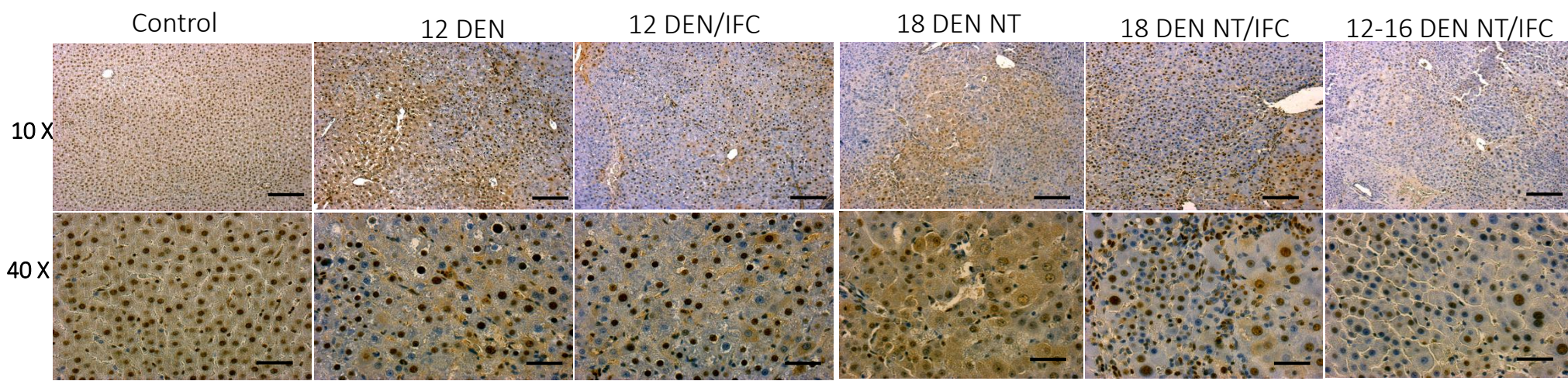


Figura 26. Inmunohistoquímica de la proteína AUF1 de muestras hepáticas de los diversos grupos experimentales de zonas no tumorales. Aumento de 10x y 40x. Tinción Hematoxilina - Eosina. Barra de escala 20um.

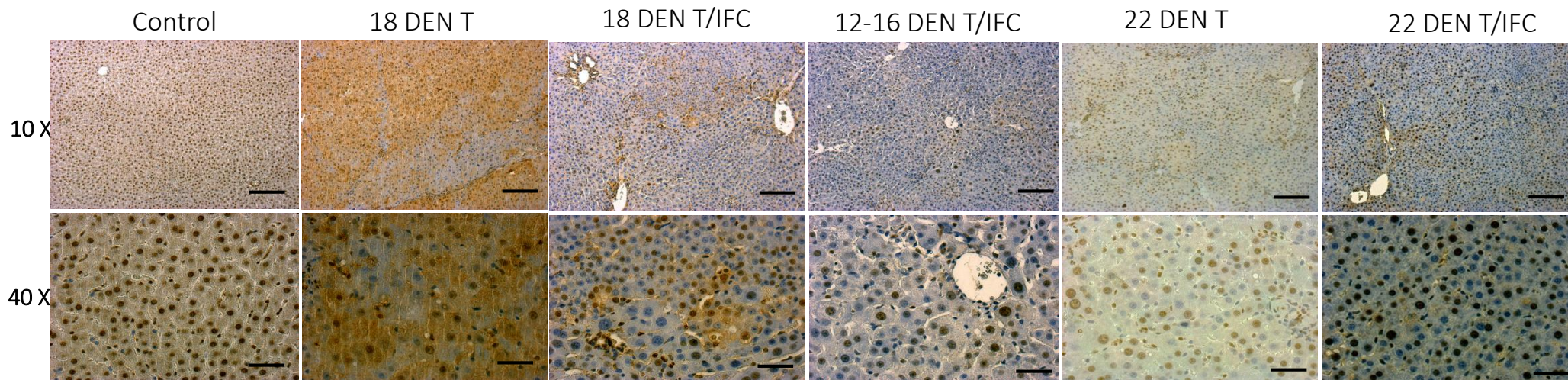


Figura 27. Inmunohistoquímica de la proteína AUF1 de muestras hepáticas de los diversos grupos experimentales de zonas tumorales. Aumento de 10x y 40x. Tinción Hematoxilina - Eosina. Barra de escala 20um.

Como se puede observar en las figuras 26 y 27, la administración de Dietilnitrosamina favorece la movilización proteica de AUF1 de compartimentos nucleares hacia áreas citosólicas, evidenciando daño en las muestras hepáticas. Sin embargo, el efecto del IFC305 se observa al presentar una tinción predominante en los núcleos de los hepatocitos y además manifiesta una disminución en la tinción del área citosólica.

Aunado a ello, el efecto de este hepatoprotector no solamente se ve reflejado en zonas tumorales, sino que también ejerce un efecto positivo en áreas no tumorales, sin dejar de tomar en cuenta que sigue siendo un órgano completo dañado y alterado por la administración de DEN, ya sea durante 12 o 16 semanas.

Por lo que, este derivado de adenosina es capaz de poder efectuar una retranslocación desde el citosol hacia el núcleo de la proteína AUF1, para favorecer que el transcrito del gen *Mat1a* no sea blanco de la regulación negativa de esta RBP y module a la baja la cantidad de proteína MAT1A que de forma fisiológica debe estar presente en el hígado adulto sano.

Una vez comprobada la expresión diferencial de las proteínas de unión a ARN, tanto de HuR como de AUF1, en núcleo y citosol de muestras de ratas Wistar del modelo secuencial cirrosis-CHC, se tuvo que validar y estandarizar la técnica de Inmunoprecipitación de Complejos

Ribonucleoproteicos (RIP) para poder tener una mayor evidencia de esta unión de RBP con los transcritos de los genes MAT en este modelo experimental.

10.6 Estandarización de las condiciones para realizar la Inmunoprecipitación de Complejos formados por ARN y proteína, en un modelo secuencial cirrosis-CHC inducido con DEN.

Con las determinaciones anteriores, logramos evidenciar que nuestro compuesto hepatoprotector, IFC305, era capaz de facilitar una retranslocación de proteínas de unión a ARN, HuR y AUF1, desde el citosol al núcleo, donde de forma fisiológica permanecen más abundantes, no influyendo de forma importante en el tiempo de vida media de sus ARNm blanco, los genes *Mat1a* y *Mat2a*.

La proteína MAT1A se incrementa en grupos tratados con IFC305, y la proteína MAT2A, asociada a un fenotipo des diferenciado de los hepatocitos, disminuye. Una pregunta adicional fue definir si los complejos ribonucleoproteicos pueden ser modulados por la presencia del IFC305.

Para este fin se utilizó la técnica de Inmunoprecipitación del ARN con proteína. Dado que la proteína MAT2A es ampliamente distribuida en tejidos no hepáticos, se trabajó con tejido de cerebro de rata Wistar macho para contar con un control negativo de la presencia de la proteína y gen *Mat1a* y positivo para *Mat2a*. El hígado sano como control positivo para *Mat1a* y negativo para *Mat2a*. Sin embargo, fue necesaria la estandarización de la técnica.

Como primer paso, al trabajar con tejido congelado es sumamente importante garantizar una nula o mínima degradación de moléculas como ARN y proteína, razón por la cual, fue necesario determinar la sensibilidad de la técnica antes de poder comprometer muestras biológicas ya tratadas bajo el modelo secuencial cirrosis-CHC. La estandarización de la técnica se realizó bajo la interacción del ARNm de *Mat1a* y la proteína AUF1.

Al realizar la inmunoprecipitación, descrita en la parte metodológica de este trabajo, se incluyeron cuatro fracciones como controles internos: Input, IgG (5ug), Perlas Magnéticas y anticuerpo anti-AUF1 (5ug).

Debido al uso del tejido completo, la viabilidad de las biomoléculas a tratar se observa aún más comprometida, razón por la cual hasta el momento se han hecho sólo dos ensayos piloto de esta aproximación en la modulación de los complejos ribonucleoproteicos por la presencia del IFC305. La tendencia observada es que efectivamente existe un enriquecimiento en el hígado control de la proteína AUF1, y correlaciona con una mayor presencia de ARNm del gen *Mat1a* (Figura 28).

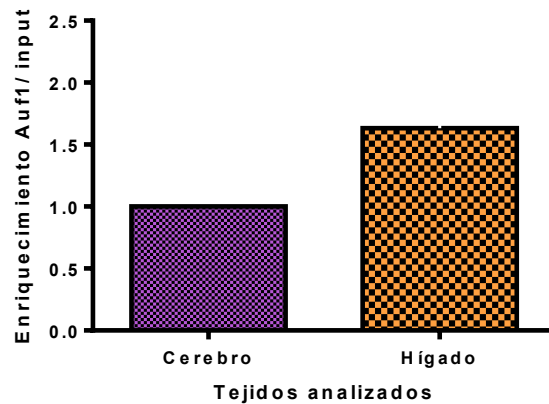


Figura 28. Enriquecimiento de AUF1 en muestras tratadas de cerebro e hígado. Muestras analizadas bajo la técnica de RIP.

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los trastornos hepáticos principalmente la cirrosis y el carcinoma hepatocelular, tienen un alto índice de mortalidad a nivel mundial, y nuestro país no es la excepción.

El hígado, órgano donde la transformación metabólica ocurre fundamentalmente en el organismo, está expuesto a múltiples agentes que pueden favorecer alguna hepatopatía. Todo esto lleva a una alteración en la capacidad metabólica de este órgano.

Una de las vías biosintéticas alteradas es el ciclo de la metionina, donde SAM es el sustrato clave para llevar a cabo las reacciones de metilación. Mediante HPLC, fue posible cuantificar el nivel de este sustrato (Fig 12,13), obteniendo datos alentadores en los cuales se muestra que el IFC305 es capaz de incrementar el nivel de SAM de forma general en el órgano y no se encontró una distinción entre una zona tratada como no tumoral y otra como tumoral.

Este efecto también ocurrió tanto para zonas cirróticas como alteradas ya con CHC, así entonces, incrementando los niveles de SAM, su disponibilidad también aumenta. Esto particularmente podría influir en el grado de metilación de ADN, ARNm, fosfolípidos, residuos de histonas y otras proteínas. Actualmente (51) se sabe que en patologías como el carcinoma hepatocelular y cáncer en general, existen regiones del ADN hipermetiladas, por ejemplo zonas de genes considerados como oncogenes, y todo esto coexiste en un contexto global hipometilado, todo ello nos abre la posibilidad de que el IFC305 es capaz de actuar tanto a nivel metabólico y también se podría considerar el epigenético.

Tomando en cuenta esta posibilidad, en nuestro laboratorio se ha evaluado la metilación global del ADN en estadios cirróticos observando una hipometilación global, pero una vez expuestas las muestras con nuestro compuesto el nivel de metilación global aumenta (52), entonces recordando que aproximadamente el 80% de los casos de CHC diagnosticados preceden de cirrosis, el IFC305 podría estar participando en frenar la progresión de la enfermedad. Los datos obtenidos en este trabajo en cirrosis y CHC inducido con DEN muestran el efecto del IFC305 al aumentar el índice de metilación, con lo cual se podría estar hablando de una reversión de este contexto global de hipometilación, sin embargo, es preciso analizar esta posibilidad.

Es importante recordar que el hígado, es el órgano donde se sintetiza la mayor cantidad de SAM y a partir de aquí es posible distribuirlo a los tejidos que lo requieren. Además como se mencionó previamente, la síntesis de este sustrato es dependiente de la cantidad de metionina y ATP presentes en la célula pero sobre todo de la catálisis de estos sustratos realizada por las enzimas MAT.

Como se evaluó en muestras cirróticas y cancerosas, la proteína MAT1A presente exclusivamente en el hígado adulto sano, está significativamente depletada (Fig 15), mientras que la proteína MAT2A, presente de forma fisiológica únicamente en tejido extra hepáticos y ausente en tejido hepático sano (Fig 17), es ahora sobre expresada en muestras de hígado dañado.

Este switch, o cambio en la expresión de estas enzimas, en etapas cancerosas ha sido detallado ya por varios grupos de investigación (13, 15, 18-19), sin embargo, relativamente poco se ha abordado acerca de la etapa previa al cáncer como lo es la cirrosis en muchos casos y la progresión de la enfermedad, es por ello que al evaluar los cambios ocurridos en este modelo experimental *in vivo* secuencial cirrosis-CHC podemos tener un panorama más amplio sobre el proceso de daño.

En los resultados mostrados previamente, se evaluó la relación transcriptoma- proteoma respecto a los genes *Mat1a* y *Mat2a* (Fig 15-18), encontrando efectos positivos del IFC305 en la cantidad de proteína para MAT1A, la cual es ubicua para el hígado adulto sano. En primera instancia, las zonas no tumorales expuestas al derivado de adenosina muestran niveles bajos del transcrito para *Mat1a*, sin embargo la cantidad de proteína detectada en estas mismas muestras incrementa significativamente respecto a sus grupos no tratados, lo que nos sugiere un punto de regulación intermedio. Éste, si bien puede ser llevado por moléculas que actúan en *trans*, como los microARNs, también es posible que proteínas de unión a ARN modulen esta relación.

Como lo describe la literatura, el gen *Mat1a* es blanco de AUF1, modulando así su transcripción y finalmente la cantidad de proteína presente en el sistema biológico. En nuestro modelo experimental *in*

vivo al utilizar el compuesto IFC305 fue posible facilitar la movilidad de AUF1 a áreas nucleares (Fig 25, 26) para proteger de alguna manera la cantidad de transcrito influenciado por la presencia de esta RBP y así entonces promover mayor cantidad de SAM sintetizado.

Si bien, se sabe de la presencia de cuatro isoformas de AUF1, también es sabido que la de mayor impacto a nivel fisiológico es p37, al presentar una mayor afinidad por sus moléculas blanco y mayor concentración a nivel celular, por lo tanto, nuestro compuesto puede estar teniendo un mayor efecto sobre esta isoforma más que las restantes.

Hasta el momento, no se sabe sobre alguna otra RBP que pueda tener como blanco al gen *Mat1a*, sin embargo, es cierto que pueden existir otras posibilidades de modulación como lo es una degradación excesiva o acumulación de la proteína MAT1A. Pero finalmente el que este la proteína MAT1A tendrá efectos positivos en la célula, en el órgano y en el organismo completo, puesto que esta proteína está altamente implicada en un proceso de diferenciación de las células parenquimales.

Condición experimental	Intacta	12 D	12D + IFC	18D NT	18 D T	18 D NT + IFC	18 D T + IFC	12-16 D NT + IFC	12-16 D T + IFC	22 D	22D + IFC
HuRn	+++	++ +	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
HuRc	+	++ +	++	+++	+++	++	+	+++	+	+++	++
AUF1n	++	++	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+++
AUF1c	+	+	+	++++	+++	+	+	++	+	++++	+

Tabla 8. Resumen de los efectos del IFC305 sobre RBPs como AUF1 y HuR, en cortes de los diferentes grupos experimentales analizados por Inmunohistoquímica. HuRn (proteína HuR en núcleo), HuRc (proteína HuR en citoplasma), AUF1n (proteína AUF1 en núcleo), AUF1c (proteína AUF1 en citoplasma).

En el caso de la modulación de la proteína MAT2A fue posible detectar niveles altos desde etapas cirróticas y manteniéndolos durante estados de daño mayor. Mientras que al evaluar los niveles de transcrito del gen *Mat2a*, en general, éste parece no mostrar grandes cambios respecto a grupos experimentales administrados o no con IFC305.

Sin embargo, es importante notar que en el grupo 18 D/IFC (NT y T), el nivel detectado del transcrito de *Mat2a* si disminuyen considerablemente respecto al grupo 18D, con lo cual estamos obteniendo evidencia de que la administración del IFC305 puede favorecer la no progresión de la enfermedad hepática, puesto que al parecer si la administración del IFC305 ocurre en una etapa con un alto grado de daño ya avanzado, el efecto del compuesto es menor, pero sin dejar de mostrar una tendencia a observar una mejoría hablando a nivel de la presencia de la proteína MAT1A y disminución en la cantidad de proteína MAT2A detectada en hígado sustraído del animal.

En el apartado de introducción de este trabajo, se mencionó que HuR, facilitan la modulación transcripcional de varios ARNm, entre ellos el ARNm de *Mat2a*, como se observa en la Tabla 8, en resumen tanto AUF1 como HuR sufren la movilización al núcleo al exponer el sistema biológico al efecto del IFC305.

El IFC305 favorece el nivel basal de la proteína MAT2A, la cual está íntimamente relacionada a un proceso de daño y des diferenciación hepático. Este efecto puede ser modulado a través de la proteína HuR que no es capaz de unirse al transcrito del gen *Mat2a* y por ende no influir en la vida media de esta molécula y de la proteína resultante del proceso de traducción de este transcrito, la proteína MAT2A.

También se sabe de auto regulación negativa por parte de SAM hacia la proteína MAT2A, por lo tanto, ya que nuestro compuesto es capaz de elevar el nivel de SAM en las muestras analizadas en áreas tumorales y no tumorales, también es capaz de inhibir la actividad residual que pudiera estar presentándose por parte de la proteína MAT2A. Además se debe tomar en cuenta que debido a su capacidad de rápida saturación de la enzima MAT2A por parte de la metionina, la cantidad de SAM disponible a partir de la catálisis con esta enzima es muy inferior en comparación con la biosíntesis de SAM hecha a partir de la transformación de metionina por la MAT1A.

Como se ha mencionado en la primer parte de este trabajo la reacción de síntesis de SAM necesita como sustrato al ATP, éste proveniente en mayor medida del metabolismo energético. Sin embargo, mediante datos obtenidos en el grupo de trabajo (no publicados) el nivel de ATP se ve comprometido en grupos experimentales donde se indujo CHC, por lo que está deficiencia de ATP también influye negativamente en la biosíntesis de SAM.

Caso contrario, al dar el tratamiento con IFC305 la capacidad mitocondrial se ve incrementada al igual que el nivel de ATP disponible para múltiples reacciones celulares, incluyendo la síntesis de SAM. Por lo tanto, nuestro compuesto también tiene la capacidad de influir positivamente en el metabolismo energético de las células.

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo y con la evidencia experimental obtenida, proteínas como HuR y AUF1, pueden modificar la transcripción de varios ARNm, entre ellos el ARNm de *Mat2a* y *Mat1a*, respectivamente. Sin embargo, nuestro compuesto hepatoprotector favorece y promueve una expresión normal de la proteína MAT1A y mantiene a la baja la expresión de la proteína MAT2A en las muestras analizadas.

12. CONCLUSIONES

El IFC305 incrementa el nivel de la proteína MAT1A, y disminuye el nivel de la proteína MAT2A en estadios cirróticos y con cáncer ayudando a una reversión de cirrosis y posible prevención del CHC.

Las modificaciones pos-transcripcionales a las que están sujetas los ARNm de los genes MAT mediante las proteínas de unión a ARN, pueden ser influenciadas por la presencia del IFC305 y así entonces regular el nivel de las proteínas MAT1A y MAT2A a nivel de hígado normal.

IFC305 incrementa el índice de metilación en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC en ratas, contribuyendo posiblemente a aumentar las reacciones de metilación indispensables para la célula.

El IFC305 fue capaz de modificar la localización sub-celular de HuR y AUF1 en muestras *in vivo* desencadena tras la inducción de cirrosis y CHC, con lo cual se recuperan los patrones de expresión de las proteínas MAT1A y MAT2A a nivel de un hígado normal.

El mecanismo propuesto es que nuestro compuesto derivado de adenosina y ácido aspártico inhibe la activación de la AMPK en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC, inhibiendo la liberación masiva de proteínas de unión a ARN al compartimento citosólico y evitando su unión a los transcritos de los genes *Mat1a* y *Mat2a* (Figura 29 y 30).

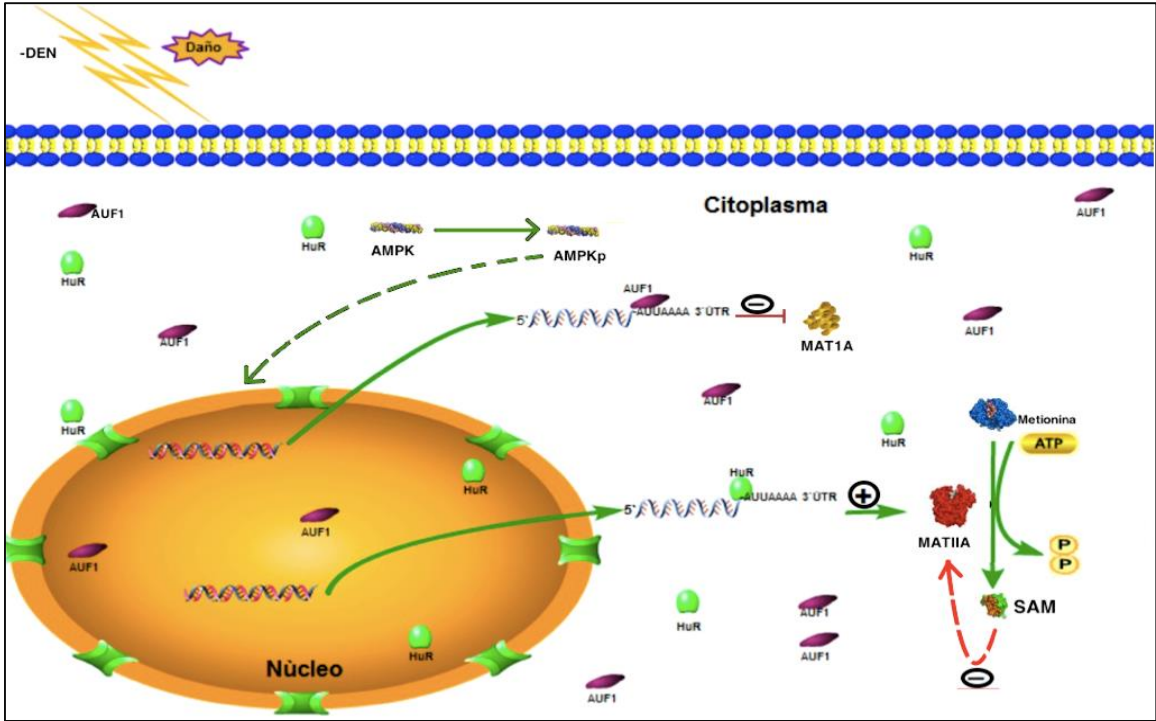


Figura 29. El daño hepático promueve activar a la AMPK, ésta activación favorece la liberación de AUF1 y HuR del núcleo al citoplasma permitiendo la unión de estas proteínas a los ARNm de *Mat1a* y *Mat2a*, respectivamente; y así entonces regular los niveles de las proteínas MAT y la biodisponibilidad de SAM. Diseñado por HH.Vargas.

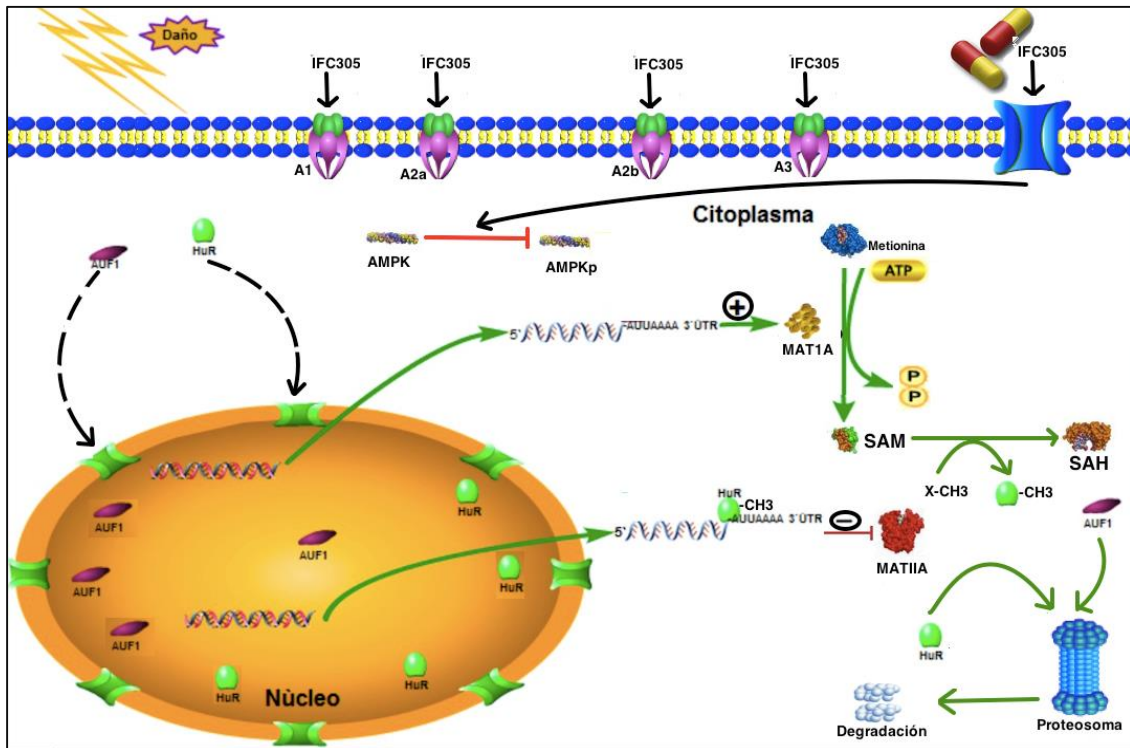


Figura 30. El IFC305 inhibe la activación de AMPK, inhibiendo la liberación masiva de AUF1 y HuR al citoplasma, evitando su unión a los transcritos de los genes *Mat1a* y *Mat2a*, respectivamente. Sin embargo, las proteínas AUF1 y HuR restantes en el citosol pueden ser conducidas a ser degradadas por el proteasoma y no interferir con la expresión del gen *Mat1a* específico de hígado sano y aumentar los niveles de SAM. Diseñado por HH.Vargas.

13. PERSPECTIVAS GENERALES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

- A. Evaluar el efecto de nuestro compuesto, IFC305, sobre la interacción de los ARNm de *Mat1a* y *Mat2a* con las proteínas AUF1 y HuR en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial cirrosis-CHC.
- B. Debido a que el nivel de regulación génica se da a varios niveles sin la necesidad de ser excluyentes uno del otro, una posible regulación epigenética de los genes *Mat1a* y *Mat2a* podría también estar participando en el proceso carcinogénico que se detona con la inducción de DEN en el modelo secuencial que se sigue en el laboratorio.
- C. Dado que a la RBP HuR, se le ha dado un peso importante en procesos carcinogénicos sería importante evaluar si en nuestro modelo puede estar modulando otro u otros genes que puedan explicar el efecto de recuperación del tejido a través de la administración del IFC305, por ejemplo Sirt1, Ciclina D, entre otros blancos posibles.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ham, A.W., and Cormack, D.H. (1985). Tratado de Histología, 8° edición, Editorial Iberoamericana.
2. Drucker, R. (2005). Fisiología Médica, Editorial Manual Moderno.
3. Robbins. Pathologic Basis of Disease, 6° edición, pagina 854-861
4. Chagoya-de-Sánchez, V., Suárez, J.A., and Hernández-Muñoz, R. (2005). Investigación y desarrollo de un fármaco para el tratamiento de la cirrosis. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 8, 106-114.
5. Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, L., and Loscalzo, J. (2009). Harrison Principios de Medicina Interna, 17° edición.

6. García Buey L, González Mateos F, Moreno-Otero R (2012), *Medicine, Cirrosis Hepática*; 11:625-633
7. Chagoya-de Sanchez, V., Suarez-Cuenca, J.A., and Hernandez-Munoz, R. (2007). Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *Gaceta medica de Mexico* 143, 44-50.
8. Thompson, K.J., McKillop, I.H., and Schrum, L.W. (2011). Targeting collagen expression in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 17, 2473-2481.
9. Asselah T et al (2209). Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut* 58 (6), 846-858.
10. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures* (2013). Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2013.
11. American Joint Committee on Cancer. Liver. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed (2010). New York, NY Springer 191-195
12. Forner A, Ayuso C, Real M, Sastre J, Robles R, Sangro B, Varela M, De la Mata M, Buti M, Martí-Bonmetí L, Bru C, Taberner J, Llovet J y Bruix J. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. *Med Clin Barc* (2009);132(7):272–287
13. Lu SC y Mato JM, *S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer*; *Physiol Rev* 92: (2012) 1515-1542.
14. Mato J, Corrales F, Lu S, Avila M; *S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function*; *FASEB J* (2002) 16, 15-26
15. Martinez -Lopez N, Varela-Rey M, Ariz U, Embade N, Vazquez -Chantada M, Fernandez-Ramos D, Gómez-Santos L, Lu S, Mato J, Martinez -Chantar M; *S-adenosylmethionine and proliferation:new pathways, new targets*; *Biochem.Soc.Tran* (2008) 36, 848-852.
16. Cantoni G; *Biochemical methylations: selected aspects*; *Annu. Rev. Biochemical* (1975) 44; 435-441.
17. Ramani K, Heping Y, Kuhlenkamp J, Tomasi L, Tsukamoto H, Mato J, Shelly L; *Changes in the Expression of Methionine Adenosyltransferase Genes and S-Adenosylmethionine Homeostasis During Hepatic Stellate Cell Activation*; *Hepatology*, (2010) Vol.51, 3;
18. Finkelstein D; *Methionine metabolism in mammals*; *J. Nutr.Biochem* (1990) 1; 228-236.
19. Bydlowski S, Magnanelli A, Chamone D, (1998). *Arq. Bras. Cardiol* vol. 71 (1). Sao Paulo.
20. Chagoya de Sánchez V, Hernández Muñoz L, Vidrio S, Yáñez L, Suarez J; *Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosilhomocysteine, Adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; posible physiological significance in phospholipid methylation*; *Int. J. Biochem* (1991) Vol 23, No. 12, pp.1439-1443

21. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA; *S-adenosyl methionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications*, Pharmacol Ther (1997) 73:265-280.
22. Cabrero C, Duce AM, Ortiz P, Alemany S, Mato J; *Specific loss of the high-molecular weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis*; Hepatology (1988) 8:1530-1534.
23. Frau M, Tomasi M, Simile M, Demartis M, Salis F, Latte G, Calvisi D, Seddaiu M, Daino L, Feo C, Brozzetti S, Solinas G, Yamashita S, Ushijima T, Feo F y Pascale R; *Role of Transcriptional and Post-transcriptional regulation of Methionine Adenosyltransferases in liver Cancer Progression*; Hepatology (2012), 165-175
24. Wang W, Fan J, Yang X, Fûrer-Galban S, Lòpez de Silanes I, von Kobbe C, Guo J, Georas SN, Foufelle F, Hardie DG, Careling D, Gorospe M; *AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR*; Moll Cell Biol 2002; 22:3425-3436.
25. Martínez-Chantar M, Vázquez-Chantada M, Garnacho M, Latasa M, Varela-Rey M, Dotor J, Santamaria M, Martínez-Cruz L, Parada L, Lu S, Mato J; *S-adenosyl methionine Regulates Cytoplasmic HuR Via AMP-Activated Kinase*, Gastroenterology (2006) Vol.131.
26. Latasa MU, Boukaba A, García-Trevijano ER, Torres L, Rodríguez JL, Caballería J, Lu SC, Lòpez-Rodas G, Franco L, Mato JM, Avila MA; *Hepatocyte growth factor induces MAT2A expression and histone acetylation in rat hepatocytes: role in liver regeneration*; FASEB J (2001), 15:1248-1250
27. Lu S, *Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies*; FASEB J (1999) 13, 1169-1183.
28. Cai J, Sun W, Hwang J, Stain S, Lu S; *Changes in S-adenosylmethionine synthetase in human liver cancer: molecular characterization and significance*, Hepatology (1996) 24:1090-1097.
29. Srikantan S and Gorospe M (2012), *HuR function in disease*, Front Biosci Landmark ed, January 1, 17: 189-205
30. Beltrán-Ramírez O, Sokol S, Le-Berre V, François JM, Villa-Treviño S, *An approach to the study of gene expression in hepatocarcinogenesis initiation*, Transl Oncol (2010) Apr;3(2):142-8
31. Baou M, Norton J, Murphy J, *AU-rich RNA binding proteins in hematopoiesis and leukemogenesis*, Blood (2011), 118(22):5732-5740.
32. Vázquez-Chantada M, Fernández-Ramos D, Embade N, Martínez-Lopez N, Varela-Rey M, Woodhoo A, Luka Z, Wagner C, Anglim P, Finnell R, Caballería J, Laird-Offringa I, Gorospe M, Lu SC, Mato JM y Martínez-Chantar ML; *HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed*

during liver proliferation, proliferation and carcinogenesis; *Gastroenterology* (2010) 5, 1943–1953.

33. Garcia-Sainz, J.A., Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1980). Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochemical pharmacology* 29, 1709-1714.
34. Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Diaz Munoz, M., Adolfo, J., Garcia-Sainz, J.A., and Chagoya de Sanchez, V. (1984). Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical pharmacology* 33, 2599-2604.
35. Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., Garcia-Sainz, J.A., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1978). On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Archives of biochemistry and biophysics* 190, 155-162.
36. Perez-Carreón, J.I., Martínez-Pérez, L., Loredó, M.L., Yañez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J.A., *et al.* (2010). An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl₄-induced rat cirrhosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 287-296
37. Pérez-Carreón JI, López-García C, Fattel-Fazenda S, Arce-Popoca E, Alemán-Lazarini L, Hernández-García S, Le Berre V, Sokol S, Francois JM, Villa-Treviño S. *Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats*, *Neoplasia* (2006) May;8(5):373-83.
38. Moradpour D, Blum HE, *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. (2005), *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17:477-483.
39. Thorgeirsson SS, Grisham, *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma* (2002), *Nat Genet* 31:339-346.
40. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, *et al*, *Gene expression patterns in human liver cancers* (2002), *Mol Biol Cell* 13:1929-1939.
41. Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D, *Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma* (2002), *Oncogene* 21:2926-2937.
42. Goldenberg D, Ayes S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid Y, Fellig Y, Dadon T, Ariel I, de Groot N *et al*, *Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays* (2002), *Mol Carcinog* 33:113-124.

43. Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y, *Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression* (2001), *Cancer Res* 61:2129-2137.
44. Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K, *Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays* (2001), *Hepatology* 33:832-840.
45. Xu L, Hui L, Wang S, Gong J, Jin Y, Wang Y, Ji Y, Wu X, Han Z, Hu G, *Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma* (2001), *Cancer Res* 61:3176-3181.
46. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J et al, *Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver* (2001), *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15089-15094.
47. Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, et al (2005), *Gefitinib an EGFR inhibitor prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis*, *Hepatology* 41,307-314.
48. Bradford MM, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding* (1976), *Anal Biochem* 72:248-254.
49. Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4* (1970) *Nature* 227:680-685.
50. Livak KJ, Schmittgen TD, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) Method* (2001), *Methods* 25:402-408.
51. Recillas-Targa Félix, *Interdependency Between Genetic and Epigenetic Regulatory Defects in Cancer* (2014), *Cancer Cell Signaling: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1165, 33-52.
52. Rodríguez-Aguilera JR, *Estudio de las modificaciones epigenéticas durante la cirrosis experimental y su reversión por el hepatoprotector IFC305*, Tesis en revisión, 2014, Instituto de Fisiología Celular, UNAM
53. She Q, Nagao I, Hayakawa T, Tsuge H; *A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver* (1994); *Biochemical and Biophysical Research Communications* 205; 1748-1754.
54. Zuñiga-Noriega A, Del Roble Velazco-Campos A, Aguirre-Rodríguez A, Martínez-de Villareal, Garza-González B, Maldonado-Garza C, Bosques Padilla D; *Polimorfismo C677T del gen*

- MTHFR y el riesgo del desarrollo de cáncer gástrico distal en una población mexicana (2007);*
Revista Gastroenterología Mexicana 72: 4, páginas 355-358.
55. Chagoya de Sanchez V, Hernandez Munoz R and Diaz Munoz M, *Circadian variations of adenosine level in blood and liver and its possible physiological significance*, Life Sciences, vol. 33, no. 11, pp. 1057–1064, 1983.
 56. Chagoya de Sanchez V, *Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms?*, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 73, no. 3, pp. 339–355, 1995.
 57. Chagoya de Sanchez V, Brunner A, Piña E, *In vivo modification of the energy charge in the liver cell*, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 46, no. 3, pp. 1441– 1445, 1972.
 58. Chagoya de Sanchez V, Brunner A and Sanchez M. E, *Utilization of adenosine as a tool in studies on the regulation of liver glycogen biosynthesis*, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 160, no. 1, pp. 145–150, 1974.
 59. Chagoya de Sanchez, P. A. Grau, and B. Jimenez, “Regulation of fatty acid oxidation by adenosine at the level of its extra mitochondrial activation,” Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 76, no. 3, pp. 804–812, 1977.
 60. Chagoya de Sanchez and Piña E, *The redox state of NAD⁺/NADH systems in rat liver during in vivo inhibition of fatty acid oxidation by adenosine*, FEBS Letters, vol. 83, no. 2, pp. 321–324, 1977.