



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación Metabólica de la biosíntesis de S-adenosilmetionina en un modelo de Carcinoma Hepatocelular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. 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

Ciudad de México. Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 de los proyectos auspiciados por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM** y el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**.

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES, por su esfuerzo, ejemplo, apoyo, dedicación y motivación cada uno de los días de mi vida. Sin ustedes, este camino trazado hubiera sido totalmente distinto. Gracias a ustedes que me ayudaron en cada adversidad pero sobre todo gracias por siempre creer en mí, aun cuando yo misma pude dejar de creer por breves instantes.

Mamá, papá, ustedes son mis grandes pilares de vida. Gracias por ser la guía y el soporte en cada tormenta y gracias absolutas por compartir cada una de mis alegrías, gracias por su tiempo, gracias por las risas compartidas. Nunca me cansaré de darles gracias. Los amo con todo mi corazón. **GRACIAS**.

DRA VICTORIA CHAGOYA, gracias por compartir su amplia experiencia conmigo y por dejarme ser parte de su grupo de trabajo del laboratorio 305-SUR. Siempre recordaré con mucho cariño el primer día que llegué a su laboratorio y lo primero que me mostró en su computador fue la Adenosina. Y a partir de ahí la historia empezó a escribirse. **GRACIAS**.

Dra. Gabriela Velasco, Dra. Mariana Domínguez y Dr. Enrique Chávez muchas gracias por todo el apoyo académico durante mi estancia en el laboratorio.

Dr. Emilio Rojas del Castillo y Dr. Luis Vaca Domínguez, gracias por ser parte de mi comité tutorial durante tantos años y aun así siempre tener ideas nuevas, preguntas retadoras pero sobre todo muchas gracias por su guía y útiles consejos.

Dra. Mahara Valverde Ramírez, Dr. Rodrigo González Barrios de la Parra, Dr. Julio Pérez Carreón, Dra. Ana María Salazar Martínez, Dra. Marina Macías Silva, muchas gracias por su tiempo, disposición y por todas las observaciones hechas para que este trabajo plasmado en estas páginas se enriqueciera cada vez más.

Gracias a mi alma máter, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, al Instituto de Fisiología Celular, al Laboratorio 305 edificio Sur, por abrirme las puertas, por acogerme en sus instalaciones, pero sobre todo por darme el gran honor de ser parte de la UNAM desde hace ya varios años.

A la unidad de Histología, a la unidad de Microscopía electrónica y al Bioterio del Instituto de Fisiología Celular por toda la ayuda recibida durante mi estancia en el Instituto. Gracias a cada uno de los miembros que ahí laboran porque son ellos quienes cada día ayudan a todos los estudiantes.

Y aunque muchas veces no son valoradas, muchas gracias a todas esas ratitas (unidades de experimentación, verdad Rusbel) que me ayudaron sin pedirlo y sin saberlo a la realización de este arduo pero muy gratificante proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Gabi, Mariana, Enrique, Rusbel, Amairani, Lidia (QEPD), Susy (QEPD), Marisol, Lucí, Brenda, Jessy, Adrián, Rebe, Nuria, Jesús, Señora Xóchitl y al Señor Jesús por hacer de mi estancia una experiencia inolvidable.

A mis amigos Enrique, Rus, Amairani y Dani por todas y cada una de las veces que nos reímos a carcajadas, que lloramos al contar nuestras desdichas, que compartimos los alimentos, que jugamos como si fuéramos niños. Amigos...gracias, sin ustedes jamás hubiera sido lo mismo estar en el laboratorio 305 Sur.

Mención especial a ti **AMIGO (ENRIQUE), GRACIAS** por ser mi cómplice, mi mano derecha, mi paño de lágrimas, mi compañero de viaje y aventuras. Gracias por ser tú el que siempre me guío, por ser él que siempre tuvo tiempo para resolver dudas, para hacer experimentos de última hora, por estar hombro a hombro en cada momento, por ser un gran maestro y un ejemplo a seguir. Gracias por ser mi amigo en toda la extensión de la palabra, gracias por tu paciencia, por todos tus consejos, porque sin ti las cosas jamás hubieran sido lo que son ahora.

Gracias por llegar a mi vida, por quedarte en ella. Te quiero amigo. Gracias.

Gracias a todas las personas que durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular me hicieron crecer como profesional, como persona, como ser humano y como mujer. Gracias por ser pieza importante en mi historia de vida.

Gracias a la persona que todos los días veo en el espejo y que me repite: ¡Sí se puede!, ¡No te rindas!, ¡Falta poco!.

En estas páginas se llega a la culminación de un hermoso capítulo de vida, de muchas lecciones aprendidas, de un escalón que parecía tan lejos de llegar pero que por fin estoy en él. En estas páginas además de quedar plasmado todos los conocimientos teóricos sobre este gran proyecto, también están repletas de muchos sueños, de ideas, de risas, de aventuras pero sobre todo de mucha felicidad y amor que he tenido la fortuna de compartir con mi familia y con personas fantásticas a lo largo de mi vida. Se cierra un ciclo pero se abren las puertas y ventanas de un mundo listo para ser descubierto, y yo estaré ahí.

1	Abreviaturas.....	10
2.	Resumen	15
3.	Abstract.....	17
4.	Introducción.....	20
4.1	El hígado: funciones y estructura.....	20
4.2	Cirrosis.....	22
4.3	Carcinoma Hepatocelular.....	23
4.3.1	Aspectos Generales.....	23
4.4	S-adenosilmetionina (SAM)	24
4.4.1	Síntesis de SAM.....	25
4.4.2	Genes metionina adenosiltransferasa.....	28
4.4.3	Afectaciones hepática por la deficiencia de SAM	29
4.4.4	Tratamiento con SAM exógena.....	30
4.5	Proteínas de unión a RNA (RBP) en relación con el daño hepático en HCC.....	31
4.5.1	HuR, proteína de unión a RNA: funciones, implicaciones en cáncer y regulación.....	32
4.5.2	AUF1, proteína de unión a RNA: funciones, implicaciones en cáncer y regulación.....	32
4.6	Papel de la Sirtuína 1 en el proceso de hepatocarcinogenesis.....	36
4.7	Nitrosaminas, carcinógenos químicos.....	37
4.7.1	Estructura y función.....	37
4.7.2	Mecanismo de acción: carcinogenicidad.....	38
5.	Antecedentes Directos	42
6.	Planteamiento del Problema.....	45
7.	Hipótesis.....	47
8.	Objetivo General.....	47

9.	Objetivos Particulares.....	47
10.	Procedimiento Experimental.....	50
10.1	Sustancias químicas principales.....	50
10.2	Manejo de animales. Modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.....	50
10.3	Fraccionamiento nuclear y citosólico.....	51
10.4	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	52
10.5	Western blot.....	53
10.6	Inmunohistoquímica de las proteínas MAT.....	56
10.7	Aislamiento de RNA.....	57
10.8	Análisis de expresión génica por RT-PCR.....	58
10.9	Determinación de Acetil-CoA, Ácido 3-hidroxi-butirico y acetoacetato.....	61
10.10	Determinación de Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG).....	61
10.11	Determinación colorimétrica de Lipoperoxidación.....	62
10.12	Aislamiento de mitocondrias.....	62
10.13	Análisis estadístico.....	62
11.	Resultados.....	64
11.1	Análisis inmunohistoquímico de las proteínas MAT.....	65
11.2	Efecto del IFC305 sobre el nivel de RNAm de los genes <i>HuR</i> y <i>AUF1</i>	68
11.3	Determinación del estrés oxidativo a través de lipoperoxidación y contenido de glutación en un modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.....	70
11.4	Efecto del IFC305 en la expresión del gen <i>Sms</i> en la hepatocarcinogenesis.....	75
11.5	El hepatoprotector IFC305, incrementa los niveles de Acetil-CoA e Histona H4 hiperacetilada (H4ac) en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.....	77
11.6	Efecto del IFC305 en los niveles de NAD ⁺ /NADH.....	79
11.7	Efecto del IFC305 sobre la expresión del gen <i>Sirt1</i>	80
12.	Discusión de Resultados.....	84
13.	Conclusiones.....	93

14.	Perspectivas.....	95
15.	Bibliografía.....	97
16.	Anexo I	108

1 ABREVIATURAS

DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por adenosina monofosfato
APS	Persulfato de amonio
AREs	Elementos ricos en adenina y uracilo
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
HCC	Carcinoma 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	Glutación reducido

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>	Gen Metionina adenosiltransferasa 1A
<i>Mat2a</i>	Gen Metionina adenosiltransferasa 2A
MT	Enzima metiltransferasa
PKC	Proteína cinasa C
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPs	Proteínas fosfatasas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Glu	Código de tres letras 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

RESUMEN

2. RESUMEN

La cirrosis y el Carcinoma Hepatocelular (HCC) representan una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Durante el desarrollo de estas patologías se presenta una fibrosis severa progresando hasta un eventual estado de cirrosis y en el 80% de los casos clínicos hasta HCC. Una de las múltiples alteraciones metabólicas que se presentan en el hígado dañado, es la desregulación en el ciclo de metionina, el cual tiene como principal producto la formación de S-adenosilmetionina (SAM).

SAM es una molécula pleiotrópica, la cual está involucrada en diversos procesos, entre los que destacan reacciones de metilación, síntesis de poliaminas y reacciones de transulfuración. SAM es sintetizado en el compartimento citosólico de todas las células de mamíferos preferentemente en hepatocitos maduros y colangiocitos a partir de metionina y ATP mediante la catálisis de las enzimas Metionina adenosiltransferasa (MAT). Durante la cirrosis y HCC, se presenta un patrón aberrante en la expresión de las proteínas MAT, bajo regulando MAT1A y una sobre regulando MAT2A.

Datos obtenidos previamente en un modelo experimental de daño crónico inducido con DEN, demostraron el efecto del IFC305 sobre el patrón aberrante de expresión de los genes *Mat1a:Mat2a* mediante western blot, incrementó en el nivel de SAM evaluado mediante HPLC, además de un incremento en el índice de metilación (SAM/SAH), modulación núcleo-citoplasma de las HuR y AUF1, proteínas de unión a RNA, a través de análisis inmunohistoquímicos y expresión de cada uno de los genes, e incremento en el nivel de ATP evaluado mediante HPLC.

Debido a la importancia de SAM como molécula pleiotrópica y al metabolismo de metionina y su implicación en múltiples vías de señalización, se plantea en este trabajo evaluar el efecto del IFC305 en la modulación del cambio de las proteínas *Mat1a:Mat2a* y sus diferentes impactos metabólicos. Así entonces nuestra hipótesis establece que el IFC305 normalizará el patrón aberrante de las proteínas

Mat1a:Mat2a a través de la función reguladora de las proteínas HuR y AUF1. Promoviendo un alto nivel de SAM, una reducción en la síntesis de poliaminas y una recuperación del nivel de GSH.

Para evaluar la hipótesis planteada se analizó un modelo secuencial de cirrosis y HCC, en donde se evaluó la presencia de las proteínas MAT evaluado en cortes histológicos de los diferentes grupos experimentales, la expresión de los genes *HuR*, *Auf1* y *Sms*, medidos por qPCR, el nivel de glutatión en su forma reducida y oxidada medido un análisis fluorométrico, el nivel de lipoperoxidación general de la célula medido por una determinación colorimétrica de las especies reactivas d ácido tiobarbiturico (TBARS), el nivel de Acetil-CoA disponible y el potencial de óxido-reducción mediante la relación $NAD^+/NADH$ mitocondrial, mediante Kits comerciales, respectivamente.

Los resultados obtenidos demostraron que el IFC305 normalizó la presencia de las proteínas MAT, redujo la expresión de los genes *HuR*, *Auf1* y *Sms* en los grupos experimentales de HCC, recuperó el nivel de glutatión total y disminuyó el estrés oxidante de la célula, además de recuperar el nivel de Acetil-CoA en cada uno de los grupos experimentales analizados.

Así entonces, el IFC305 podría actuar en diversos puntos clave del metabolismo de SAM y debido a la alta incidencia de los trastornos hepáticos a nivel mundial y la inexistencia de algún tipo de tratamiento, el IFC305 podría representar una alternativa clínica efectiva.

3. ABSTRACT

Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma (HCC) represent an important cause of morbidity and mortality worldwide. During the development of these pathologies, severe fibrosis occurs, progressing to an eventual state of cirrhosis and in 80% of clinical cases to HCC. One of the many metabolic alterations that occurs in the liver damaged is the dysregulation of the methionine cycle, whose main product is the synthesis of S-adenosylmethionine (SAM).

SAM is a pleiotropic molecule, which is involved in various processes, including transmethylation reactions, polyamine pathway and the biosynthesis of glutathione (GSH). SAM biosynthesis from methionine and ATP, take place in the cytosolic of all mammalian cells preferably in hepatocytes and cholangiocytes, by catalysis of the methionine adenosyltransferases (MAT). However, in liver damage, there is a MAT protein switch expression that favors MAT2A and decreases MAT1A, affecting the level of SAM.

Previous results in an experimental model of chronic liver damage induced with DEN, demonstrated that the IFC305 treatment increased *Mat1a* and decrease *Mat2a* gen level, increased the SAM hepatic level, restoring the transmethylation reaction by the methylation index (SAM / SAH) evaluation, recovered the nucleus-cytoplasm localization of HuR and AUF1, RNA-binding proteins, and increase the ATP level modified by DEN intoxication.

Due to the importance of SAM, and the methionine cycle, the aim of this work was to test whether this chemo-preventive effect of IFC305 is mediated by modulation of Mat1a: Mat2a switch proteins and its different metabolic impacts. Thus, our hypothesis establishes that IFC305 will normalize the aberrant pattern of Mat1a: Mat2a proteins through the regulatory function of HuR and AUF1 proteins. Promoting a high SAM level, a reduction in the polyamine pathway and a recovery of the GSH level.

To evaluate the hypothesis was analyzed the MAT proteins expression in a histological sections of the different experimental groups, the *HuR*, *Auf1* and *Sms* genes expression, by qPCR, the glutathione level by a fluorometric analysis, the lipoperoxidation level by a colorimetric determination of reactive thiobarbituric acid species (TBARS), the Acetyl-CoA level and the oxide-reduction potential through the mitochondrial NAD⁺ / NADH ratio, using commercial kits, respectively.

The results showed that IFC305 treatment increased MAT1A and decrease MAT2A level, reduced the *HuR*, *Auf1* and *Sms* genes expression in the HCC groups, recovered the glutathione. Finally, the administration of IFC305 restored the epigenetic intermediaries, for example, NADH and Acetyl-CoA, modified by DEN intoxication.

In conclusion, IFC305 treatment favoring the recuperation of metabolic flow of methionine, which probably facilitated its HCC chemo-preventive effect. Therefore, this study supports IFC305 as a potential HCC treatment or as an adjuvant in chemotherapy.

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1 El hígado: funciones y estructura

El hígado de color pardo rojizo, 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 [2].

El hígado está compuesto por dos distintos tipos de células: parenquimatosas y no parenquimatosas [2]. El órgano contiene estructuras denominadas lobulillos hepáticos (Figura 1). El hepatocito, la célula mayoritaria del órgano, forma diversas columnas o tabernáculos que se ramifican interconectándose a través de sinusoides o capilares. El espacio sinusoide está formado por diversas células; células endoteliales del sinusoide, células macrofágicas de Kupffer, linfocitos, células perisinusoidales que las separan de la superficie del hepatocito y células estelares [3, 4] En el espacio sinusoide se lleva 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 [4, 5]. El espacio de Disse cuenta con diversos componentes como las fibras de reticulina, nervios, 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 (Figura 1) [6-8].

La unidad funcional del hígado es el acino hepático (Figura 1) [2]. 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 [9].

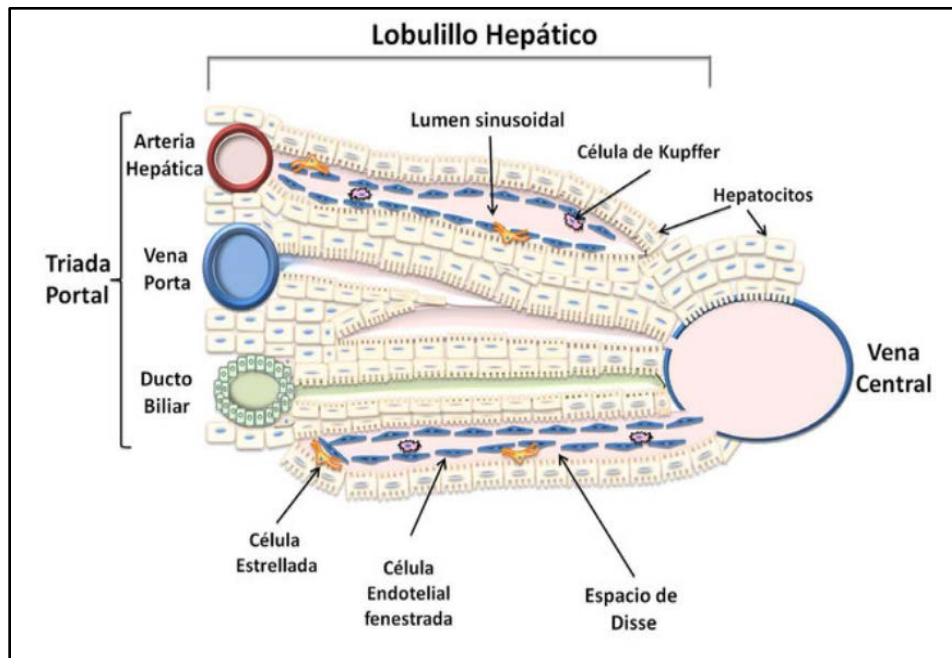


Figura. 1. Estructura bidimensional del lobulillo hepático. Los hepatocitos conforman el componente epitelial del hígado organizados en placas y entre ellos se localiza el sinusoides. El sinusoides está recubierto por células endoteliales del sinusoides que son fenestradas, el espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos corresponde al espacio de Disse. Las células de Kupffer se encuentran en el lumen sinusoidal, mientras que las células estelares se localizan en el espacio de Disse.

El hígado biotransforma una gran cantidad de endobióticos y xenobióticos, convirtiendo sustancias hidrofóbicas en productos hidrosolubles para que pueden excretarse en la bilis o en la orina. Debido a 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, 6, 10, 11]

El hígado puede presentar una amplia variedad de trastornos, algunos causados por el exceso en el consumo de alcohol o medicamentos, otros por infecciones con el virus de la hepatitis B, C, D (HBV, HCV y HDV), o trastornos metabólicos como diabetes, síndrome metabólico y obesidad. La consecuencia del daño crónico al hígado provoca patologías, principalmente, como cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC) [12, 13]

4.2 Cirrosis

La cirrosis se caracteriza por presentar fibrosis difusa con nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura lobulillar y vascular del tejido hepático (Figura 2) [14, 15]. Independientemente de la etiología de la cirrosis, se observa una disminución de la masa hepatocelular funcional, así como alteraciones en el flujo sanguíneo [5, 16]. 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), entre los que predomina la colágena tipo I (Figura 2) [5, 17, 18].

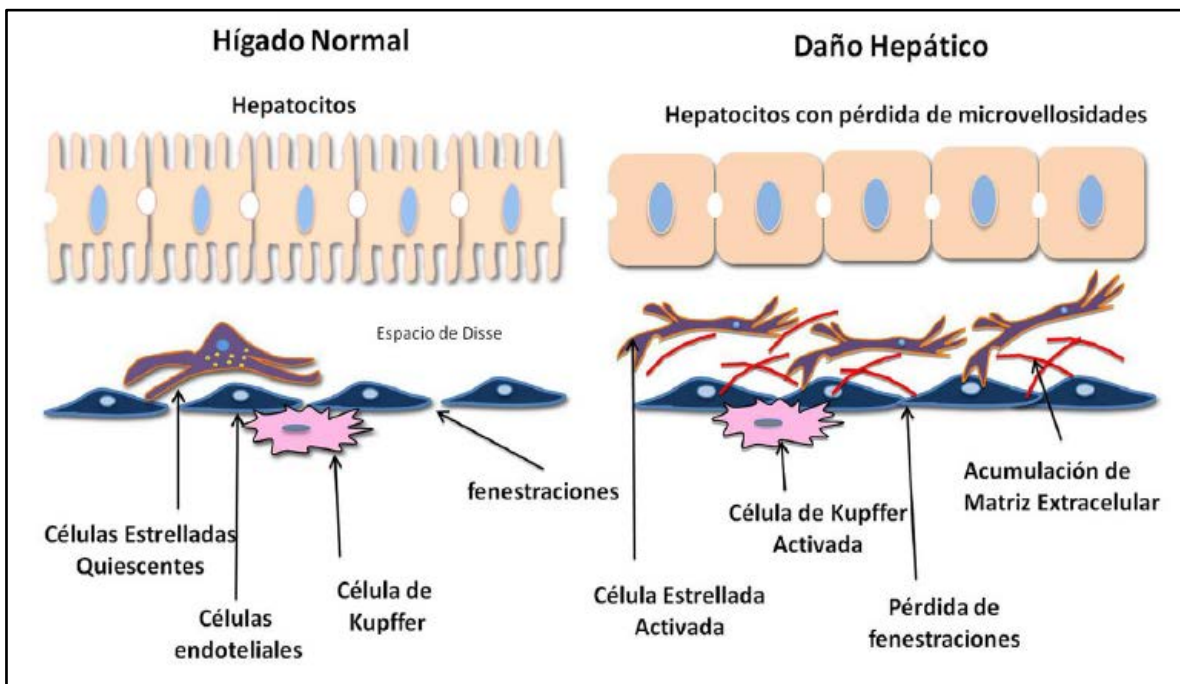


Figura. 2. Gráfico comparativo del sinusoide hepático en el hígado normal y en condiciones de daño.

La cirrosis puede ser producida por diferentes causas, entre ellas se enlistan algunas [19-21], por ejemplo:

*Metabólica-tóxica: ingesta excesiva de alcohol, enfermedad de hígado graso no alcohólico, intoxicación por sustancias como el arsénico, metotrexato, isoniazida, o amiodarona, por mencionar algunos.

*Autoinmune: Hepatitis autoinmune, cirrosis primaria biliar, colangitis autoinmune, cirrosis por enfermedad de Wilson.

*Genético-hereditaria: Hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Wilson, galactosemia, tirosinemia, fibrosis quística.

*Enfermedades biliares: cirrosis biliar secundaria, colangitis esclerosante primaria, colangiopatía isquémica, atresia de vías biliares, síndrome de Alagille.

*Enfermedades vasculares: insuficiencia cardiaca crónica derecha (fibrosis cardiaca), pericarditis constructiva crónica, entre otras.

Las manifestaciones clínicas de la cirrosis son resultado de cambios patológicos y reflejan la gravedad de la hepatopatía. Los pacientes cirróticos que han desarrollado complicaciones y que se han descompensado deben ser considerados para un trasplante hepático [15, 16]. Las personas con cirrosis tienen un riesgo aumentado de HCC, ya que un 80% de los casos de las personas que padecen cáncer de hígado, además presentan cirrosis [5, 22].

4.3 Carcinoma Hepatocelular

4.3.1 Aspectos generales

La incidencia del cáncer de hígado afecta de forma diferente a hombres y a mujeres. En varones constituye la tercera causa de mortalidad, sólo después del cáncer de pulmón y estómago. Mientras que en las mujeres representa la sexta causa de mortalidad [23, 24].

Este tipo de neoplasia solamente tiene un 7% de tasa de supervivencia a cinco años. Su incidencia varía significativamente entre las distintas regiones geográficas, como entre los diferentes grupos étnicos y raciales [25-27].

El HCC, también llamado hepatocarcinoma, es el tumor primario de hígado más común en adultos. Alrededor del 90% de las neoplasias originadas en el hígado son de este tipo [28-30]. Además es un tipo de cáncer de difícil detección en sus

primeras etapas, por ello, hasta que los tumores no alcanzan un tamaño considerable es posible observarlos en algún examen diagnóstico [31].

El cáncer de hígado se desarrolla como consecuencia de algunas enfermedades hepáticas tales como esteatosis hepática, Esteatohepatitis y cirrosis (Figura 3).

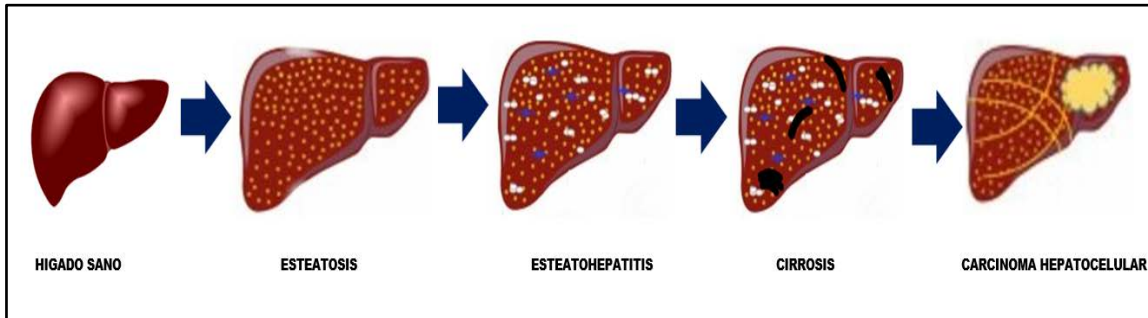


Figura. 3. Representación gráfica de la evolución del daño hepático. Sin embargo, puede ocurrir la presencia de carcinoma hepatocelular sin necesidad de presentar un estadio de daño previo.

Dado que el HCC 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 DNA. El resultado final es la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que acompañado de inestabilidad genómica, sobreexpresión de factores de crecimiento y pro angiogénicos, producen alteraciones en las vías de señalización y el microambiente del hígado, caracterizado por la heterogeneidad del HCC [32, 33]. Durante el proceso de hepatocarcinogenesis, 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 [34-36].

4.4 S-adenosilmetionina (SAM)

Desde que Cantoni en 1953 describió por primera vez la importancia de SAM, se ha obtenido evidencia considerable indicando el papel fundamental que juega SAM en

la biología del hígado [37]. Sin embargo, evidencia reciente la colocan como una molécula pleiotrópica la cual juega un papel principal en procesos como crecimiento y muerte celular, además de ser considerada el principal donador fisiológico de grupos metilo [38-40] . Aunque SAM es sintetizado en todas las células de mamíferos, el contenido anormal de SAM se ha asociado al desarrollo de enfermedades hepáticas principalmente, tanto en humanos como en animales, lo que ha llevado a examinar nuevas alternativas terapéuticas en modelos experimentales y en pacientes con enfermedad hepáticas [41-43].

4.4.1 Síntesis de SAM

El hígado puede ser considerado como el principal productor de SAM, puesto que aproximadamente el 85% de las reacciones de transmetilación y el 50% del metabolismo de metionina ocurren en este órgano [44, 45] La 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 4) [46-50].

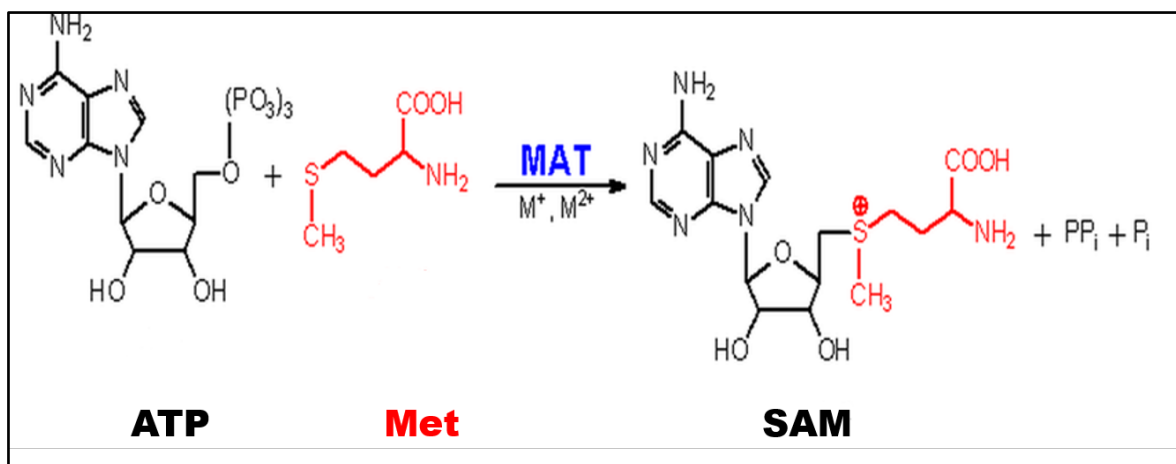


Figura. 4. Representación gráfica de la reacción catalizada por las enzimas Metionina Adenosiltransferasa (MAT). La enzima MAT lleva a cabo la biosíntesis de SAM a partir de ATP y metionina (L-Met).

SAM es la unión para tres vías metabólicas clave: síntesis de poliaminas, trans-metilación y trans-sulfuración (Figura 5). En condiciones fisiológicas en un hígado sano, 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 las enzimas Metiltransferasas provocando que SAM sea convertido a S-adenosilhomocisteína (SAH) [49, 51-54]. 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, y lípidos. 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 [55-59].

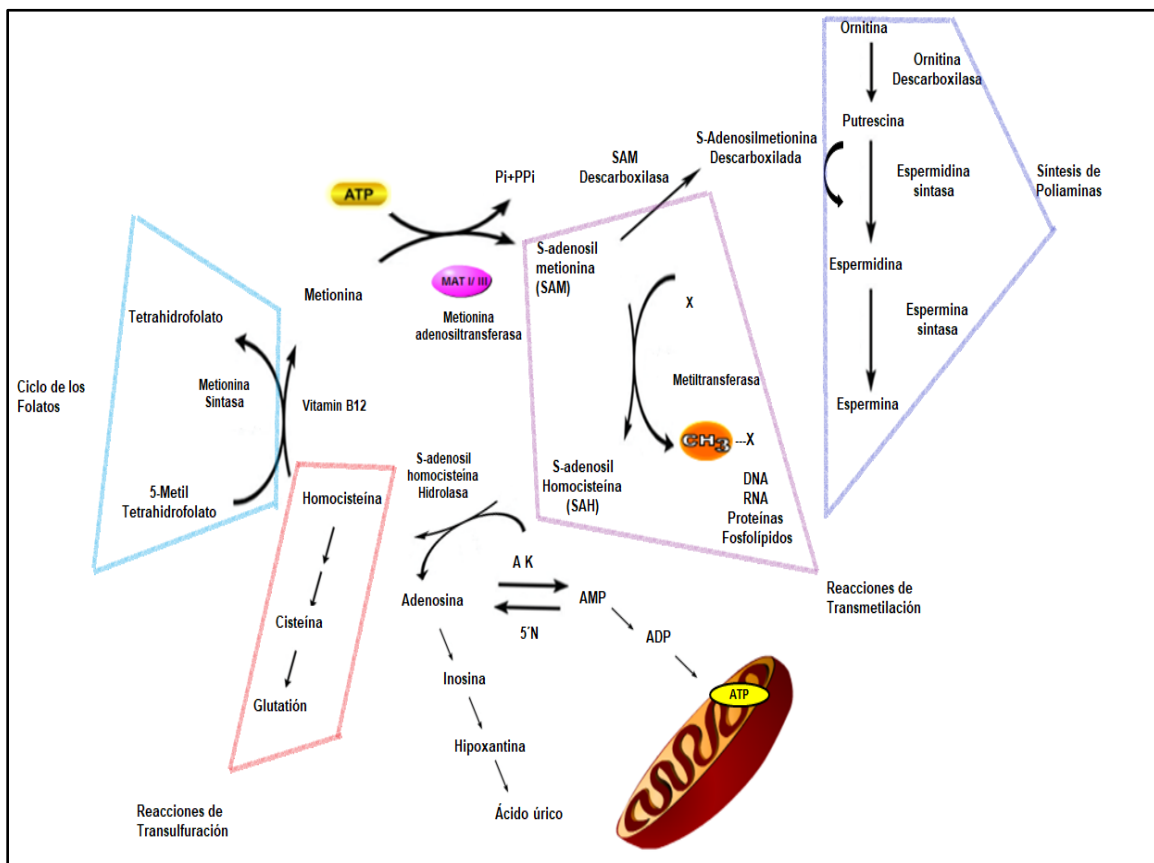


Figura. 5. Metabolismo de la metionina.

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 una disminución en esta relación se puede predecir una reducida capacidad de metilación en la célula [59-61]

El contenido celular de SAH es regulado por la enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH), la cual rompe irreversiblemente 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 (Figura 5) [62-64]

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 [62, 65]. 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 [66-68]

La enzima MS cataliza la remetilación de homocisteína con requerimientos de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), el cual es un derivado del 5,10-metilentetrahydrofolato (5,10-MTHF) en una reacción catalizada por la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR). 5-MTHF es convertido 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 [68-70].

A su vez, una disminución en el nivel de folato plasmático tiene repercusiones tanto en la síntesis y reparación del DNA, como a nivel epigenético ocasionando una hipometilación global de DNA, éste último se ha asociado con la activación de oncogenes y con la pérdida de supresores de tumores.

Por otra parte SAM, esta críticamente involucrada en la síntesis de poliaminas; moléculas de bajo peso molecular que son ubicuas en todas las células, como lo son la espermidina (SPD) y espermina (SPM) [71, 72] La biosíntesis de poliaminas juega un papel crucial en muchos procesos bioquímicos, incluyendo el crecimiento celular y la apoptosis. Durante la biosíntesis de poliaminas, SAM es descarboxilada, 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 [37, 73, 74].

4.4.2 Metionina Adenosiltransferasa

Así entonces en mamíferos, hay 3 enzimas diferentes que pueden llevar a cabo la síntesis de SAM: MATI, MATII y MATIII. MATI y MATIII son los productos del gen *Mat1a*, mientras que MATII es el producto del gen *Mat2a*. La subunidad $\alpha 1$ se encuentra dispuesta en dos isoenzimas de MAT III (dímero) y MAT I (tetrámero), mientras que la subunidad $\alpha 2$ se ve únicamente favorecida en tetrámeros (Figura 6) [75, 76]. Además, las células de mamíferos también expresan un tercer gen, *Mat2b*, el cual codifica para la subunidad β que regula la actividad de MAT II [77]. *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. En adultos, *Mat1a* se expresa exclusivamente en el hígado y el páncreas, mientras que *Mat2a* se expresa en todos los tejidos extra hepáticos [78-80].

Sin embargo, en el hígado fetal de la rata, la expresión de la proteína MAT1A incrementa progresivamente desde el día 20 de la gestación, aumentando 10 veces inmediatamente después del nacimiento, y finalmente alcanza un máximo en su expresión a los 10 días de edad, aunque en la edad adulta decrece ligeramente. Contrariamente, la expresión de la proteína MAT2A disminuye drásticamente

después del nacimiento hasta alcanzar un mínimo en el hígado adulto (aproximadamente el 5% de la expresión de MAT1A) [80-82].

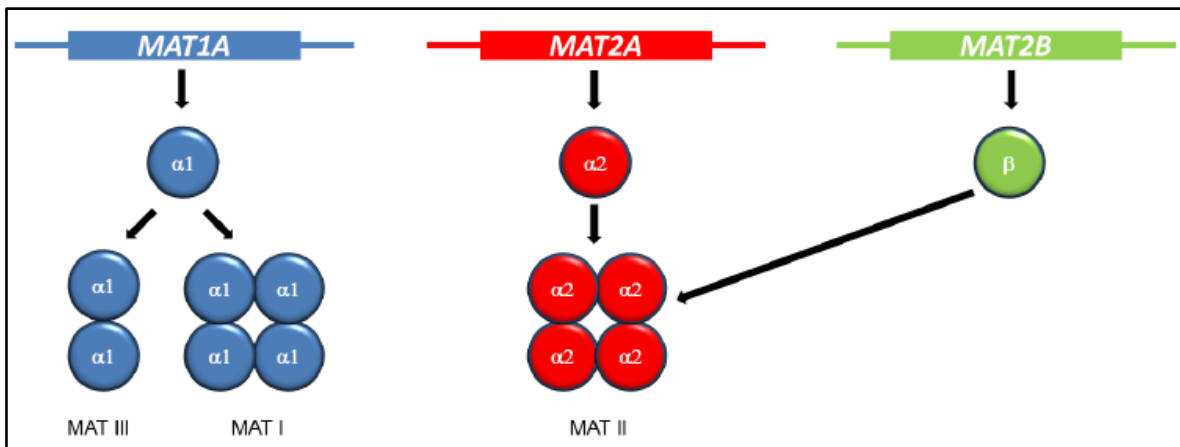


Figura 6. Representación gráfica de la metionina adenosiltransferasa. La subunidad $\alpha 1$ codificada por el gen *Mat1a* se encuentra dispuesta en dos isoenzimas de MAT III (dímero) y MAT I (tetramero), mientras que la subunidad $\alpha 2$ codificada por el gen *Mat2a* se ve únicamente favorecida en tetrameros. Mientras que la subunidad β está codificado en el gen *Mat2 β* , y regula únicamente a la subunidad $\alpha 2$.

Debido a diferencias en las propiedades cinéticas y reguladoras de las diversas MAT, MATII no puede mantener los mismos valores elevados de SAM que la combinación MATI y MATIII. Está última, 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) [83, 84]. SAM inhibe muy fuertemente a MAT II (IC_{50} 60 μM), mientras la inhibición hacia MAT I es mínima (IC_{50} de 400 μM) presentándose una estimulación por parte de SAM hacia MAT III. Dadas las diferencias en las propiedades cinéticas y regulatorias, el tipo de isoenzima de MAT expresada en tiempo y tejido específico influye en el nivel de SAM disponibles para la célula [85, 86].

4.4.3 Afectación hepática por la deficiencia de SAM

Diversos estudios nutricionales [87, 88] han demostrado que una dieta deficiente en grupos metilo es consecuencia de una reducción en el contenido hepático de SAM, un incremento en la concentración de SAH, y una elevación de los valores

plasmáticos de homocisteína (Hcy). También se ha descrito que en ratones *knockout* para MAT1A (MAT1A-KO), a pesar de producirse un incremento en la expresión de MAT2A, el contenido hepático de SAM se encuentra reducido unas 3 veces desde el nacimiento, cuando en los animales normales se produce el cambio de expresión de MAT2A a MAT1A [50, 53, 89].

Asimismo, se sabe bien que cuando se presenta una ausencia crónica de grupos metilo en ratas y ratones, el hígado desarrolla esteatosis en un lapso de 18 días. Y si el daño continúa, se desarrolla esteatohepatitis no alcohólica (NASH), fibrosis hepática y cirrosis, y muchos animales pueden desarrollar HCC. Experimentos de genómica y proteómica, en los que se ha empleado muestras de hígado de ratones MAT1A-KO, indican que SAM regula la expresión de un grupo de genes amplio y diverso, mucho antes de que sea evidente la lesión hepática [47, 50].

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la deficiencia en SAM induce a la aparición de daño hepático y cáncer mediante la perturbación de múltiples rutas en el hepatocito. Mientras que, las implicaciones clínicas de estas observaciones son obvias, ya que todos los pacientes cirróticos examinados, con independencia de su etiología, presentan una marcada reducción en la síntesis hepática de SAM [63, 68, 85].

4.4.4 Tratamiento con SAM exógena

La importancia que tiene el metabolismo de metionina y el de SAM, en particular, en la fisiología hepática, además de la evidencia acumulada en la que se asocia la deficiencia en la síntesis de SAM con la enfermedad hepática en modelos experimentales y en humanos, han conducido al estudio del efecto del tratamiento con SAM en una variedad de modelos animales de enfermedad hepática. Así, la administración de SAM a ratas alimentadas con alcohol se ha observado que reduce la disminución de los valores de GSH y el daño hepático [63, 90-92]. Asimismo, el tratamiento con SAM también reduce la fibrosis en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), así como los nódulos neoplásicos en modelos de HCC [41, 63, 70].

Es por ello que en el afán de una alternativa terapéutica, SAM comenzó a ser administrada por vía oral hace poco más de 20 años, sin embargo, esta molécula tiene poca biodisponibilidad, presumiblemente debido a su degradación en el tracto gastrointestinal y al rápido metabolismo hepático. Las concentraciones plasmáticas obtenidas por vía oral son dosis dependientes, con un máximo de 0.5-1 mg/l alcanzados 3-5 h después de la administración de una única dosis de entre 400 a 1,000 mg de SAM. Mientras que SAM puede cruzar la barrera hematoencefálica y se acumula lentamente en el líquido cefalorraquídeo, el resto de SAM no metabolizado se elimina en la orina y las heces. Mientras que los efectos secundarios más comunes son náuseas y molestias gastrointestinales, que ocurren en menos del 15% de los individuos tratados [93, 94].

Como se mencionó previamente, durante las hepatopatías se lleva a cabo un switch de expresión de las proteínas MAT en donde se observa una baja regulación de la enzima MAT1A y una sobre regulación de MAT2A en relación a un hígado sano [86, 95]. Los mecanismos de baja regulación del gen *Mat1a* y sobre regulación de *Mat2a* podrían ocurrir tanto a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional, post-traduccional e inclusive regulación a nivel epigenético.

Una de las alternativas que explican el switch de expresión es la participación de las proteínas de unión a RNA (RBP por sus siglas en inglés, *RNA binding protein*).

4.5 Proteínas de unión a RNA (RBP) en relación con el daño hepático en HCC

Como se mostró previamente, el metabolismo de SAM es finamente regulado, de forma tejido específico, según la etapa de desarrollo del hígado y de acuerdo al estado de proliferación del órgano.

Se sabe que los patrones de expresión de *Mat1a* y *Mat2a* son estrictamente regulados en el hígado [40, 96, 97], aunque aún no se tenga claridad en el mecanismo fundamental.

Es conocido que ambos genes MAT son transcripcionalmente regulados por un patrón diferencial de metilación y acetilación de histonas en la región promotora de

acuerdo con el tejido [50, 98, 99], sin embargo, esto no explica completamente la regulación de las proteínas MAT durante el desarrollo del hígado y en procesos neoplásicos.

El balance entre metionina y SAM regula la expresión de *Mat2a* donde se puede medir un aumento a nivel de RNA mensajero. En este punto la regulación por RBPs está involucrada [40].

La regulación post-transcripcional requiere de factores *trans* representados por RNAs no codificantes; especialmente microRNAs; y RBPs que se asocian con factores *cis* específicos presentes en el RNA mensajero blanco para llevar a cabo su regulación [100, 101]

Entre los elementos *cis* específicos, podemos encontrar secuencias conservadas llamadas elementos ricos en adenina y uracilo (AREs), presentes en el 3'UTR de los RNAm, el cual también está involucrado en la degradación, traducción y localización de los RNAm. 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 [102, 103].

4.5.1 HuR, proteína de unión a RNA: funciones, implicaciones en cáncer y regulación.

Primero fue descubierta en *Drosophila* como *elav* (del inglés *embryonic lethal abnormal vision*), esta familia de proteínas está compuesta por HuR, HuB, HuC y HuD [82]. Aunque HuR se localiza principalmente en el núcleo (más del 90% de la proteína celular) y el reconocimiento de sus transcritos blanco ocurre en este compartimiento celular, HuR puede ser translocada al citosol bajo diversos estímulos como proliferación, estrés energético, apoptosis, diferenciación y estabilizar y/o aumentar la traducción de sus RNAm blanco [85, 103-105].

HuR contiene tres motivos de reconocimiento de RNA (RRMs), a través de los cuales estas proteínas se unen a su RNAm blanco, además contiene una región bisagra entre RRM2 y RRM3. Sin embargo, los tres motivos RRM están

conservados en todos los miembros de la familia Hu/elav, indicando que son esenciales para la función de estas proteínas (Figura 7) [105, 106].

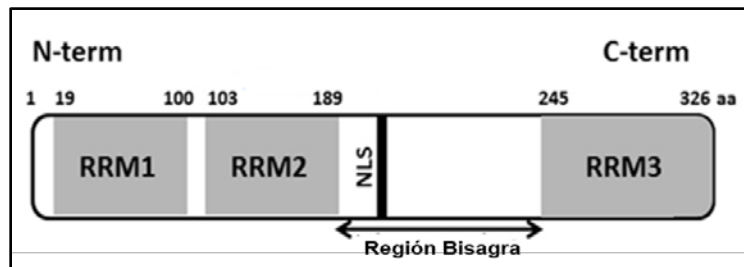


Figura. 7. Representación esquemática de la proteína HuR. Los motivos de reconocimiento de RNA (RRMs) y la región bisagra que contiene el dominio NLS son indicados (Modificado de [105]).

La región bisagra contiene una secuencia clásica de localización nuclear (NLS), esta secuencia está involucrada en la movilización de HuR desde el núcleo hacia el citosol y recibe el nombre de dominio HNS por sus siglas en inglés *HuR Nucleocytoplasmic Shuttling*. HuR puede promover tres tipos de efectos al unirse a sus RNAm blanco: estabilización, sobre regulación de la traducción y represión de la traducción [100, 105, 107]

En el primer caso, HuR estabiliza muchos RNAm blanco, incluidos p21, c-fos, iNOS, sirtuina 1 (SIRT1), p53, ciclinas A2, B1, E1 y D1 por mencionar algunos; sin embargo, el mecanismo exacto por el cual HuR es capaz de estabilizar a los RNAm lábiles aún no es del todo claro, pero si se sabe que HuR es capaz de bloquear la unión de otras RBPs o miRNAs que puedan reclutar estructuras de degradación del RNAm como el exosoma o el complejo RISC [108, 109].

Por otra parte, HuR también promueve la traducción de varios RNAm, incluyendo p53, citocromo C, factor inducible de hipoxia 1 α (HIF1 α). Y aunque aún no es claro como HuR es capaz de promover la traducción, en algunos casos se sabe que HuR interfiere con diferentes sitios de unión en la región 5'UTR de los RNAm blanco y directamente aumenta la traducción por ejemplo *XIAP* [110]. En otros casos, el efecto de HuR en la traducción es debido a la competencia con el propio represor de la RBP o con diferentes complejos miRNAs /RISC, por ejemplo el RNAm de citocromo C [105, 111].

Sin embargo, HuR puede llevar a cabo una autorregulación, al unirse al RNAm de sí mismo;[105] por lo que al unirse a la región 3'UTR de su propio RNA mensajero también se incrementa la exportación citoplásmica del RNAm *HuR* [40, 112]. Además HuR también se une selectivamente a la región 3'UTR del RNAm de *Mat2α* estabilizando al transcrito de este gen, aumentando así el nivel del RNAm, prolongando el tiempo de vida media y/o su traducción [40]. Sin embargo, HuR es susceptible a metilación por parte de SAM, lo cual provoca que HuR-metilado al unirse de forma selectiva al RNAm de *Mat2α* desestabilice este transcrito y cause una inhibición de la traducción de esta molécula [59, 106, 113]

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 [114, 115]

La familia Hu/elav fue de las primeras implicadas en carcinogénesis. Los primeros reportes de HuR en cáncer se hicieron analizando tejidos como cerebro y colón, después se realizaron estudios en otros procesos malignos en tejidos como mama, estómago, riñón, páncreas, esófago, próstata, pulmón, etc. Así entonces, HuR, ha sido propuesto como un jugador clave en el desarrollo de tumores, ya que existe una sobre expresión de HuR en carcinoma independientemente del tejido. El desarrollo de tumores bajo condiciones de estrés como el estrés oxidativo, reduce la disponibilidad de los nutrientes y además de reducir el acceso a los factores de crecimiento [85, 102, 105, 116, 117].

Por ejemplo, en cáncer de páncreas, niveles altos de HuR correlacionan con altos niveles de VEGF (del inglés *vascular endothelial growth factor*) y esto correlaciona con un pronóstico poco favorable para los pacientes. Mientras que en la hepatocarcinogenesis el papel de HuR también ha sido reportado, y se demostró que en pacientes con cirrosis y con HCC existen niveles elevados de HuR preferentemente en el citosol [107, 111, 118].

Por otra parte se demostró que silenciando a *HuR* en un modelo de daño colestásico (ligación del conducto biliar) se redujo el daño hepático, estrés oxidativo, inflamación además de una reducción en el daño fibrótico. Sin embargo, HuR también regula la

activación de las HSC mediante la respuesta de dos activadores principales, PDGF y TGF β . Por lo que todos estos datos sugieren que HuR tiene un papel fundamental en el desarrollo de fibrosis después de la activación de las células estrelladas como consecuencia de daño hepático crónico [40, 112, 119].

4.5.2 AUF1, proteína de unión a RNA: funciones, implicaciones en cáncer y regulación.

El factor 1 de unión a RNA en elementos ricos en AU (AUF1 también llamado hnRNP D) comprende una familia de proteínas formada por cuatro isoformas derivadas de un precursor común de RNAm, obteniendo p37, p40, p42 y p45, basadas cada una en su peso molecular, resultado del splicing alternativo del exón 2 y 7 [114]. Las cuatro isoformas contienen proteínas conservadas, incluyendo los motivos de reconocimiento a RNA (RRMs o RBDs), y un motivo de ocho ácido 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 RNAm blanco (Figura 8) [85, 120].

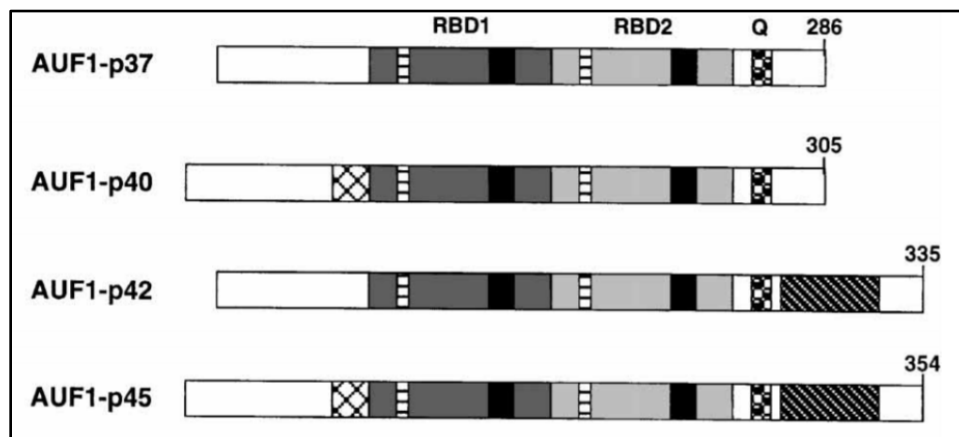


Figura. 8. Representación esquemática de las isoformas de AUF1. Se incluyen dominios de unión a RNA (RBD1 y RBD2), motivo rico en ácido glutámico. Las isoformas AUF1-p40 y AUF1-p42 cuentan con 19 aminoácidos extras presentes en el N-terminal (representadas por la región con cruces), mientras que AUF1-p42 y AUF1-p45 presentan 49 aminoácidos extras cerca de la región C-terminal (representadas por las líneas diagonales)

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 [100]. Sin embargo, proteínas como AUF1 no presentan actividad enzimática y solamente actúan reclutando la maquinaria de degradación o inhibiendo su traducción [102, 114].

Así como HuR, AUF1 es ubicuamente expresada en el núcleo, pero su actividad moduladora es ligada únicamente a la translocación citosólica que sufre [115].

En el caso del RNAm 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 una disminución en la biosíntesis de SAM [40, 114].

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* [40]. Pero, en HCC el nivel de la proteína AUF1 también se ve incrementada [40]. Mientras que el gen *Mat1a* es considerado un marcador del hígado normal diferenciado, *Mat2a* es un marcador de rápido crecimiento hepático y de diferenciación y es transcripcionalmente inducido en el HCC [50, 85, 121].

4.6 Papel de la Sirtuina 1 en el proceso de hepatocarcinogenesis

Como se mencionó previamente, en el HCC, el gen *Mat1a* es transcripcionalmente silenciado mientras que la expresión del gen *Mat2a* es inducida. Este cambio en la expresión de las enzimas MAT juega un importante papel patogénico, ya que la expresión de MAT2A facilita el crecimiento celular en el cáncer hepático [40, 85] Reportes de diferentes grupos sugieren que una posible regulación de genes como Sirtuina 1 (SIRT1) mediante HuR podría provocar modificaciones a nivel epigenético de los promotores de los genes *Mat1a* y *Mat2a* [104, 111, 122].

Por su parte, las sirtuinas o desacetilasas de histonas de clase III (HDAC III) constituyen una familia de enzimas altamente conservadas en la evolución

presentes en todos los filos, desde arqueas hasta eucariotas superiores [123]. Las sirtuinas catalizan la desacetilación de proteínas con lisinas ϵ -amino-acetiladas, utilizando como cosustrato dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD^+). Cabe destacar que el uso de NAD^+ por parte de las sirtuinas podría establecer un puente entre la modulación de sus proteínas blanco y el estado metabólico de la célula, detectando la relación NAD^+/NADH [124-127].

De los siete tipos de sirtuinas en mamíferos es SIRT1 la proteína más estudiada. Esta enzima tiene participación en procesos como control del ciclo celular, resistencia al estrés, apoptosis, metabolismo energético, entre otros. Sin embargo, todas las isoformas presentan un núcleo catalítico conservado, denominado dominio sirtuina de entre 246-276 aminoácidos. Las distintas isoformas tienen distintas ubicaciones celulares; en el caso de SIRT1 es considerada nuclear aunque se sabe que también puede translocarse al citoplasma dependiendo del tejido o de los estímulos presentes [128-130].

4.7 Nitrosaminas, carcinógenos químicos.

4.7.1 Estructura y función

Los compuestos nitrosos (NOC) fueron identificados por primera vez en 1863 por Geuther y hasta 1937 se describieron efectos tóxicos en humanos [131-133]. Ya para 1961, Ridd señaló que los NOC podrían formarse a partir de la reacción de un agente nitrosante con una amina o amida secundaria. Dependiendo si la unión se realiza con una amina o amida, estas sustancias pueden ser clasificadas como N-nitrosaminas (NA) o N-nitrosamidas [134-136].

Aunque las NA comparten una estructura general (Figura 9), algunas de ellas han sido clasificadas como cancerígenas en experimentación animal por ejemplo: la N-Nitrosodimetilamina (NDMA), la N-Nitrosodietilamina (NDEA) también llamada Dietilnitrosamina (DEN), N-Nitrosopiperidina (NPYR) y la Nitrosoetilamina (NEMA), mientras que la N-Nitrosoprolina (NPRO) no se considera como potencial carcinogénico (Figura 10) [137, 138].

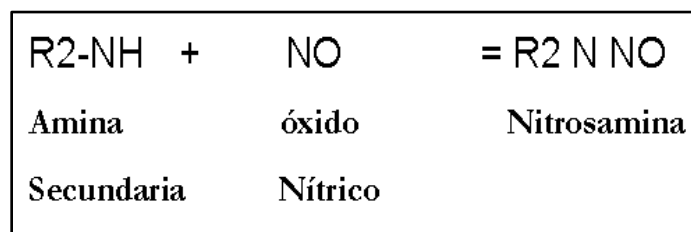


Figura. 9. Estructura general de las Nitrosaminas [139].

4.7.2 Mecanismo de acción: carcinogenicidad

Desde 1981, se demostró que los NOC podían producir tumores en varias especies y órganos (Bogovski and Bogovski, 1981). Mientras que análisis posteriores demostraron que cerca del 85 % de las NA parecen ser cancerígenas (Mirvish, 1995) [140].

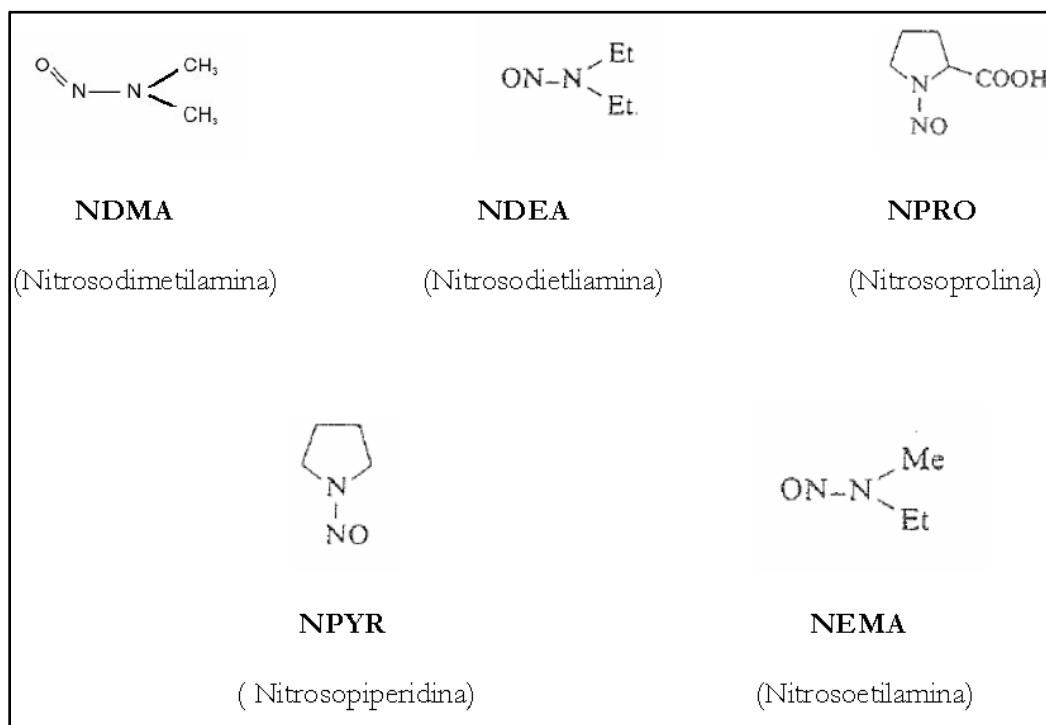


Figura. 10. Estructura química de las principales Nitrosaminas ([141]).

La International Agency for Research on Cancer (IARC) incluye a algunas de las NA (NDMA, NDEA) dentro del grupo 2A, como probables cancerígenos [140]. Es importante recordar que, aunque la exposición se ha reducido, estos compuestos

son cancerígenos aún a pequeñas dosis, y que las NA son más efectivas como cancerígenos en animales cuando se aplican en dosis pequeñas y repetidas en comparación con una dosis alta aislada [142, 143].

Principalmente se considera a las NA por su capacidad mutagénica, ya que pueden convertirse en sustancias electrofílicas y en agentes alquilantes. Las NA tienen la capacidad de reaccionar con el DNA en diversos sitios, principal sitio de alquilación es la posición N-7 de la guanina, para así alterar la configuración de sus bases e iniciar el proceso de carcinogénico [144, 145]. Las NA son estables a pH neutro y requieren activación metabólica in vivo para producir un efecto mutagénico y carcinogénico. Por lo tanto, pueden producir tumores en variedad de órganos, aún si estos están alejados del sitio de exposición. Las enzimas del citocromo P450, CYP2E1, son las responsables de la activación metabólica de las NA (Figura 11). Dicho proceso se produce por hidroxilación del átomo de carbono adyacente al grupo amino. Luego de activarse, se forman intermediarios que pueden descomponerse espontáneamente hasta dar agentes alquilantes aptos para reaccionar con las zonas nucleófilas del DNA [146-148].

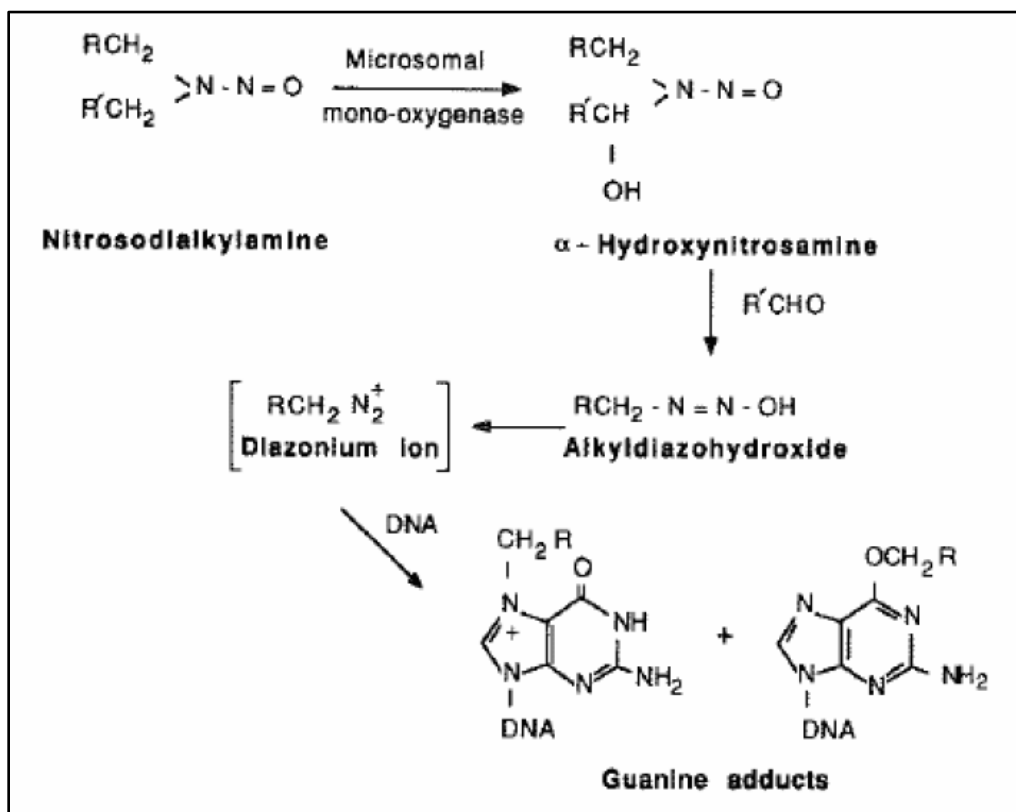


Figura. 11. Mecanismo de activación de las Nitrosaminas.

JUSTIFICACIÓN

5. ANTECEDENTES DIRECTOS

A pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, las opciones de tratamiento son limitadas. Mientras que las estrategias terapéuticas, principalmente dietas con bajo contenido de grasas y en suplementos vitamínicos, están encaminadas a retrasar la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis [5]. Sin embargo, para determinar el grado de daño hepático y así poder establecer el pronóstico de los pacientes actualmente se dispone de diversos métodos no invasivos, estos comprenden pruebas de imagen (FIBROTAC), marcadores bioquímicos simples (índice de Forns), marcadores de fibrogénesis (TGFB1, TIMP1 (inhibidor tisular de las metaloproteasas tipo 1), PIIIP (péptido aminoterminal de procolágena tipo III) y ácido hialurónico) además de la elastografía. Estos métodos permiten estimar el grado de fibrosis, aunque su utilidad para evaluar cambios moderados tras un tratamiento no ha sido demostrada [149, 150]. A pesar de ello, el único tratamiento efectivo es el trasplante ortotópico del hígado con el cual se ha logrado sobrevida de hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía [5].

Algunas de las desventajas que se presentan en esta alternativa es que 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 es necesario después de la cirugía además de ser una alternativa costosa. Además, permanece latente la alta reincidencia de fibrosis en el hígado trasplantado por cirrosis secundaria o por la prevalencia de infección por virus de hepatitis [151].

Por lo que en nuestro grupo de trabajo se planteó una alternativa terapéutica muy promisoriosa para el tratamiento de la cirrosis, un nuevo fármaco derivado de la adenosina, denominado IFC305 (Patente Nacional UNAM MX 316098 y Patente Internacional US8, 507, 459B2). Compuesto con el que hasta el momento no se han observado eventos adversos a la dosis y condiciones administradas.

Los efectos del IFC305 se han probado en un modelo de hepatotoxicidad crónica inducida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas y la

administración simultánea del derivado de adenosina, observándose una disminución de la fibrosis inducida por el tóxico. El IFC305 inhibió un 50% la acumulación de colágena en el tejido hepático, resultado de un aumento en la actividad colagenolítica del hígado, además de observar un aumento en la proliferación hepática del hígado cirrótico [152]. Así mismo, el tratamiento con el IFC305 disminuyó las fibras de colágena a las 5 y 10 semanas de tratamiento después de la inducción de la cirrosis con CCl₄, además de una recuperación paulatina de la arquitectura normal del hígado [153].

El IFC305 es un derivado de adenosina, un nucleósido de purina, que fisiológicamente es considerado como mensajero químico [154]. La adenosina es principalmente formada *de novo* por la síntesis de purinas que se lleva a cabo principalmente en el hígado, por fosfohidrólisis de nucleótidos de adenina vía endo y ecto de 5`nucleotidasas o por hidrólisis de SAH en la vía de metilación [155, 156] Sin embargo, este nucleósido puede ejecutar diversas acciones metabólicas a nivel de tejido específico por ejemplo, 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 e incrementar la carga energética del hepatocito. En un estado cirrótico preestablecido, la adenosina incrementa la degradación de la colágena y preserva el estado energético y funcional del hígado [156-158]

Aunado a ello, la adenosina mostró capacidades hepatoprotectoras en diversos modelos de hepatotoxicidad aguda, algunos de ellos se mencionan a continuación:

Prevención del hígado graso [159], recuperación del estado energético basal reducido por CCl₄ [160], mantenimiento del equilibrio redox entre citosol y mitocondria [161], prevención de la necrosis inducida por CCl₄ [162], y control del flujo sanguíneo en la arteria hepática [161], por mencionar algunos.

Derivado de ello y sabiendo 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 [151]; el hepatoprotector IFC305 fue sometido a diversos estudios preclínicos demostrando no ser genotóxico ni teratogénico. Pero sobretodo

presentó un efecto anti carcinogénico, el cual fue recientemente abordado en un modelo secuencial cirrosis-HCC inducido con Dietilnitrosamina (DEN), modelo experimental de aproximadamente cinco meses de duración (Figura 12) [154, 163-167].

Bajo este esquema experimental de hepatocarcinogenesis química inducida con DEN, se ha podido demostrar que el IFC305 tiene efectos claros a nivel mitocondrial en el modelo secuencial inducido con DEN, detectando que en la etapa de HCC se desarrollan cambios morfológicos, funcionales y metabólicos importantes en la mitocondria y que el IFC305 fue capaz de recuperar una morfología funcional, además de incrementar el nivel de ATP [166].

En este mismo modelo se observó que el IFC305 indujo la baja regulación de la enzima timidilato sintasa y del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), además del incremento de p27, resultando en la inhibición de la proliferación de las células tumorales [163].

Aunado a ello, en el grupo de trabajo demostramos que el nivel de SAM disminuyó en un modelo secuencial cirrosis-HCC acompañado con un incremento en el nivel de SAH, mientras que el tratamiento con el compuesto hepatoprotector IFC305 fue capaz de normalizar la cantidad de estos metabolitos, incrementando el índice de metilación (relación SAM/SAH) y favoreciendo las reacciones de metilación [168]. Sin embargo, esta recuperación metabólica de SAM fue favorecida por un aumento en el nivel de ATP y por la normalización en el patrón de expresión de las enzimas MAT.

Una de las ventajas de este modelo experimental es el abordaje que se tiene sobre la cirrosis, recordando que ésta patología precede en 80% de los casos al HCC. Así entonces, debido a la mortalidad de las principales enfermedades hepáticas en México (cirrosis y HCC) [169], y a las pocas alternativas terapéuticas para las hepatopatías es indispensable poder elucidar uno de los posibles mecanismos moleculares que provocan la cirrosis y el hepatocarcinoma, y llegar a una posible opción terapéutica efectiva como lo puede ser el derivado de adenosina, IFC305 [5].

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la alta incidencia y mortalidad de las hepatopatías en México, en el grupo de trabajo se ha desarrollado un fármaco para el tratamiento de la cirrosis y posible prevención del carcinoma hepatocelular, el cual se ha denominado IFC305 (Patente UNAM 207422), cuya evidencia experimental demuestra la normalización de la función hepática. A partir de ello, se pretende evaluar si el IFC305 puede recuperar el patrón de expresión de los genes *Mat1a* y *Mat2a* alterados en un modelo experimental de cirrosis-HCC inducido con DEN.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7. HIPÓTESIS

Como se mencionó previamente, tanto en cirrosis como en HCC existe una desregulación del patrón de expresión de los genes *Mat1a* y *Mat2a*. Así entonces, se propone que en un modelo experimental de daño secuencial cirrosis-HCC la administración del derivado de adenosina, IFC305, normalizará el patrón de expresión de los genes *Mat1a* y *Mat2a* a través de la función reguladora de las proteínas HuR y AUF1. Favoreciendo la activación del ciclo de la metionina promoviendo un alto nivel de SAM, una reducción en la síntesis de poliaminas y una recuperación del nivel de GSH.

8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del IFC305 en el modelo secuencial cirrosis-HCC inducido con DEN, en tres eventos específicos, modulación del cambio en la relación de expresión de *Mat1a:Mat2a*, normalización del nivel de SAM y sus diferentes impactos metabólicos

9. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Desarrollar el modelo experimental prevención de cirrosis y reversión de HCC tras la administración de DEN e IFC305.
- b) Determinar el nivel del RNAm de HuR y AUF1 a lo largo del modelo experimental cirrosis-HCC inducido con DEN.
- c) Determinar el nivel de Glutación Reducido (GSH) y Glutación Oxidado (GSSG) en muestras cirróticas y con HCC bajo la administración de DEN y el efecto del IFC305.
- d) Determinar nivel de lipoperoxidación a lo largo del modelo experimental bajo la administración de DEN e IFC305.
- e) Determinar el nivel de Acetil-coenzima A (Acetil-CoA) en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-HCC.

- f) Estudiar el nivel de transcrito del gen Sirt1, en muestras cirróticas y con HCC bajo la administración de DEN y del IFC305.
- g) Determinar la relación NAD⁺/NADH como principal cosustrato de desacetilasas de Histonas tipo Sirtuinas en muestras cirróticas y con HCC bajo la administración de DEN y el efecto del IFC305
- h) Determinar la cantidad de proteína H4 acetilada total en muestras hepáticas del modelo *in vivo* secuencial cirrosis-HCC y los cambios ocurridos con la administración del derivado de adenosina.

PROCEDIMIENTO **E**XPERIMENTAL

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

10.1 Sustancias químicas principales

Dietilnitrosamina (DEN), 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 y soluble en agua.

10.2 Manejo de animales. Modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN.

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. Se usaron ratas Wistar macho de 200-250 g de peso a las cuales se les inyectó DEN, una vez a la semana durante 12 o 16 semanas dependiendo el grupo experimental [167]; e IFC305 durante tres veces a la semana; ambos tratamientos fueron a una dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal [163, 166]. En cada grupo experimental los animales fueron sacrificados 24 h después haber terminado el tratamiento respectivo mediante la administración de pentobarbital sódico y exanguinación. Posterior a la extracción del hígado, éste se fraccionó y congeló en nitrógeno líquido y se almacenó en un ultracongelador.

Los grupos experimentales se organizaron como se muestra a continuación en la Figura 12:

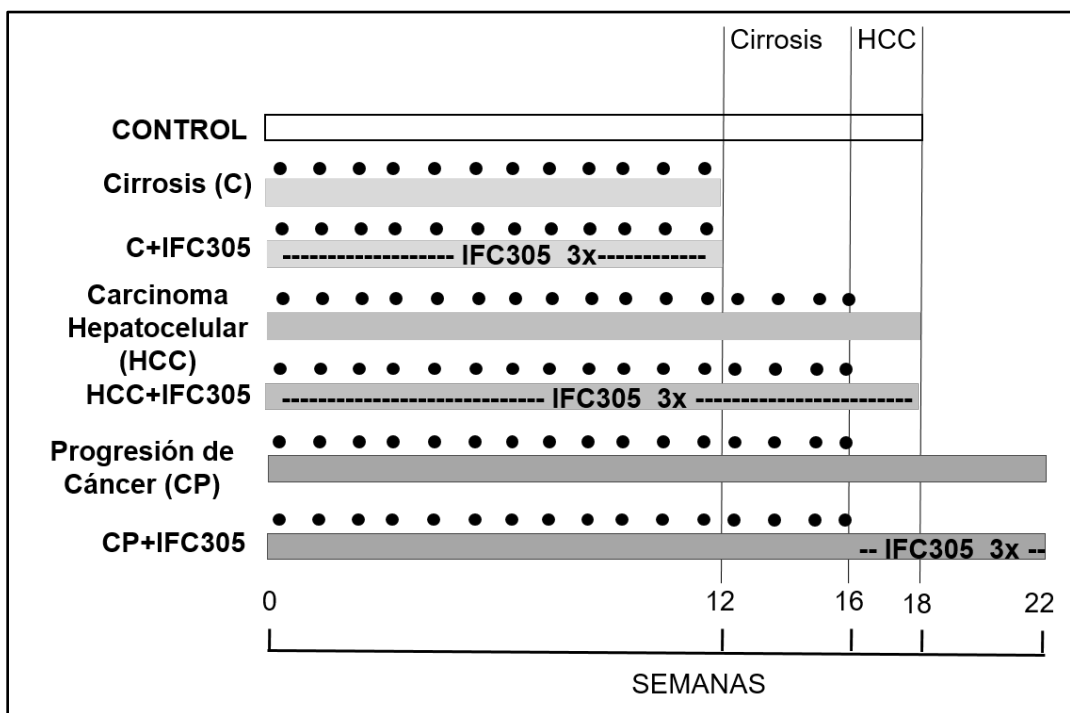


Figura. 12. Modelo secuencial de daño hepático inducido con DEN. Las ratas macho Wistar recibieron DEN durante 12 semanas para inducir cirrosis, y si se prolonga hasta 16 semanas la administración del tóxico se induce HCC de acuerdo con [167]. El IFC305 fue inyectado i.p. en paralelo con el DEN como un esquema de prevención C+IFC305 y HCC+IFC305. Después de suspender el tratamiento con DEN, el IFC305 fue administrado a partir de la semana 16 hasta la semana 22 en el esquema denominado progresión de cáncer (CP+IFC305). Los animales recibieron DEN disuelto en solución salina una vez por semana, y el IFC305 fue administrado tres veces por semana (IFC305 3X).

10.3 Fraccionamiento celular: núcleo y citosol.

A partir de tejido congelado se dispusieron aproximadamente 300 mg de tejido, se homogenizaron con 10-15 golpes en un dispositivo 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 fosfatasa.

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 fosfatasa y se mezcló ligeramente por inversión.

Posteriormente se colocó 1.5 mL de buffer 2 en TKM a la muestra, y finalmente se agregó el volumen necesario de TKM sin inhibidores en cada tubo hasta alcanzar

un peso constante en cada uno. Se centrifugó a 39,000 RPM durante 30 min a 4°C. La solución de TKM de la parte superior se retiró cuidadosamente y se desechó. La fracción siguiente, de color rojiza, contiene las proteínas citosólicas, ésta fracción se resguarda hasta su uso. Una vez obtenido el aglomerado de núcleos denominado pellet nuclear, se agregaron 300 µL de TKM complementado con inhibidores y se homogenizó suavemente con pipeta a 4°C hasta disgregar. Una vez que el pellet fue totalmente homogenizado, el homogenado resultante 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 10 µL de buffer hipertónico hasta completar 40 µL. Posteriormente se incubó durante 20 min a 4°C en agitación constante y vigorosa.

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

Las proteínas obtenidas se preparan como se describe en el apartado siguiente para su posterior separación por electroforesis.

10.4 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, uno de los métodos colorimétricos más usados 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 [170].

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] ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
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 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tabla 1. 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 agregaron 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.

10.5 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 [171].

De los homogenado nucleares obtenidos previamente se tomaron 20 μg de proteína total 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 5 min a 95°C.

A continuación se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. 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) y *Stacking* (10X, Tris-HCl 30 g, SDS 2g a pH 6.8 para preparar 0.5L). La electroforesis se realizó con amortiguador de corrida 1X a 100 V durante aproximadamente 1 h 20 min. Al terminar, 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.

La activación previa de la membrana PVDF consistió en metanol absoluto 5 min a temperatura ambiente, posteriormente agua desionizada 5 min y finalmente buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0.2 M, y metanol 20%).

La transferencia se realizó a 100 V durante 25 min, mediante la denominada transferencia húmeda. A continuación, la membrana se incubó durante una hora en solución de bloqueo conteniendo 5% leche en polvo desnatada en TBS Tween 1x a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación de la membrana durante 12 h con anticuerpos primarios específicos, según la proteína objeto de análisis, disueltos en leche preparada al 0.5% en TBS-Tween 1X.

Transcurrido ese tiempo, la membrana se lavó durante 5 min con TBS-Tween 1x para posteriormente llevar a incubación durante 90 min con anticuerpo secundario según corresponda, anti-inmunoglobulina de conejo o de ratón, unido a peroxidasa de rábano (HRP).

Posteriormente se lavó la membrana 3 veces durante 5 min y 3 veces más durante 10 min con TBS-Tween 1X. La tabla 2 describe los anticuerpos primarios utilizados, así como las condiciones de incubación:

Anticuerpo	Marca	Condiciones de incubación
Histona H4 total	Santa Cruz Biotechnology (sc-25260)	1:2000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación toda la noche
Histona hiper acetilada H4 total	Santa Cruz Biotechnology (sc-393472)	1:1000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación toda la noche

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión de proteínas por Western blot.

Los anticuerpos secundarios utilizados son descritos a continuación en la tabla 3.

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

La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial *West Femto* (Thermo Scientific 34095), exponiendo la membrana durante 5 min a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente se introdujo en un cassette radiográfico junto con una película de alta sensibilidad (Kodak 190 0943, 190 1875 y 604 0331) durante tiempos variables de entre 1-5 min.

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 10 min con TBS-Tween 1X y 3 lavados posteriores durante 5 min, para después volver a tratar la membrana como se mencionó previamente.

10.6 Inmunohistoquímica de las proteínas MAT

Las muestras fueron fijadas y procesadas hasta la obtención de las laminillas con los cortes en la Unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular. Cada una de las laminillas se colocó en el horno a 60°C durante 45 min y posteriormente se siguió el siguiente tren de hidratación:

Xilol absoluto, etanol absoluto, etanol al 95%, etanol al 70%, etanol al 50%, y finalmente agua desionizada.

Se precalentó el buffer de citratos (recién preparado) durante 1 min para poder colocar las laminillas deshidratadas y desparafinadas en el recipiente plástico. Posteriormente se calentaron las laminillas inmersas en el buffer de citratos durante 10 min en el horno de microondas, una vez transcurrido este lapso de tiempo las laminillas se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este periodo de tiempo, la laminilla se enjuagó en agua desionizada 2 veces durante 2 min cada uno y se colocó en TBS nuevo. Con la finalidad de delimitar el área de cada corte, se rodeó el tejido a tratar con PAD Pen, cuidando que el tejido no se deshidrate.

Se enjuagó con TBST nuevo, se retiró el excedente y se incubó 20 min a temperatura ambiente con Peroxidase Block (obtenido 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 (obtenido del Kit). Después se colocó el anticuerpo primario y se incubó en cámara húmeda a 4°C durante 12 h. Los anticuerpos primarios a usar (MAT1A 1:50; MAT2A 1:75) se diluyeron 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 h a temperatura ambiente con Anticuerpo Secundario (IgG de Conejo o Ratón según corresponda a 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 40 uL por corte de DAB (Diaminobencidina), cuidando que el tiempo de reacción sea el mismo para cada una de las muestras. Se consideró 1 mL de buffer de sustratos por 20 µL de solución DAB. La reacción fue detenida al colocar la laminilla en agua desionizada.

La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris, por máximo 1 min. Se viró la coloración de las laminillas en agua tibia o preferentemente en NaOH 37mM. Finalmente las laminillas fueron deshidratadas al pasar por el siguiente tren de deshidratación:

Agua desionizada, etanol al 50%, etanol al 70%, 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.

10.7 Aislamiento de RNA

A partir de 500 mg de tejido congelado se agregaron 500 µL 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 RNAasas, además la adición de cloroformo permite la separación mediante centrifugación del RNA, DNA 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 min para poder remover las partículas de tejido de mayor tamaño. Una vez recuperado el sobrenadante se agregaron 500 µL de etanol absoluto (relación 1:1 respecto a la cantidad de Tripure utilizada), se mezcló vigorosamente durante 10 s.

La suspensión obtenida se transfirió a una columna Direct-trizol RNA mini Prep R205S (Zymo Research, The Epigenetics Company). Posteriormente, se centrifugó a 13,000 RPM a temperatura ambiente durante 1 min. Se desechó la solución obtenida y se transfirió la columna a otro tubo colector. La muestra fue tratada con

DNAsa, agregando 80 μ L volumen final de una solución que contiene (DNasa 5U, 10 X Buffer 8 μ L, Agua libre de DNasa y RNasa 3 μ L, RNA Wash Buffer 64 μ L). Las muestras fueron incubadas 15 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó 13,000 RPM a temperatura ambiente durante 1 min. Se desechó el primer filtrado y se posteriormente se agregaron 400 μ L de RNA Pre Wash y se centrifugó durante 1 min a 13,000 RPM a temperatura ambiente, se desechó el filtrado, y se repitió este paso 1 vez más para limpiar el RNA perfectamente. Después se agregaron 700 μ L de RNA Wash y se centrifugó a 13,000 RPM a temperatura ambiente por 1 min. Los residuos fueron descartados y se procedió a centrifugar a 13,000 RPM a temperatura ambiente por 2 min.

Finalmente se agregó la cantidad necesaria de agua libre de RNasa y DNasa (proveniente del Kit) para recuperar el RNA de la columna mediante centrifugación por 1 min a 14,000 RPM a temperatura ambiente.

10.8 Análisis de expresión génica por RT-PCR

Se homogenizaron 300 mg de tejido hepático congelado más 1 mL de reactivo Tripure®. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ L de cloroformo. La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente con agitación vigorosa durante 30 s y posteriormente se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 15 min.

Se recolectó la fase acuosa y se añadieron 500 μ L de isopropanol absoluto, posteriormente se agitó 15 s e incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente se centrifugó a 12000 RPM a 4°C durante 10 min para recuperar el pellet y se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 10000 RPM a 4°C durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet debe secarse bajo la campana de flujo laminar durante 30-40 min. El pellet obtenido se solubilizó en agua libre de RNAsas y DNAsas.

Se realizó la cuantificación de las muestras usando 2 μ L de RNA en Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), la pureza del RNA 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.

Posteriormente se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) utilizando el sistema High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies). A continuación se enlistan los reactivos y volúmenes usados en cada reacción:

*2 μ L Tampón RT 10X

*0.8 μ L desoxinucleótidos trifosfato (dNTP)

*2 μ L cebadores al azar 10X

*1 μ L Retrotranscriptasa Multiscribe (50U/ μ L)

*2 ng muestra RNA

*4.2 μ L agua grado inyectable.

Posteriormente la mezcla de reacción se incubó primero a 25°C durante 15 min, y finalmente a 37°C durante 2 h.

Una vez sintetizado el cDNA, se llevó a cabo la amplificación utilizando el sistema TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies); estas sondas fluorescentes de oligonucleótidos están etiquetados con un reportero fluorescente y un aceptor o “quencher”, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando la sonda hibrida con la secuencia blanco, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y así capturada por el equipo, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso que la especificidad de la sonda Taqman es muy alta. Durante la elongación empieza la formación de copias de las cadenas de DNA del gen a amplificar. La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región blanco del DNA, 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 Sonda Taqman

*7.5 µL Master Mix

*3.75 µL Agua grado Inyectable

*3 µL cDNA diluido 1:10

Como control de patrón interno para la normalización de la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH). Cada experimento incluyó además un control negativo de cada una de las muestras de RNA, dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de DNA 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [164].

Gene	Sonda Taqman
<i>HuR/ Elav1</i>	Rn01403240_m1
<i>AUF1/ hnrpd</i>	Rn01450137_g1
<i>Sirt1</i>	Rn01428096_m1
<i>Sms</i>	Rn01770794_g1
<i>GADPH</i>	1273360 E3

Tabla 4. Sondas utilizadas en la RT-PCR

10.9 Determinación de Acetil-CoA, Ácido 3-Hidroxi-butirico y acetoacetato

A partir de 250 mg de tejido hepático de cada grupo experimental se realizaron extractos perclóricos (HClO_4 0.4M) en relación 1:1. Posteriormente, estas suspensiones se neutralizaron con Bicarbonato de Potasio (NaHCO_3) en un rango de pH entre 6 y 8, se centrifugaron posteriormente a 3000 RPM durante 10 min y se recuperó el sobrenadante neutralizado para las determinaciones. Los niveles de Acetil-CoA, Ácido 3-Hidroxi-butirico y acetoacetato fueron determinados usando los siguientes Kits comerciales: Acetyl-Coenzyme A Assay Kit (Cat. MAK039, Sigma-Aldrich); Acetoacetate Colorimetric Assay Kit (Cat. MAK199) y EnzyChrom Ketone Body Assay Kit (Cat. EKBD-100, Hayward, C).

10.10 Determinación de Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG)

Se tomaron aproximadamente 250 mg de muestra y se agregaron 3.75 mL de FEDTA (Buffer Fosfatos-EDTA) y 1 mL H_3PO_4 , y posteriormente se centrifugó el homogenado resultante a 12000 rpm durante 30 min a 4°C.

Para determinar **GSH** se colocaron 0.5 mL del sobrenadante previamente obtenido y se agregaron 4.5 mL de FEDTA. A partir de esta mezcla se tomaron 100 μL y se agregó 1.8 mL de FEDTA y 100 μL de OPT (o-ftaraldehído), se homogenizó perfectamente para posteriormente incubar 15 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

Para evaluar **GSSG** se colocaron 0.5 mL del sobrenadante previamente obtenido y se agregaron 200 μL de NEM (N-etilmaleimida) 0.04M, posteriormente se incubó 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez transcurrido este periodo de tiempo se agregó 4.3 mL de NaOH 0.1N. A partir de esta solución se tomaron 100 μL y se agregaron 1.8 mL de FEDTA y 100 μL de OPT, se mezcló perfectamente y se incubó a temperatura ambiente por 15 min protegido de la luz.

Para ambos casos, las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 420 nm para la emisión y de excitación 350 nm.

10.11 Determinación colorimétrica de Lipoperoxidación

El ensayo de lipoperoxidación fue determinado midiendo la formación de malondialdehído (MDA) usando el método de ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual se detalla a continuación:

Se homogenizaron 0.5 g de hígado con 5 mL de agua. Del homogenado resultante, se tomaron 300 μ L y se agregaron 700 μ L de Tris-HCl 150 mM para luego incubar la muestra durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético (TCA) al 15 % y posteriormente la muestra se incubó a 100°C 45 min. Finalmente, se centrifugó la suspensión obtenida a 3000 RPM por 10 min y se realizó la lectura del sobrenadante a 532 nm.

10.12 Aislamiento de mitocondrias

Se homogenizó 1.0 g de hígado con 10 volúmenes del buffer A (sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, Trisma Base 10 mM y BSA 0.1%, pH 7.3). El homogenado resultante se centrifugó a 3,000 RPM por 5 min. El sobrenadante resultante se filtró a través de tela de organza y posteriormente se centrifugó a 10,000 RPM por 10 min. Finalmente, el pellet mitocondrial resultante fue homogenizado en el buffer B (sacarosa 250 mM, EDTA 1mM, Trisma Base 10 mM, pH 7.3) [166].

10.13 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 ANOVA. 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.

RESULTADOS

11. RESULTADOS

En el grupo de trabajo se ha utilizado un modelo secuencial de cirrosis y HCC previamente descrito por Schiffer [167] ya que en este modelo experimental se encuentra una situación semejante a la que se observa en el 80% de los pacientes que derivan de una cirrosis y progresan a HCC. Este modelo experimental se corroboró histológicamente usando la tinción de Tricrómica de Masson. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

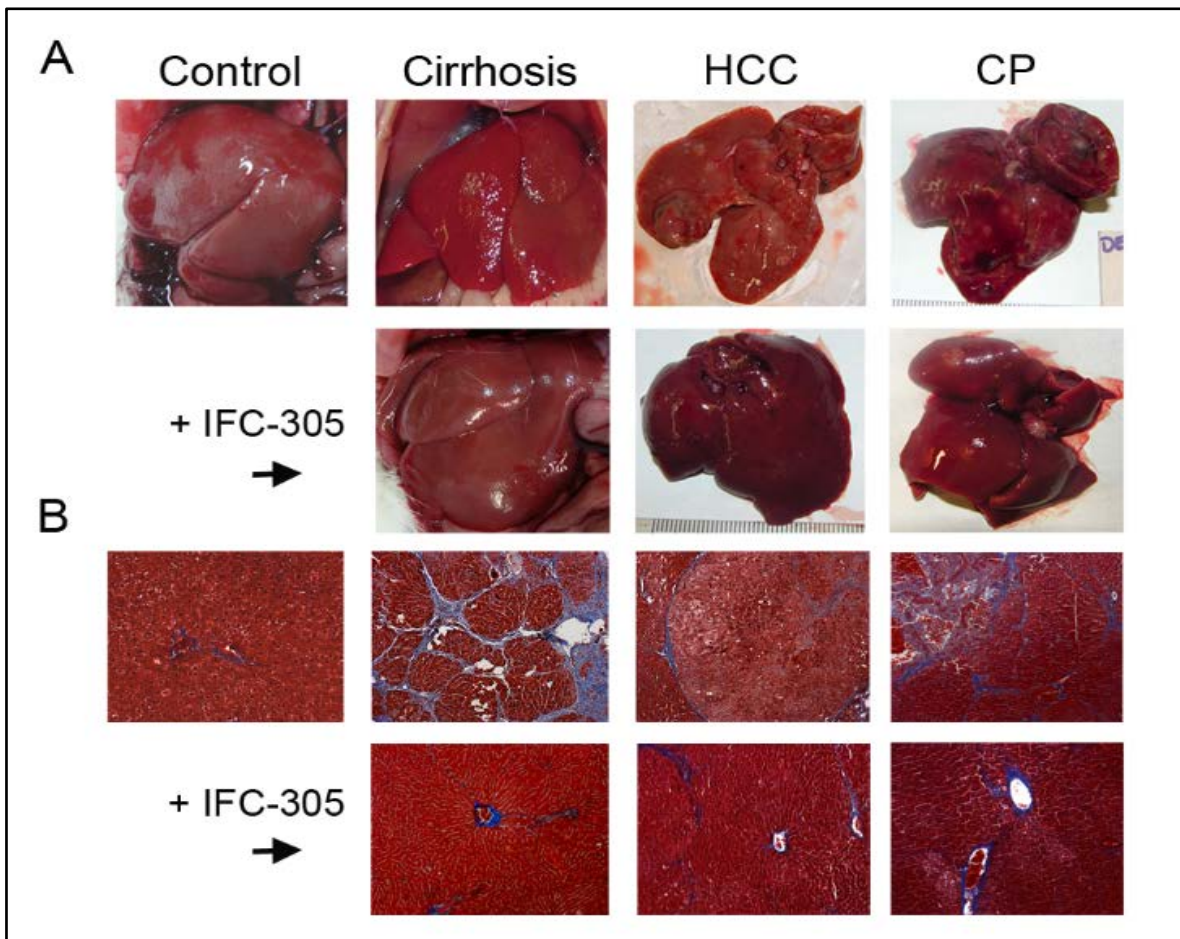


Figura 13. Desarrollo del modelo secuencial cirrosis-carcinoma hepatocelular. A) Fotografías de hígados de rata tratados con DEN a diferentes semanas, las muestras con cirrosis se observaron a las 12 semanas, las muestras con HCC a las 16 semanas y las muestras CP a las 22 semanas. Los mismos grupos tratados con IFC305 también son mostrados. B) Muestras histológicas de los diferentes grupos experimentales teñidos mediante la técnica de Tricrómica de Masson, en la cual se tiñen las fibras de colágena en color azul. Cada panel representa un corte distinto. Aumento 10X.

Como se observa en la Figura 13, la cirrosis fue detectada a la semana 12, los nódulos fueron rodeados por fibras de colágena. En los grupos HCC el daño fue establecido a la semana 16 como se observó cuando los nódulos pre neoplásicos se observaron y éstos se mantuvieron hasta la semana 22 con el grupo experimental CP. Mientras que en cada grupo tratado con IFC305 se observó una reducción significativa de las fibras de colágena, además de una mejora visible en la arquitectura hepática.

Así entonces, después de desarrollar y obtener una reproducibilidad en el modelo experimental se procedió a evaluar el efecto del IFC305 en la biosíntesis de SAM a través del ciclo de la metionina (Figura 5).

A continuación se muestran los resultados que corroboran la modulación metabólica del ciclo de la metionina.

11.1 Análisis inmunohistoquímico de las proteínas MAT

Las proteínas MAT sufren un cambio en el patrón de expresión que facilita el proceso hepatocarcinogénico y donde la biología del hígado se ve comprometida [85, 86, 172], es por ello que al realizar el análisis inmunohistoquímico de las proteínas MAT se pudo corroborar que el IFC305 favoreció la presencia de la proteína MAT1A y disminuyó la cantidad de proteína MAT2A detectada en las muestras. De forma interesante se observó que esta regulación ocurrió en ambas etapas de daño tanto cirrosis como HCC. Con lo cual se observó que este derivado de adenosina al incrementar la expresión de MAT1A favorece así la síntesis de SAM en el ciclo metabólico de metionina (Figura 5) [168].

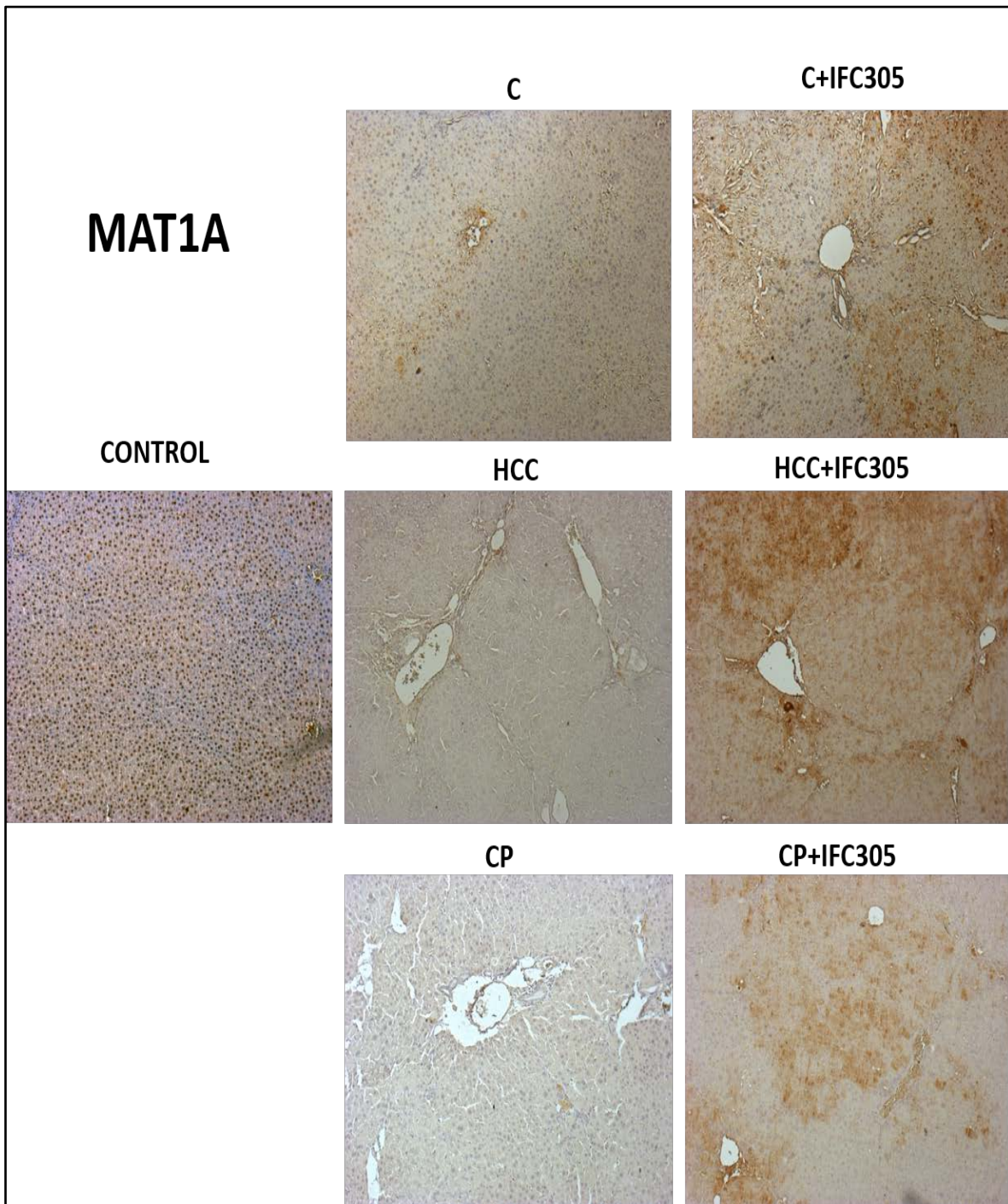


Figura 14. Análisis histológico de la proteína MAT1A en muestras de hígado de ratas de los grupos experimentales: C (Cirrosis), C+IFC305, HCC, HCC+IFC305, CP y CP+IFC305. Cada panel representa un corte distinto. Aumento 10X.

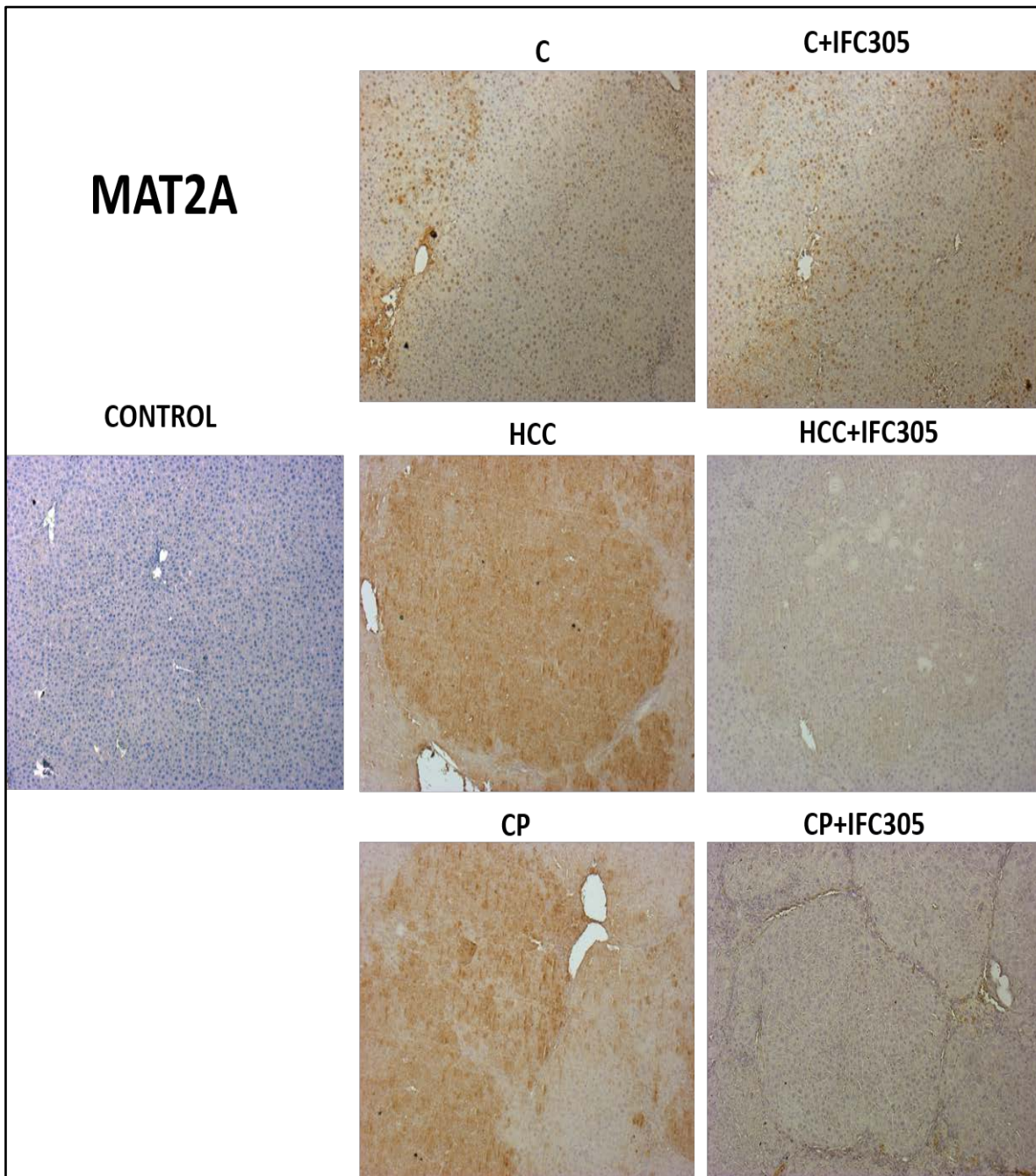


Figura 15. Análisis histológico de la proteína MAT1A en muestras de hígado de ratas de los grupos experimentales: C (Cirrosis), C+IFC305, HCC, HCC+IFC305, CP y CP+IFC305. Cada panel representa un corte distinto. Aumento 10X.

Como se observó en la Figura 14, la presencia de la proteína MAT1A en un tejido hepático sano fue principalmente nuclear sin ser exclusiva de este compartimento celular. Mientras que la administración de Dietilnitrosamina redujo de forma

importante la presencia de la proteína MAT1A en cada uno de los grupos tratados. Además se observó una alteración de la morfología del parénquima. Sin embargo, el tratamiento con el hepatoprotector IFC305 incrementó la cantidad de la marca referente a la proteína MAT1A. Aunque la marca se localizó de forma heterogénea a lo largo del corte, siendo mayormente focalizada en los hepatocitos tanto en su núcleo como en el citosol, por lo que el IFC305 no fue capaz de revertir en su totalidad la alteración en la arquitectura del tejido.

Para la proteína MAT2A se realizó un análisis histológico en las mismas condiciones para los distintos grupos experimentales (Figura 15), donde se observó que la presencia de la marca en un tejido hepático sano es menor en comparación con la marca de la proteína MAT1A en el mismo tejido. En muestras cirróticas se observó una heterogeneidad en la localización de la marca de la proteína MAT2A, mientras que en las muestras de los grupos HCC y CP hubo presencia de nódulos pre neoplásicos en los que la marca de la proteína MAT2A se focalizó principalmente.

El efecto del IFC305 se observó reduciendo la marca de la proteína MAT2A en los nódulos observados mientras que en muestras cirróticas no hubo un efecto claro del compuesto.

Por lo que el IFC305 fue capaz de poder efectuar un cambio en el patrón de expresión de las MAT en un modelo de hepatocarcinogenesis química.

11.2 Efecto del IFC305 sobre el nivel de RNAm los genes *HuR* y *AUF1*

Como se muestra en la Figura 16, al determinar el nivel de expresión del gen *HuR*, localizado en el cromosoma 12 de rata, se observó que la administración crónica de DEN durante 12 semanas (C) incrementa los niveles del transcrito. En el grupo HCC se observó una disminución en la expresión del gen comparado con el grupo control. Pero en el grupo CP no hubo diferencia en la expresión comparado con el grupo control. Sin embargo, en los grupos HCC+IFC305 y CP+IFC305, hubo una disminución en la expresión comparado con los grupos HCC y CP, respectivamente.

Por lo que el IFC305 moduló diferencialmente la expresión del gen *HuR* en los diferentes grupos experimentales en un modelo de hepatocarcinogenesis química.

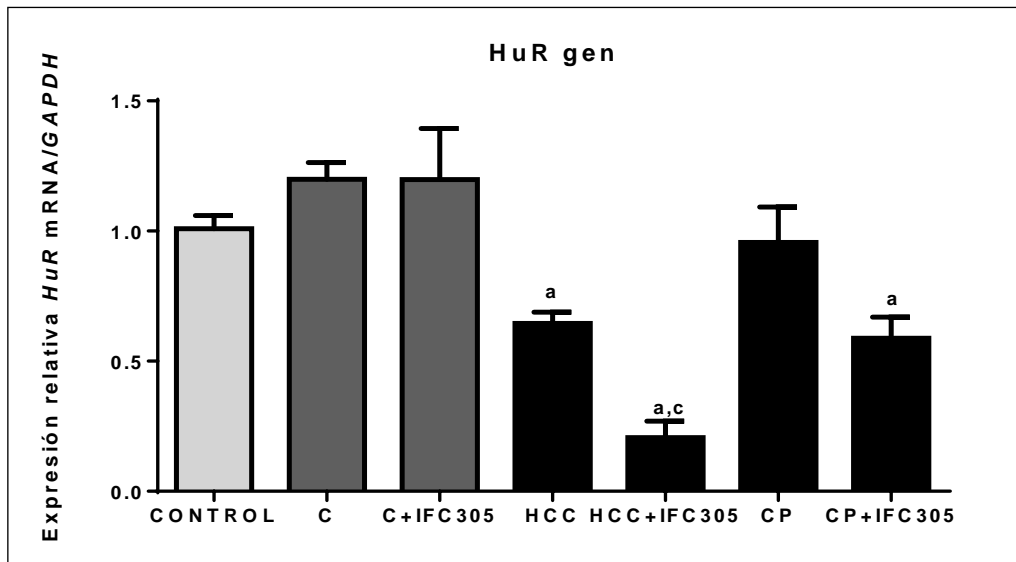


Figura. 16. Nivel de expresión del gen *HuR* en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

La expresión del gen *Auf1* en los grupos tratados con DEN (Figura 17) mostró un incremento mientras que en los grupos HCC+IFC305 y CP+IFC305 hubo una reducción en la expresión de *Auf1* respecto a HCC y CP, respectivamente. Sin embargo, en el grupo experimental al que se les administró DEN durante 12 semanas (C) y el grupo C+IFC305 muestran un nivel alto del transcrito con lo cual posiblemente desde esta etapa de daño hepático el gen *Mat1a* ya esté siendo modulado post-transcripcionalmente por la proteína AUF1.

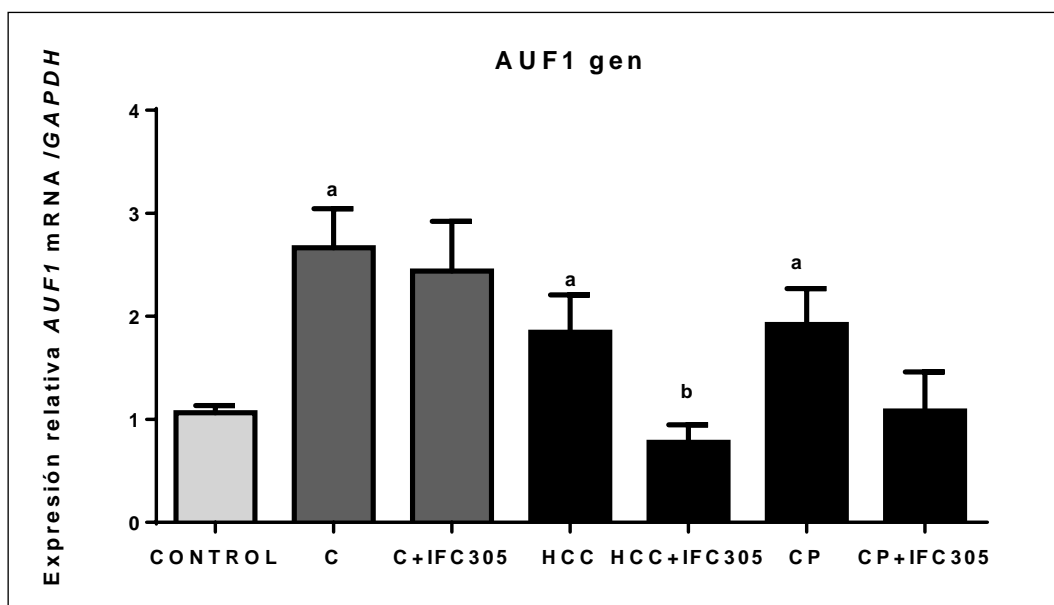


Figura. 17. Nivel de expresión del gen *AUF1* en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

11.3 Determinación del estrés oxidativo a través de lipoperoxidación y contenido de glutatión en un modelo secuencial cirrosis-carcinoma hepatocelular.

En hepatocitos, la homocisteína puede ser convertida a cisteína para generar GSH en reacciones de transulfuración acopladas al ciclo de la metionina (Figura 5). Como se muestra en la Figura 18, la administración de DEN durante 16 semanas, grupo HCC, no indujo cambios significativos en el nivel de GSH la forma reducida. Sin embargo, el tratamiento con IFC305 incrementó el nivel de GSH significativamente en el grupo HCC+IFC305 comparado con el grupo control. Mientras que en el grupo CP y CP+IFC305 no hubo disminución significativa.

Por su parte el grupo C y C+IFC305 no mostraron cambios significativos en la cantidad de GSH detectada.

Respecto a GSSG (Figura 19), se observó que hubo un incremento significativo en el grupo HCC, mientras que no en el grupo HCC+IFC305 se observó una reducción importante de este metabolito. A su vez, se observó una tendencia a disminuir en el contenido de GSSG en los grupos CP y CP+IFC305 comparado con el grupo HCC.

Mientras que al igual que el nivel de GSH, el nivel de GSSG en los grupos experimentales C y C+IFC305 no se observó ningún cambio respecto al grupo control.

La relación GSH/GSSG (Figura 20) es usada como un parámetro del estado redox de la célula; sin embargo, los cambios únicamente fueron observados en el grupo CP+IFC305, donde hubo un incremento significativo comparado con el grupo control, HCC y CP. Mientras que en los demás grupos experimentales no se observaron cambios sustanciales respecto al grupo control o respecto del grupo tratado con DEN.

Además hubo un incremento en el contenido total de glutatión (GSH+GSSG) en los grupos HCC y HCC+IFC305 comparado con el grupo control (Figura 21). Sin embargo, no hubo cambios significativos en los grupos CP y CP+IFC305. Así el aumento total de glutatión del grupo HCC+IFC305 sugieren que el compuesto hepatoprotector puede favorecer la biosíntesis de GSH en la etapa de daño por el desarrollo del HCC, mientras que en la etapa cirrótica los niveles de GSH GSSG no se vieron alterados, probablemente a algún mecanismo compensatorio de la célula o quizá en esta etapa de daño no es lo suficiente para mostrar una desregulación en la poza de GSH y GSSG de la célula.

Es bien conocido que el GSH es abundante en la célula para ejercer protección contra el estrés oxidativo, por lo que también se evaluó el posible potencial antioxidante del tratamiento con IFC305. El ensayo químico realizado permite medir las especies reactivas de ácido tiobarbiturico (TBARS), entre ellas destaca el malondialdehído (MDA), uno de los productos de lipoperoxidación y el cual también ha sido relacionado con el proceso carcinogénico inducido por DEN. Los resultados obtenidos (Figura 22) demostraron que hubo incremento importante en la

peroxidación lipídica en los grupos etapas cirróticos (C) y en el grupo HCC. Sin embargo, el tratamiento con el compuesto hepatoprotector IFC305 previno importantemente este incremento en el grupo HCC+IFC305 y en el grupo C+IFC305, en éste último aunque se redujo la cantidad de MDA no fue lo suficiente para alcanzar la cantidad detectada en el grupo control. Además se observó que los niveles de TBARS disminuyeron en el grupo CP; sin embargo, no hubo cambios en el grupo CP+IFC305 (Figura 22).

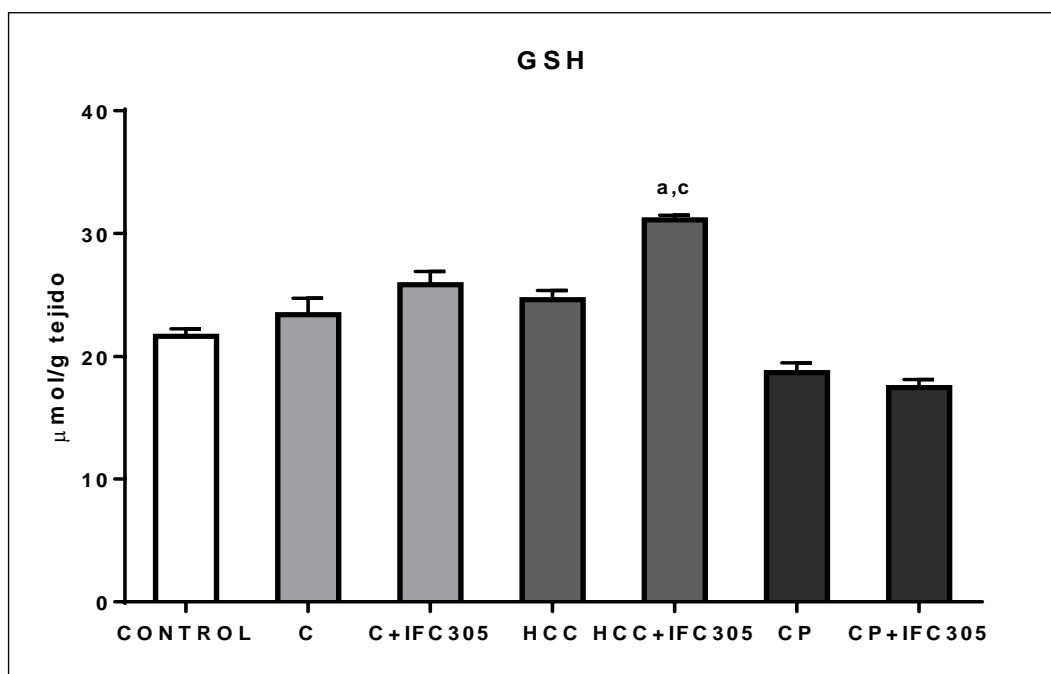


Figura. 18. Determinación del contenido de Glutati6n Reducido (GSH) en muestras de h6gado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-c6ncer hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresi6n de c6ncer (CP), Progresi6n de c6ncer+IF305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

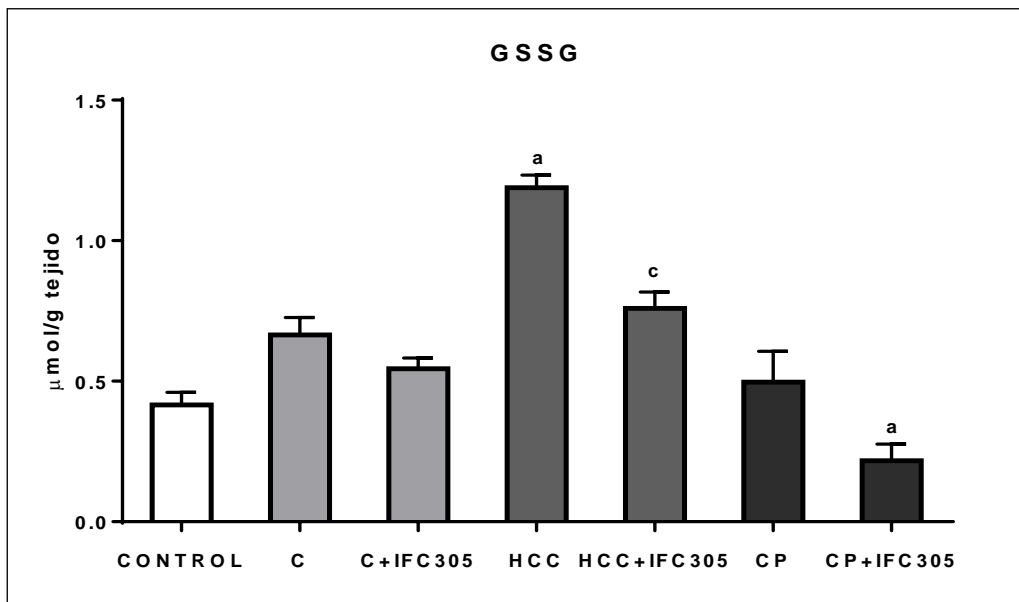


Figura. 19. Determinación del contenido de Glutación Oxidado (GSSG) en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IF305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

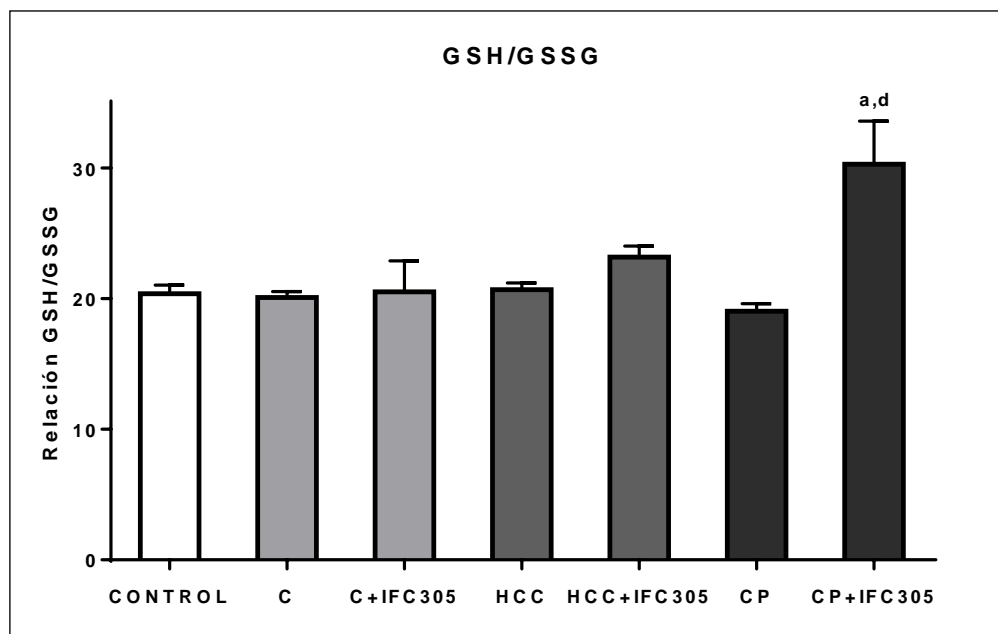


Figura. 20. Determinación de la relación GSH/ GSSG en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN. Los valores

representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IF305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

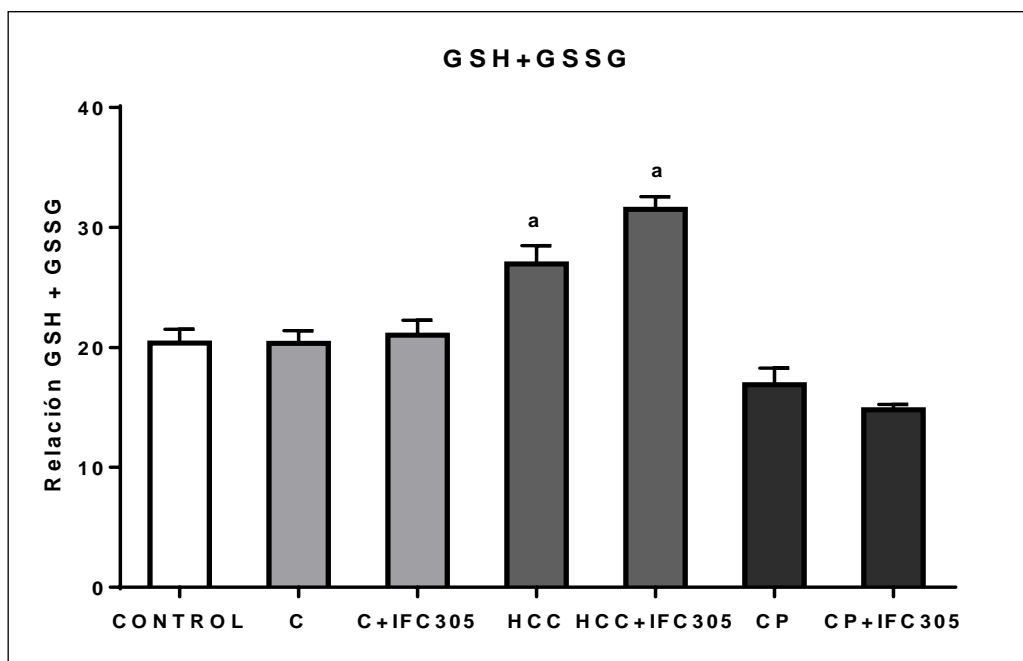


Figura. 21. Determinación de la relación GSH + GSSG en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-cáncer hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media \pm ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IF305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de $P < .05$.

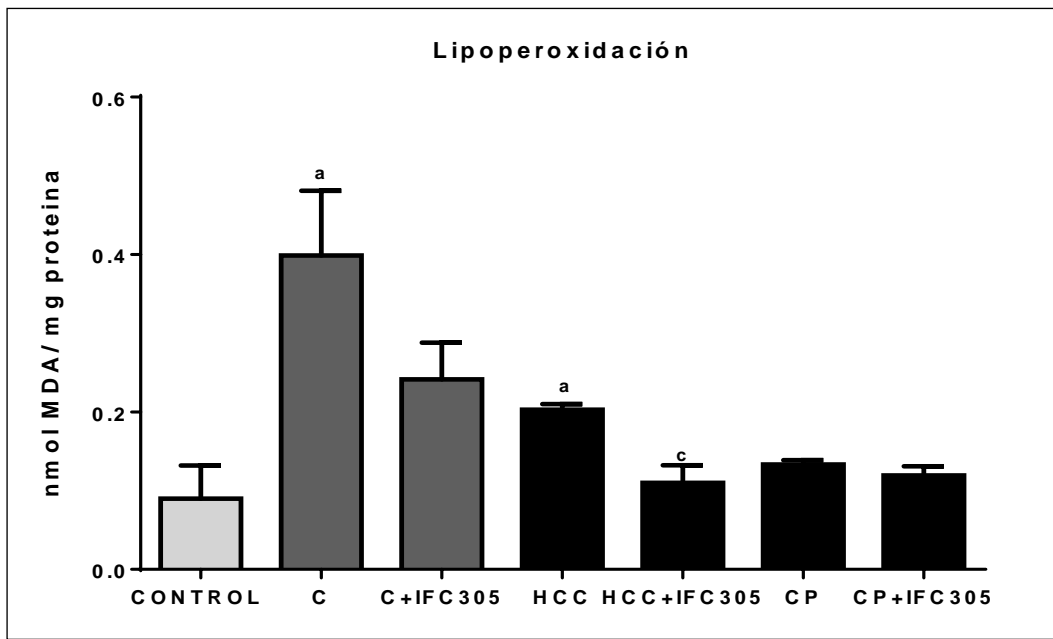


Figura. 22. Estrés oxidativo determinado a través de la peroxidación lipídica determinado por el contenido de malondialdehído (MDA) en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P< .05.

11.4 Efecto del IFC305 en la expresión del gen *Sms* en la hepatocarcinogenesis química inducida en un modelo secuencial cirrosis-carcinoma hepatocelular.

Como se mencionó previamente, los niveles de poliaminas incrementan en diferentes tipos de cáncer [43], una de las poliaminas formadas en esta vía es la espermina, sintetizada por espermina sintasa (SMS) (Figura 5), es por ello que se evaluó el nivel de expresión del gen *Sms* para poder tener un indicio de la participación de la vía de las poliaminas en el efecto del IFC305 como modulador de la biosíntesis de SAM. Como se muestra en la Figura 23, se observó un incremento significativo en la expresión de *Sms* en el grupo HCC y una disminución contundente en la expresión del gen *Sms* en el grupo HCC+IFC305. Por su parte,

el grupo CP muestra una tendencia a incrementar la expresión del gen *Sms*, sin embargo, la expresión de este gen fue marcadamente disminuida con el tratamiento del IFC305 en el grupo CP+IFC305.

Mientras que etapas cirróticas el efecto del compuesto fue contrario a lo observado en etapas de cáncer hepático, observándose una sobre expresión del gen *Sms* con el compuesto IFC305, lo que podría sugerir probablemente proliferación celular en las diferentes etapas de daño hepático crónico.

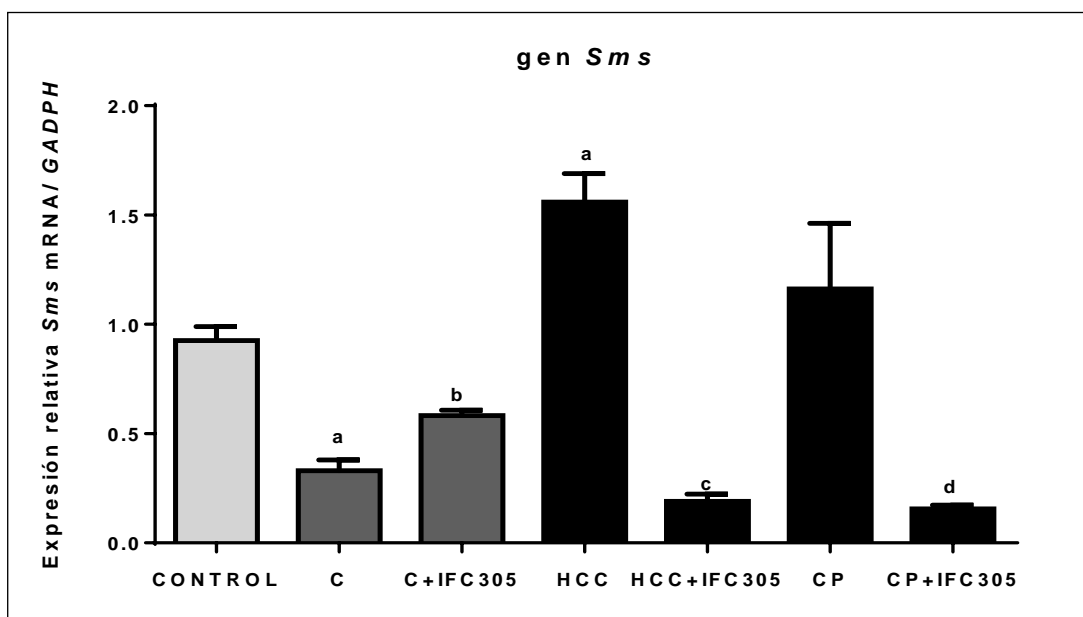


Figura. 23. Determinación de la expresión del gen *Sms* en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IF305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P < .05.

La mitocondria juega un papel importante en la biosíntesis de SAM [5]. Así entonces, se demostró que la administración de IFC305 revirtió los cambios morfológicos y funcionales de la mitocondria dañada con DEN [166]. Sin embargo, la generación de algunos metabolitos considerados epigenéticos (por ejemplo Ac-CoA, NADH⁺, FAD⁺) [173, 174], también es consecuencia de la recuperación de la función

mitocondrial, es por ello que parte de este trabajo también fue determinar las fluctuaciones de algunos sustratos epigenéticos.

11.5 El hepatoprotector, IFC305, incrementa los niveles de Acetil-CoA e Histona H4 hiperacetilada (H4ac) en muestras del modelo secuencial cirrosis-cáncer hepatocelular.

Un intermediario que depende de la energía mitocondrial es el Ac-CoA, sustrato donador del grupo acetilo. De forma muy general, la acetilación de proteínas histonas, en particular, tiene efectos en el epigenoma al poder facilitar la expresión de genes específicos [175].

Sin embargo, la administración de DEN no tuvo efectos significativos en la cantidad de Ac-CoA en los grupos analizados, C y HCC, únicamente mostrando una tendencia de disminuir la cantidad de Ac-CoA en el grupo CP. Mientras que, el tratamiento con el IFC305 incremento significativamente el nivel de Ac-CoA en cada uno de los grupos experimentales C+IFC305, HCC+IFC305 y CP+IFC305 (Fig. 24), favoreciendo la disponibilidad de este sustrato en un modelo experimental de daño hepático crónico.

Estudios previos demostraron que el IFC305 tuvo efectos en la modificación epigenética tal como la acetilación de las histonas en un modelo inducido con CCl₄ [5, 176]. Mientras que en el mismo modelo de daño crónico inducido con DEN utilizado en este trabajo, el IFC305 incrementó el nivel de Ac-CoA [166]. En la Figura 25 se muestra la hiper acetilación de la histona H4. Esta marca epigenética disminuyó en los grupos C, HCC y CP; mientras que en los grupos HCC+IFC305 y CP+IFC305, se observó una tendencia de incremento aunque no se observó significancia estadística. Sin embargo, el grupo C+IFC305 no mostró ningún cambio respecto al grupo Control.

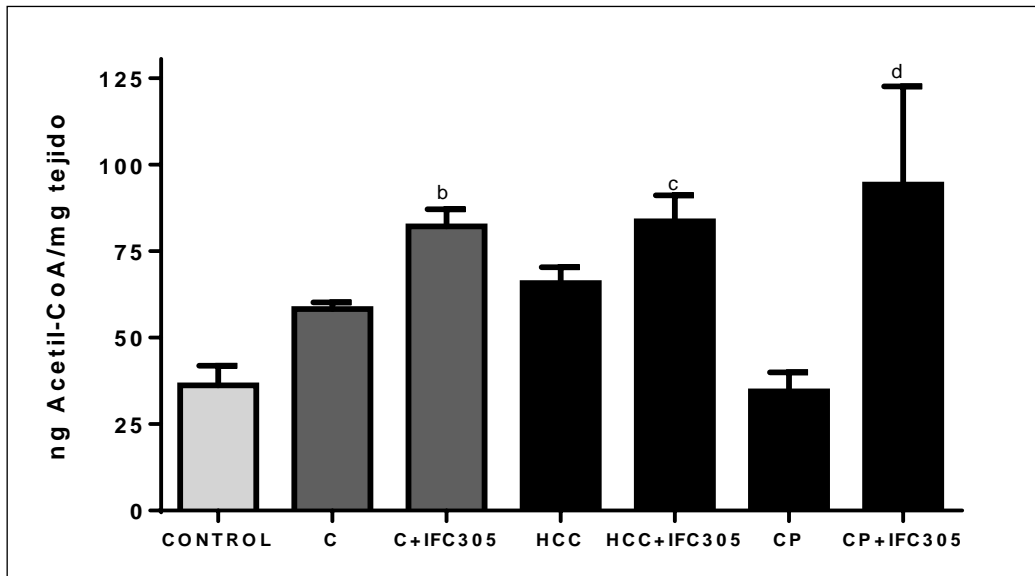


Figura. 24. IFC305 incrementa el nivel de Acetil-CoA en muestras de hígados de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P < .05.

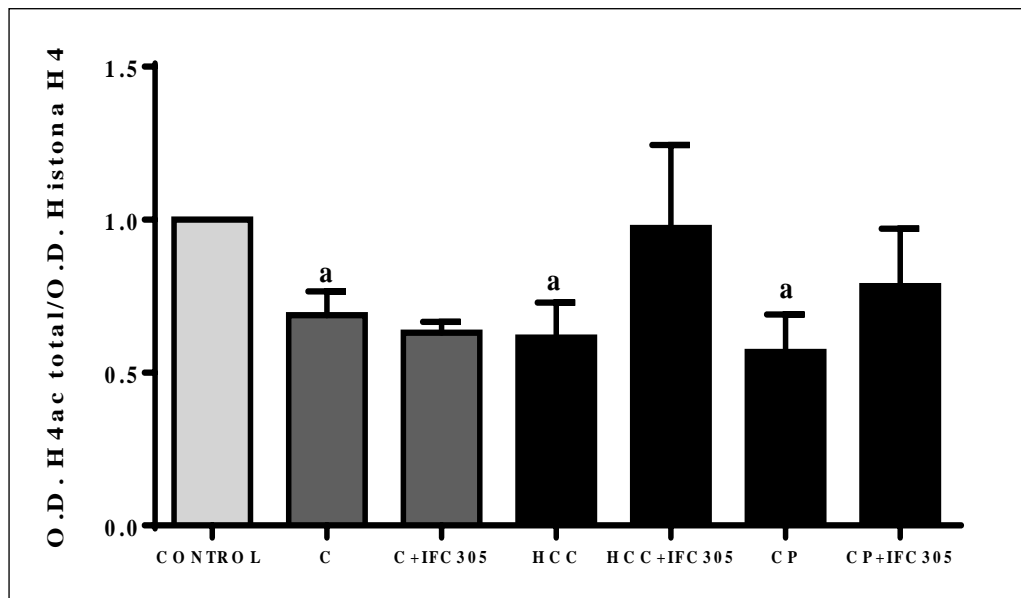


Figura. 25. Nivel de proteína Histona 4 hiperacetilada en fracciones nucleares en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis

(C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P < .05.

11.6 Efecto del IFC305 en los niveles de NAD⁺ / NADH

A partir de los niveles de ácido 3-hidroxiacético y acetoacetato se calculó la relación NAD⁺ / NADH [166]. De las mitocondrias aisladas de los grupos C, HCC y CP se observó una marcada disminución de la relación mitocondrial NAD⁺ / NADH (Figura 26). Mientras que en el grupo HCC+IFC305 hubo una pequeña protección contra el daño causado por el carcinógeno, y en el grupo CP+IFC305 se recuperó el nivel control. Sin embargo, en el grupo C+IFC305 no se presentaron cambios en la relación NAD⁺ / NADH. Por lo que es posible sugerir que el tratamiento con IFC305 mejoró el estado redox mitocondrial el cual fue dañado con la administración del DEN dado que la función mitocondrial requiere una relación NAD⁺ / NADH óptima para ser eficiente.

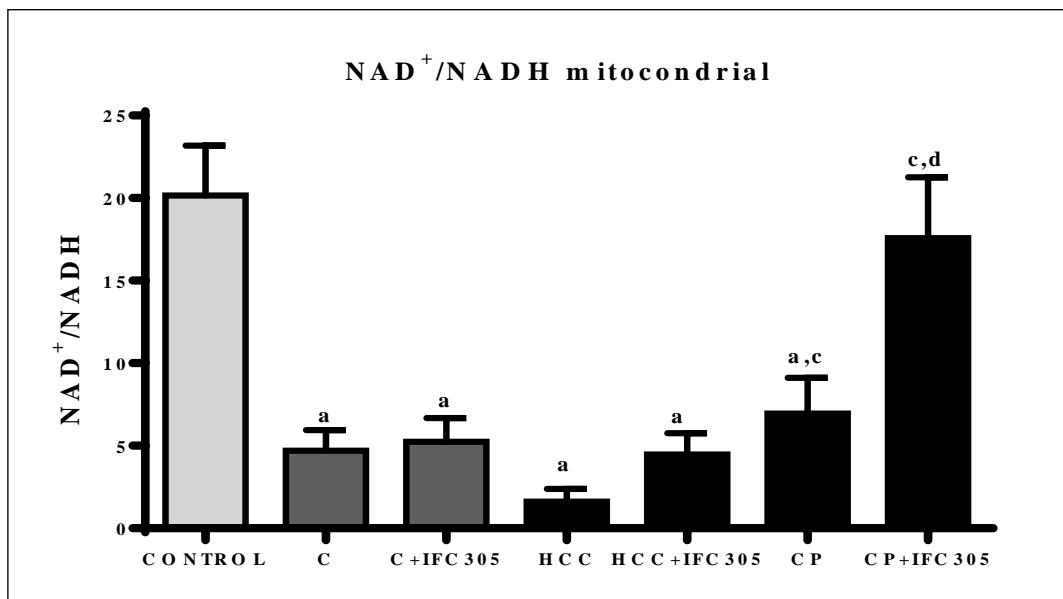


Figura. 26. IFC305 ayuda a incrementa el potencial de óxido-reducción en muestras de hígados de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia

significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P < .05.

11.7 Efecto del IFC305 sobre la expresión del gen *Sirt1*

Se sabe que el RNAm *Sirt1* puede ser blanco de HuR, la cual en estados neoplásicos abunda a nivel citoplásmico, es por ello que al analizar la fluctuación en la expresión de este gen (Figura 27) se observó que el tratamiento con DEN no mostró cambios significativos en la expresión del gen en los grupos C, HCC y CP comparado con el control. Mientras que el tratamiento con el hepatoprotector en los grupos C+IFC305, HCC+IFC305 redujo el nivel de expresión de *Sirt1*. En el caso del grupo C+IFC305 no se presentaron cambios en la expresión del gen respecto al grupo CP.

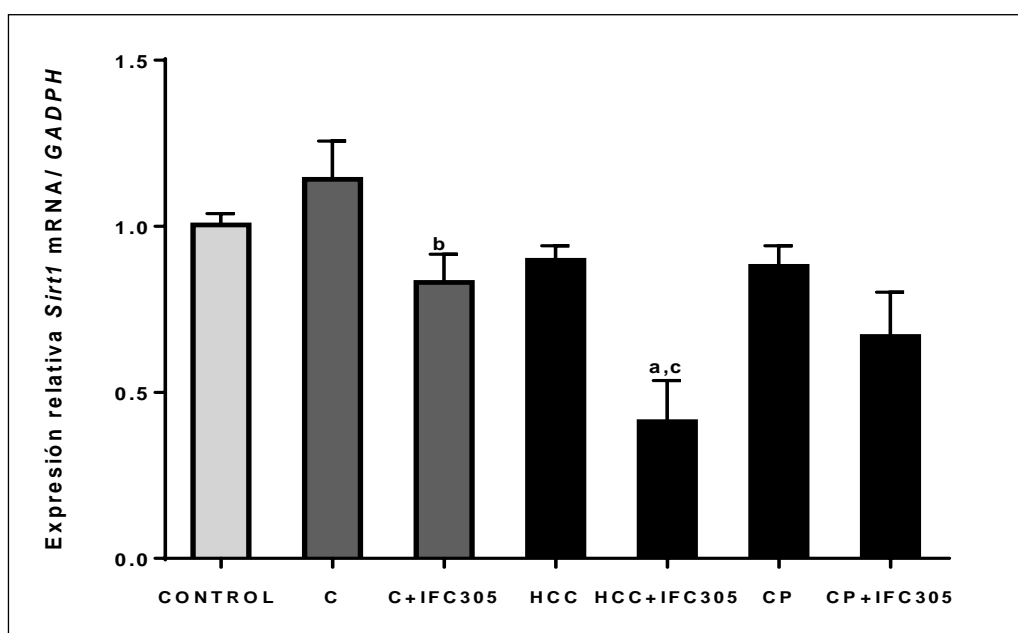


Figura. 27. Nivel de expresión del gen *Sirt1* en muestras de hígado de ratas de los diversos grupos experimentales del modelo secuencial de cirrosis-carcinoma hepatocelular inducido con DEN. Los valores representan la media +/- ES de 5 muestras para cada grupo experimental: Control, Cirrosis (C), Cirrosis+IFC305 (C+IFC305), Carcinoma hepatocelular (HCC), Carcinoma hepatocelular+ IFC305 (HCC+IFC305), Progresión de cáncer (CP), Progresión de cáncer+IFC305 (CP+IFC305). ^a indica diferencia significativa respecto al grupo control, ^b indica diferencia significativa respecto al grupo HCC, ^c indica diferencia significativa respecto al grupo CP, valor de P < .05.

A continuación se muestran los diferentes objetivos específicos y las publicaciones que se desprenden de cada uno de ellos. Las publicaciones son incluidas en el Anexo I.

Tabla 5. Publicaciones incluidas en el trabajo de Tesis.

Objetivo	Artículo
<p>a) Evaluar los niveles de transcrito de la proteína HuR y AUF1 a lo largo del modelo experimental cirrosis-CHC inducido con DEN.</p> <p>b) Evaluar los niveles de Glutación Reducido (GSH) y Glutación Oxidado (GSSG) como principal molécula antioxidante en muestras cirróticas y con CHC bajo la administración de DEN y el efecto del IFC305</p> <p>c) Determinar nivel de lipoperoxidación a lo largo del modelo experimental bajo la administración de DEN e IFC305</p>	<p>Lozano-Rosas MG, et al, Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative, Cancer Biology & Therapy, September 2019.</p>
<p>a) Determinar el nivel de Acetil coenzima A (Acetil-CoA) en muestras de hígado de los diversos grupos experimentales del modelo cirrosis-CHC</p> <p>b) Estudiar los niveles de transcrito de la proteína Sirt1, en muestras cirróticas y con CHC bajo la</p>	<p>Chávez E, Lozano-Rosas MG, et al, Functional, Metabolic, and Dynamic Mitochondrial Changes in the Rat Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Model and the Protective Effect of IFC-305, J Pharmacol Exp Ther 361:292–302, May 2017</p>

<p>administración de DEN y del IFC305.</p> <p>c) Evaluar la relación NAD⁺/NADH como principal cosustrato de Desacetilasas de Histonas tipo Sirtuinas en muestras cirróticas y con CHC bajo la administración de DEN y el efecto del IFC305</p> <p>d) Determinar la cantidad de proteína H4 acetilada total en muestras hepáticas del modelo <i>in vivo</i> secuencial cirrosis-CHC y los cambios ocurridos con la administración del derivado de adenosina.</p>	
--	--

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las enfermedades crónicas hepáticas son una de las principales causas de mortalidad a pesar de la variedad de etiología de la enfermedad. En seres humanos, los tumores hepáticos son una importante causa de mortalidad a nivel mundial [32, 177]. El HCC es el tipo de cáncer hepático más prevalente en la población y desafortunadamente con un pronóstico poco favorable por falta de tratamientos curativos y por una detección en etapas avanzadas de la enfermedad [178, 179]. Múltiples vías de señalización convergen en la patología del HCC, además de una gran variedad de factores de riesgo. En particular, la disminución del metabolismo hepático de metionina se encuentra afectado produciendo a su vez inflamación, lipoperoxidación hepática y la consecuente reducción en la biosíntesis de SAM [180].

El hígado es el principal responsable de la homeostasis metabólica de SAM, este metabolito participa en múltiples reacciones biológicas, como las reacciones de transmetilación; por lo que se le considera el principal donador biológico de grupos metilo en la célula. A través de las reacciones de trans-sulfuración, SAM es precursor de GSH, y adicionalmente SAM participa en las reacciones de aminopropilación; participando en la síntesis de poliaminas [43]. Aunado a ello, SAM también es considerado un regulador crucial de la proliferación de los hepatocitos, siendo capaz de promover una respuesta apoptótica en las células HCC [67, 69, 86]

Tomando en cuenta la importancia de SAM en el tejido hepático, parece ser más claro que su síntesis debe ser estrictamente regulada y que una deficiencia en su biosíntesis tiene repercusiones graves en el estado metabólico del órgano. Las deficiencias graves de SAM favorecen el desarrollo de HCC. Actualmente [181, 182] se sabe que en los diferentes tipos de cáncer, existen regiones del DNA hipermetiladas, por ejemplo zonas de genes considerados como oncogenes, coexistiendo en un contexto global hipometilado [86], todo ello abre la posibilidad de que el IFC305 sea capaz de actuar tanto a nivel metabólico y epigenético.

Como se mencionó previamente, la biosíntesis de SAM requiere metionina y ATP como sustratos para la enzima MAT1A. Sin embargo, estudios previos en hepatotoxicidad inducida con DEN mostraron un desbalance de la carga energética el cual fue recuperado con el derivado de adenosina [166]. Esta modulación ocurre a través de la recuperación de la función y la dinámica mitocondrial observada en el modelo secuencial de daño hepático. Por lo tanto, se sugiere que existe una disponibilidad de Ac-CoA, producto de la recuperación de la función mitocondrial [166]. Así, este resultado podría ser importante dado que podría establecer un vínculo entre la función mitocondrial y el control epigenético que regula la expresión de genes clave en el proceso hepatocarcinogénico. En particular en los genes MAT, se ha predicho que en la cromatina cercana a las regiones promotoras tienen patrones de acetilación aberrantes en células de hepatoma [49, 121, 183]. Sin embargo, la administración del IFC305 en el modelo experimental de cirrosis-HCC aumenta la disponibilidad de Ac-CoA con lo cual la expresión de los genes MAT podría restablecerse a un patrón de expresión de un tejido no dañado.

Las enzimas MAT son las responsables de la síntesis de SAM. En mamíferos, las enzimas MAT están codificadas por dos genes diferentes *Mat1a* y *Mat2a*. *Mat1a* codifica la subunidad catalítica $\alpha 1$, la cual es asociada a dímeros o tetrámeros para conformar las isoenzimas MAT III y MAT I, respectivamente. Mientras que, *Mat2a* codifica para la subunidad catalítica $\alpha 2$ que conforman tetrámeros para MAT II. La expresión de los genes MAT es dependiente de tejido específico y del estado de desarrollo [40]. Sin embargo, en el modelo secuencial de daño hepático crónico inducido con DEN descrito por Schiffer [167], también se evidencio que la expresión del gen *Mat1a* disminuyen junto con un incremento en los niveles de expresión de *Mat2a*, pero el tratamiento IFC305 recuperó el patrón de expresión de los genes MAT *Mat1a:Mat2a* [168].

Diversos autores han mostrado el intercambio de las proteínas MAT y las proteínas RBP en el cáncer hepático en diferentes modelos experimentales de daño hepático [184, 185]. Sin embargo, los resultados obtenidos con este modelo experimental de daño crónico inducido con DEN, evidencian que el nivel de cada uno de los

transcritos de las RBPs se incrementaron en el proceso hepatocarcinogénico, mientras que la administración del IFC305 redujo significativamente la expresión de *HuR* y *AUF1*, así mismo, esto impactó directamente en la cantidad de proteína que detectamos tanto en núcleo como en citoplasma en cada uno de los grupos experimentales analizados con este modelo de daño crónico inducido con DEN [168].

Observaciones pioneras, demostraron que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) induce la fosforilación y activación de LKB1, y consecuentemente la activación de AMPK. Así, la fosforilación de AMPK, induce la translocación de la proteína HuR al citoplasma y así llevar a cabo la modulación en el tiempo de vida media de sus RNAm blanco, entre ellos, *Mat2a*, con lo cual se contribuye al descenso en la síntesis de SAM [40, 86, 186]. Por el contrario, en el hígado sano, SAM es capaz de inhibir el efecto mitogénico de HGF, por la inhibición de la activación de la vía LKB1/AMPK/eNOS, y así impedir la translocación de la proteína HuR, la cual está involucrada en diversos procesos como la estabilización de la progresión del ciclo celular, proliferación, estrés y apoptosis [82, 106].

SAM, además de regular la metilación activa de los ácidos nucleicos y fosfolípidos, también regula la metilación de diversas proteínas entre ellas el balance entre HuR y HuR-metilado [40]. Es por ello, que la enzima glicina N-metiltransferasa (GNMT) es la principal responsable del catabolismo de SAM. La GNMT regula la relación SAM /SAH, la cual puede ser considerada un índice del potencial de transmetilación de la célula [187]. El daño en esta relación puede resultar en patrones aberrantes de metilación. Como consecuencia de la ausencia de la enzima GNMT, modelos experimentales como los ratones GNMT-KO presentan un nivel crónicamente elevado de SAM y espontáneamente pueden desarrollar esteatosis, fibrosis y HCC [59, 64, 68]. Así, altos niveles de SAM podrían metilar a HuR, regulando el nivel de *Mat2a*. Pero contrario a lo que se podría pensar, un nivel alto de SAM no reduce el nivel de la proteína HuR, probablemente debido a la influencia de la activación de la vía de Ras y JAK/STAT [105, 107, 111].

A diferencia de HuR, para AUF1 no se ha descrito claramente algún mecanismo de regulación, pero también responde a varios tipos de estrés que ocurren en la célula que promueven su translocación citoplásmica; sin embargo, nuestros resultados, podrían sugerir la existencia de la regulación post-transcripcional de *Mat1a* y *Mat2a* involucrando dos RBPs, como AUF1 y HuR, respectivamente, en un modelo de daño crónico inducido con DEN pero aún se necesita un soporte experimental mayor para comprobar la interacción de las RBP con las proteínas MAT y evaluar el efecto del IFC305 en un modelo secuencial de daño hepático [168].

Y aunque hasta el momento no se conoce sobre alguna otra RBP que pueda tener como blanco a los transcritos de los genes MAT, es cierto que pueden existir otras posibilidades de modulación como una alteración en el proteasoma, una alteración de la envoltura nuclear, por mencionar algunas posibilidades. Aunque, sin duda la recuperación de la proteína MAT1A [168], uno de los efectos del IFC305, mimetizaría una condición fisiológica sana, ya que esta proteína está altamente implicada en un proceso de diferenciación de las células parenquimales.

Como consecuencia de la desregulación de estos procesos, en el daño hepático crónico la membrana nuclear se hace más permeable debido a el nivel alto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) existentes [188, 189] . Previamente, en el grupo de trabajo se demostró que IFC305 tiene propiedades antioxidantes que reparan la mitocondria [166] y que podrían prevenir la lipoperoxidación. Por lo que probablemente el mecanismo por el cual el IFC305 podría bloquear la translocación núcleo-citosol de HuR y AUF1 es reparando la función mitocondrial e incrementando la carga energética, además de reducir la formación de ROS y reducir la permeabilidad de la membrana nuclear, a reserva de contar con evidencia experimental. Sin embargo, podrían existir múltiples posibilidades fisiológicas, por ejemplo, una disminución en las proteínas que favorecen las translocaciones subcelulares, como la proteína nucleolina 5, o quizá incrementado la degradación de las proteínas RBP una vez en el citoplasma a través de la maquinaria del proteasoma. Y una vez que el IFC305 favorece la localización nuclear de AUF1 y HuR, el RNAm-Mat1a puede ser traducido libremente y así entonces la proteína

MAT1A puede ser ubicuamente expresada en los hepatocitos normales. En el caso de RNAm-Mat2a, la reducción del IFC305 sobre RNAm *HuR* conduciría a una reducción de la proteína HuR en el citosol y por una reducción en la proteína MAT2A, pero todas y cada una de estas posibilidades debe ser corroborada experimentalmente. Pero la evidencia obtenida con este estudio *in vivo* demostró que el IFC305 pudo recuperar la presencia de la proteína MAT1A además de recuperar el nivel de ATP y de SAM, tanto en grupos cirróticos como en grupos con carcinoma hepatocelular [168]. Puesto que como se sabe, la hipometilación que se ha descrito existe en distintas neoplasias y es resultado en parte de la acumulación de SAH, la cual se sabe que es una molécula inhibidora de las reacciones de metilación, repercutiendo en detener la progresión del metabolismo de metionina [48].

Previamente, en el grupo de trabajo se evaluó la metilación global del DNA, a través de la 5´hidroximetil citosina (5´ hmC) en un modelo de cirrosis inducido con CCl₄, observando una hipometilación global, pero con el tratamiento de IFC305 se recuperó el nivel de metilación global [176] y recordando que aproximadamente el 80% de los casos de HCC que son diagnosticados preceden de cirrosis, el IFC305 podría estar participando en frenar la progresión de la enfermedad hepática. Los datos obtenidos en este estudio en el modelo secuencial cirrosis y HCC inducido con DEN muestran el efecto del IFC305 al aumentar el índice de metilación (datos no mostrados en este proyecto de tesis) [168] con lo cual se podría estar hablando de una reversión de este contexto global de hipometilación; sin embargo, se requieren estudios adicionales para analizar esta posibilidad.

Pero como se muestra en los resultados de este trabajo, el IFC305 favoreció el metabolismo de metionina ya que ayudó a recuperar y mantener alto el nivel de glutatión total en el grupo HCC y aunque no se observaron cambios en el contenido de GSH en los grupos CP y CP+IFC305, es importante hacer notar que en ambos grupos se mostró una recuperación de la función mitocondrial debido a la ausencia del DEN en el cuadro de tratamiento desde la semana 16 hasta la semana 22,

además el tratamiento con IFC305 recuperó el estado redox mitocondrial dañado por el carcinógeno [166].

Aunado a ello, el IFC305 recuperó la relación de NAD⁺/NADH, mejorando la función mitocondrial después de discontinuar el tratamiento con DEN (CP+IFC305) [166]. Por lo que al mantener esta relación el complejo I mitocondrial recupera su función y como consecuencia el flujo de electrones de la cadena respiratoria se restablece y la generación de ATP se restablece y con ello, todas las reacciones dependientes de ATP entre ellas la síntesis de SAM [190, 191].

Por otro lado, la síntesis de Ac-CoA, un donador de carbono en reacciones anabólicas, es alterado por la disfunción mitocondrial [192, 193], además este sustrato representa el vínculo para las reacciones de acetilación, dado que en el núcleo la acetilación de las lisinas en las histonas modula la expresión génica a través de la relajación y compactación de la cromatina y aunque el DEN no cambió significativamente el nivel de Ac-CoA con respecto al grupo control, el tratamiento con IFC305 si lo incrementó, todo ello aunado al tenue incremento de H4ac inducido con el tratamiento del IFC305, podría sugerir que los niveles de Ac-CoA regulados por el IFC305 podría afectar la marca de la acetilación de histonas.

Sin embargo, en las células tumorales la Ac-CoA es ectópicamente sintetizada en el núcleo además de estar involucrada en la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA [194]. Pero nuestros resultados confirman que el IFC305 pudo mejorar la integridad metabólica [166]; sin embargo, son necesarios futuros estudios para poder probar si la duplicación de los hepatocitos sanos es facilitada en este modelo de daño crónico inducido con DEN.

En relación con el estrés oxidativo, se sabe que hay un incremento en la expresión del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) [147, 195, 196], y aunado con el incremento en el estrés oxidativo y la depleción en el contenido de GSH podría resultar en una mayor predisposición del daño hepático después del tratamiento con DEN. Por su parte, la carcinogénesis química es fuertemente asociada con la formación de ROS durante su metabolismo [86]. En este estudio se evaluó el daño por peroxidación

lipídica al medir la cantidad de TBARS, incluido el MDA, los resultados obtenidos mostraron un incremento importante en el grupo HCC, el cual fue normalizado con la presencia de IFC305, posiblemente por el efecto que el compuesto tiene en la formación de GSH y la reducción del daño por radicales libres.

La hepatocarcinogenesis también es asociada con un marcado incremento en la vía de las poliaminas, una ruta metabólica relacionada íntimamente con el metabolismo de metionina y la biosíntesis de SAM [43, 59, 197]. Este proceso fue evaluado al medir la expresión del gen *Sms* que codifica para la enzima espermina sintasa, los resultados obtenidos mostraron un incremento en la expresión de este transcrito en los grupos HCC y CP. Y el IFC305, redujo marcadamente la expresión de *Sms*, resultando otra característica anti carcinogénica del hepatoprotector derivado de adenosina. Sin embargo, es preciso evaluar a profundidad esta vía metabólica para determinar el efecto del compuesto hepatoprotector.

Así mismo, los resultados de este estudio reflejan efectos diferenciales del IFC305 en un modelo secuencial de hepatocarcinogenesis inducido con DEN. Estos efectos incluyen un incremento de las reacciones antioxidantes y una inhibición de la síntesis de poliaminas que está relacionada ampliamente con la proliferación celular, y la promoción del carcinoma hepatocelular. Además induce la baja regulación del HGF y de la enzima timidilato sintasa, la cual junto con el aumento de p27, tuvieron como resultado inhibición de la proliferación, confirmando el efecto quimio preventivo del IFC305 [164, 165].

Además de la reactivación del metabolismo de metionina para la biosíntesis de SAM y las demás reacciones de importancia para la célula que se han descrito previamente, el IFC305 también contribuye a la regulación de la poza de metionina de forma directa, ya que se ha descrito que altos niveles de este aminoácido proveen a las células tumorales de una ventaja proliferativa [198, 199]. Mientras que las células normales no se ven afectadas por altos niveles de metionina. Por lo tanto, el IFC305 podría contribuir a la restricción de metionina en células tumorales y con ello reducir el crecimiento de estas células, sin embargo, estudios adicionales son requeridos para la demostración de esta posibilidad.

Aunado a ello, previamente se mencionó que aunque en la actualidad existe el tratamiento en pacientes con SAM, como co-terapia farmacológica, este tratamiento únicamente resuelve la deficiencia de SAM de forma temporal, ya que no se resuelve el problema metabólico de fondo. Así entonces, otra de las ventajas del tratamiento con el hepatoprotector IFC305, es la reactivación del metabolismo de metionina, que favorece el incremento en la síntesis de SAM resultado del aumento del nivel de ATP y el incremento de la proteína MAT1A. Pero las acciones fisiológicas no sólo permanecen a este nivel, ya que modula los niveles de GSH producto de las reacciones de trans-sulfuración, y la síntesis de poliaminas en las reacciones de aminopropilación.

Así entonces, dado que las células tumorales tienen diferentes ventajas denominadas *Hallmarks*, señal proliferativa sostenida, exacerbado crecimiento celular, resistencia a la apoptosis, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, además de propiedades invasivas y metastásicas; las opciones tradicionales de quimioterapia siguen presentando efectos tóxicos que consecuentemente deterioran progresivamente la salud de los pacientes. Es por ello, que la efectividad del compuesto hepatoprotector IFC305 a diferentes niveles, tanto metabólico, mitocondrial como epigenético, muestran que es una sustancia de interés para continuar con su investigación a los diferentes niveles de regulación.

CONCLUSIONES

13. CONCLUSIONES

La cirrosis y el carcinoma hepatocelular inducidos químicamente por el carcinógeno DEN, modificaron la localización y el patrón de expresión de las proteínas MAT, enzimas clave en la biosíntesis de SAM.

Nuestros estudios indicaron que el IFC305 normalizó el ciclo de la metionina que regula el nivel del GSH y la síntesis de poliaminas reduciendo posiblemente la proliferación aberrante de los hepatocitos.

El IFC305 recuperó el nivel de glutatión total, redujo el nivel de TBARS y aumentó la cantidad de NADH mitocondrial, promoviendo así una recuperación del estrés oxidante ocasionado por el carcinógeno DEN.

El IFC305 disminuyó la expresión de los genes *HuR* y *Auf1* los cuales se encontraron alterados en el modelo de hepatocarcinogenesis empleado, con lo cual fue posible normalizar la expresión de los genes *Mat2a:Mat1a*.

Además el IFC305 también redujo la expresión del gen *Sirt1* el cual se encuentra estrechamente relacionado con *HuR* y *Mat2a*.

Los cambios en el metabolismo de metionina y SAM inducidos por DEN contribuyen indiscutiblemente a la generación de HCC. Sin embargo, los cambios inducidos por el IFC305 mantienen los niveles fisiológicos de SAM, ayudan a su metabolismo y la función hepática, con lo cual podrían ser blancos terapéuticos en lesiones pre neoplásicas y tumores hepáticos.

PERSPECTIVAS

14. PERSPECTIVAS

- * Caracterizar el estado de metilación en el promotor de *Mat1a* y *Mat2a* con la técnica de modificación de citosinas no metiladas mediante bisulfito de sodio en el modelo secuencial de cirrosis-HCC para evaluar el efecto del IFC305.
- * Caracterizar el mecanismo por el cual las RBP HuR y AUF1 pueden llevar a cabo la translocación núcleo-citoplasma en los diferentes grupos experimentales tratados con DEN e IFC305.
- * Estudiar las modificaciones en el patrón de acetilación y metilación de las histonas situadas en el promotor de *Mat1a* y *Mat2a* en los diferentes estados del modelo de cirrosis-HCC estudiado para evaluar el efecto del IFC305.

BIBLIOGRAFÍA

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S5-S16.
2. Drucker, R., *Fisiología Médica* 2005, México: Manual Moderno.
3. Wake, K., *Hepatic stellate cells: Three-dimensional structure, localization, heterogeneity and development*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2006. **82**(4): p. 155-64.
4. Mak, K.M. and C.Y.M. Png, *The Hepatic Central Vein: Structure, Fibrosis, and Role in Liver Biology*. Anat Rec (Hoboken), 2020. **303**(7): p. 1747-1767.
5. Chagoya de Sánchez V, P.-C.J., Velasco-Loyden G, Rodríguez-Aguilera JR, Pérez-Cabeza de Vaca R, Domínguez-López M, Lozano-Rosas MG, Chávez E, *Estudio Integral de Cirrosis y Carcinoma Hepatocelular*. Rev Fac Med, UNAM, 2018. **42**: p. 130-146.
6. Groger, M., et al., *Preservation of Cell Structure, Metabolism, and Biotransformation Activity of Liver-On-Chip Organ Models by Hypothermic Storage*. Adv Healthc Mater, 2018. **7**(2).
7. Weiss, M., *Fractal structure of the liver: effect on drug elimination*. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2013. **40**(1): p. 11-4.
8. Yokomori, H., et al., *Recent advances in liver sinusoidal endothelial ultrastructure and fine structure immunocytochemistry*. Micron, 2012. **43**(2-3): p. 129-34.
9. Herrerías, J.M., *Tratado de Hepatología* 1996, España: Universidad de Sevilla.
10. Klaunig, J.E., X. Li, and Z. Wang, *Role of xenobiotics in the induction and progression of fatty liver disease*. Toxicol Res (Camb), 2018. **7**(4): p. 664-680.
11. Hardwick, R.N. and N.J. Cherrington, *Measuring altered disposition of xenobiotics in experimental models of liver disease*. Curr Protoc Toxicol, 2012. **Chapter 23**: p. Unit 23 1.
12. Chuang, S.C., C. La Vecchia, and P. Boffetta, *Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection*. Cancer Lett, 2009. **286**(1): p. 9-14.
13. Popping, S., et al., *The global campaign to eliminate HBV and HCV infection: International Viral Hepatitis Elimination Meeting and core indicators for development towards the 2030 elimination goals*. J Virus Erad, 2019. **5**(1): p. 60-66.
14. Natarajan, Y., et al., *Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Normal Liver Enzymes*. Hepatology, 2020.
15. Wu, D.B. and H. Tang, *[Advances in the study of cirrhosis and precancerous lesions of liver cancer]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2019. **27**(7): p. 483-486.
16. Fauci, A., et al., *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17° ed 2009, China.
17. Kanwal, F., et al., *Effect of Metabolic Traits on the Risk of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Hepatology, 2020. **71**(3): p. 808-819.

18. Chung, W., et al., *Liver cirrhosis and cancer: comparison of mortality*. Hepatol Int, 2018. **12**(3): p. 269-276.
19. La Vecchia, C., et al., *Liver cirrhosis and the risk of primary liver cancer*. Eur J Cancer Prev, 1998. **7**(4): p. 315-20.
20. Sorensen, H.T., et al., *Risk of liver and other types of cancer in patients with cirrhosis: a nationwide cohort study in Denmark*. Hepatology, 1998. **28**(4): p. 921-5.
21. Zhuravlev, V.A. and V.I. Agalakov, [*Hepatocellular cancer with a background of liver cirrhosis*]. Klin Med (Mosk), 1996. **74**(2): p. 2-5.
22. Colombo, M. and A. Lleo, *Refining surgical therapy of liver cancer in cirrhosis: etiology makes the difference*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2018. **3**: p. 104.
23. Yang, J., et al., *Global Mortality Burden of Cirrhosis and Liver Cancer Attributable to Injection Drug Use, 1990-2016: An Age-Period-Cohort and Spatial Autocorrelation Analysis*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(1).
24. Qin, L., et al., *Pattern characteristics in patients with primary liver cancer in different clinical stages*. J Tradit Chin Med, 2015. **35**(1): p. 47-53.
25. Fang, J.Y., et al., *Liver cancer mortality characteristics and trends in China from 1991 to 2012*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(5): p. 1959-64.
26. Sharma, R., *Descriptive epidemiology of incidence and mortality of primary liver cancer in 185 countries: evidence from GLOBOCAN 2018*. Jpn J Clin Oncol, 2020.
27. Carrilho, F.J., et al., *Epidemiology of Liver Cancer in Latin America: Current and Future Trends*. Semin Liver Dis, 2020. **40**(2): p. 101-110.
28. Li, C., et al., *Primary liver cancer presenting as pyogenic liver abscess: characteristics, diagnosis, and management*. J Surg Oncol, 2012. **105**(7): p. 687-91.
29. Pignata, S., et al., *Characteristics at presentation and outcome of hepatocellular carcinoma (HCC) in the elderly. A study of the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP)*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **59**(3): p. 243-9.
30. Taniai, M., [*Liver cancer: progress in diagnosis and treatments. Topics: I. Epidemiology of hepatocellular carcinoma*]. Nihon Naika Gakkai Zasshi, 2014. **103**(1): p. 4-10.
31. Hagymasi, K. and Z. Tulassay, [*Epidemiology, risk factors and molecular pathogenesis of primary liver cancer*]. Orv Hetil, 2008. **149**(12): p. 541-8.
32. Li, L. and H. Wang, *Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy*. Cancer Lett, 2016. **379**(2): p. 191-7.
33. Kirk, G.D., E. Bah, and R. Montesano, *Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, West Africa*. Carcinogenesis, 2006. **27**(10): p. 2070-82.
34. Lin, J., et al., *Alterations in DNA Damage Repair Genes in Primary Liver Cancer*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(15): p. 4701-4711.
35. Jimenez, M., et al., *Splicing alterations contributing to cancer hallmarks in the liver: central role of dedifferentiation and genome instability*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2018. **3**: p. 84.
36. Abou-Alfa, G.K., *The Use of Genetic Alterations in the Development of Liver Cancer Drugs*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2015. **11**(12): p. 833-5.

37. Lu, S.C., *Methionine adenosyltransferase and liver disease: it's all about SAM*. Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 403-7.
38. Anstee, Q.M. and C.P. Day, *S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility*. J Hepatol, 2012. **57**(5): p. 1097-109.
39. Visioli, F., et al., *S-adenosyl-L-methionine: role in phosphatidylcholine synthesis and in vitro effects on the ethanol-induced alterations of lipid metabolism*. Pharmacol Res, 1998. **37**(3): p. 203-6.
40. Vazquez-Chantada, M., et al., *HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed during liver proliferation, differentiation, and carcinogenesis*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1943-53.
41. Varela-Moreiras, G., et al., *Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment*. Hepatology, 1995. **22**(4 Pt 1): p. 1310-5.
42. van der Westhuyzen, J., *Methionine metabolism and cancer*. Nutr Cancer, 1985. **7**(3): p. 179-83.
43. Tomasi, M.L., et al., *Polyamine and methionine adenosyltransferase 2A crosstalk in human colon and liver cancer*. Exp Cell Res, 2013. **319**(12): p. 1902-11.
44. Simile, M.M., et al., *Alterations of methionine metabolism in hepatocarcinogenesis: the emergent role of glycine N-methyltransferase in liver injury*. Ann Gastroenterol, 2018. **31**(5): p. 552-560.
45. Sanderson, S.M., et al., *Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(11): p. 625-637.
46. Ramani, K., J.M. Mato, and S.C. Lu, *Role of methionine adenosyltransferase genes in hepatocarcinogenesis*. Cancers (Basel), 2011. **3**(2): p. 1480-97.
47. Ramani, K. and S.C. Lu, *Methionine adenosyltransferases in liver health and diseases*. Liver Res, 2017. **1**(2): p. 103-111.
48. Pascale, R.M., et al., *Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine*. Alcohol, 2002. **27**(3): p. 193-8.
49. Pascale, R.M., et al., *Alterations of Methionine Metabolism as Potential Targets for the Prevention and Therapy of Hepatocellular Carcinoma*. Medicina (Kaunas), 2019. **55**(6).
50. Pascale, R.M., et al., *Deregulation of methionine metabolism as determinant of progression and prognosis of hepatocellular carcinoma*. Transl Gastroenterol Hepatol, 2018. **3**: p. 36.
51. Pajares, M.A., et al., *How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated?* FEBS Lett, 1992. **309**(1): p. 1-4.
52. Mato, J.M. and P. Ortiz, *Metabolism of methionine in liver disease*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1996. **18 Suppl B**: p. 35-46.
53. Mato, J.M., M.L. Martinez-Chantar, and S.C. Lu, *S-adenosylmethionine metabolism and liver disease*. Ann Hepatol, 2013. **12**(2): p. 183-9.
54. Mato, J.M., M.L. Martinez-Chantar, and S.C. Lu, *Methionine metabolism and liver disease*. Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 273-93.
55. Mato, J.M., A. Martin Duce, and P. Ortiz, *[Changes in S-adenosylmethionine metabolism in liver cirrhosis]*. Rev Clin Esp, 1988. **182**(1): p. 1-2.

56. Mato, J.M., et al., *S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function*. *Faseb Journal*, 2002. **16**(1): p. 15-26.
57. Mato, J.M., et al., *S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications*. *Pharmacol Ther*, 1997. **73**(3): p. 265-80.
58. Martinez-Una, M., et al., *Excess S-adenosylmethionine reroutes phosphatidylethanolamine towards phosphatidylcholine and triglyceride synthesis*. *Hepatology*, 2013. **58**(4): p. 1296-305.
59. Martinez-Lopez, N., et al., *S-adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 5): p. 848-52.
60. Martinez-Cuesta Mdel, C., C. Pelaez, and T. Requena, *Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulfur compounds in cheese*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2013. **53**(4): p. 366-85.
61. Martinez-Chantar, M.L., et al., *L-methionine availability regulates expression of the methionine adenosyltransferase 2A gene in human hepatocarcinoma cells: role of S-adenosylmethionine*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(22): p. 19885-90.
62. Martinez-Chantar, M.L., et al., *Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002. **76**(5): p. 1177S-82S.
63. Maldonado, L.Y., et al., *Methionine adenosyltransferases in cancers: Mechanisms of dysregulation and implications for therapy*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017: p. 1535370217740860.
64. Luka, Z., et al., *Mutations in human glycine N-methyltransferase give insights into its role in methionine metabolism*. *Hum Genet*, 2002. **110**(1): p. 68-74.
65. Martinez, Y., et al., *The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases*. *Amino Acids*, 2017. **49**(12): p. 2091-2098.
66. Lu, S.C., H. Tsukamoto, and J.M. Mato, *Role of abnormal methionine metabolism in alcoholic liver injury*. *Alcohol*, 2002. **27**(3): p. 155-62.
67. Lu, S.C., et al., *S-adenosylmethionine in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma in a rat model*. *Hepatology*, 2009. **50**(2): p. 462-71.
68. Lu, S.C. and J.M. Mato, *S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(4): p. 1515-42.
69. Lu, S.C. and J.M. Mato, *S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23 Suppl 1**: p. S73-7.
70. Lu, S.C. and J.M. Mato, *Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcohol-associated liver cancer*. *Alcohol*, 2005. **35**(3): p. 227-34.
71. Lu, S.C., M.L. Martinez-Chantar, and J.M. Mato, *Methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcoholic liver disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006. **21 Suppl 3**: p. S61-4.
72. Lu, S.C., et al., *Changes in methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine homeostasis in alcoholic rat liver*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(1): p. G178-85.

73. Lu, S.C., *S-Adenosylmethionine*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. **32**(4): p. 391-5.
74. Livesey, G. and P. Lund, *Methionine metabolism via the transamination pathway in rat liver*. *Biochem Soc Trans*, 1980. **8**(5): p. 540-1.
75. Lieber, C.S. and L. Packer, *S-adenosylmethionine: molecular, biological, and clinical aspects - an introduction*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002. **76**(5): p. 1148s-1150s.
76. Kotb, M. and A.M. Geller, *Methionine adenosyltransferase: structure and function*. *Pharmacol Ther*, 1993. **59**(2): p. 125-43.
77. Kharbanda, K.K., *Alcoholic liver disease and methionine metabolism*. *Semin Liver Dis*, 2009. **29**(2): p. 155-65.
78. Kalhan, S.C., et al., *Methionine and protein metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: evidence for lower rate of transmethylated methionine*. *Clin Sci (Lond)*, 2011. **121**(4): p. 179-89.
79. Kalhan, S.C., *Metabolism of methionine in vivo: impact of pregnancy, protein restriction, and fatty liver disease*. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 2009. **63**: p. 121-31; discussion 131-3, 259-68.
80. Hoffman, R.M., et al., *Altered Methionine Metabolism in Cancer Cells*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1866**: p. 13-26.
81. Higashi, T., *Impaired metabolism of methionine in severe liver diseases. II. Clinical and experimental studies on role of impaired methionine metabolism in pathogenesis of hepatic encephalopathy*. *Gastroenterol Jpn*, 1982. **17**(2): p. 125-34.
82. Gomez-Santos, L., et al., *SAMe and HuR in liver physiology: usefulness of stem cells in hepatic differentiation research*. *Methods Mol Biol*, 2012. **826**: p. 133-49.
83. Gasso, M., et al., *Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis*. *J Hepatol*, 1996. **25**(2): p. 200-5.
84. Garcia-Trevijano, E.R., et al., *S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat hepatocytes: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance of the differentiated status of the liver*. *Faseb Journal*, 2000. **14**(15): p. 2511-8.
85. Frau, M., et al., *Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression*. *Hepatology*, 2012. **56**(1): p. 165-75.
86. Frau, M., F. Feo, and R.M. Pascale, *Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis*. *J Hepatol*, 2013. **59**(4): p. 830-41.
87. Sapienza, C. and J.P. Issa, *Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics*. *Annu Rev Nutr*, 2016. **36**: p. 665-81.
88. Niculescu, M.D., *Nutritional epigenetics*. *ILAR J*, 2012. **53**(3-4): p. 270-8.
89. Alonso, C., et al., *Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(6): p. 1449-1461 e7.
90. Pajares, M.A., et al., *Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(25): p. 17598-605.

91. Martinez-Chantar, M.L., et al., *Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A*. *Faseb Journal*, 2002. **16**(10): p. 1292-4.
92. Lu, S.C., *Glutathione synthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(5): p. 3143-53.
93. Lu, S.C., et al., *Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(10): p. 5560-5.
94. Lozano-Sepulveda, S.A., et al., *S-adenosyl-L-methionine modifies antioxidant-enzymes, glutathione-biosynthesis and methionine adenosyltransferases-1/2 in hepatitis C virus-expressing cells*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(14): p. 3746-57.
95. Finkelstein, J.D., *Methionine metabolism in liver diseases*. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003. **77**(5): p. 1094-5.
96. Zubieta-Franco, I., et al., *Methionine and S-adenosylmethionine levels are critical regulators of PP2A activity modulating lipophagy during steatosis*. *J Hepatol*, 2016. **64**(2): p. 409-418.
97. Shyh-Chang, N., et al., *Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation*. *Science*, 2013. **339**(6116): p. 222-6.
98. Ramani, K., et al., *Changes in the expression of methionine adenosyltransferase genes and S-adenosylmethionine homeostasis during hepatic stellate cell activation*. *Hepatology*, 2010. **51**(3): p. 986-95.
99. Herath, N.I., B.A. Leggett, and G.A. MacDonald, *Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006. **21**(1 Pt 1): p. 15-21.
100. Wang, H., et al., *The structure of the ARE-binding domains of Hu antigen R (HuR) undergoes conformational changes during RNA binding*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2013. **69**(Pt 3): p. 373-80.
101. Lu, J.Y. and R.J. Schneider, *Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12974-9.
102. Trojanowicz, B., H. Dralle, and C. Hoang-Vu, *AUF1 and HuR: possible implications of mRNA stability in thyroid function and disorders*. *Thyroid Res*, 2011. **4 Suppl 1**: p. S5.
103. Dong, R., et al., *HuR: a promising therapeutic target for angiogenesis*. *Gland Surg*, 2014. **3**(3): p. 203-6.
104. Abdelmohsen, K., et al., *Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression*. *Mol Cell*, 2007. **25**(4): p. 543-57.
105. Zucal, C., et al., *Targeting the multifaceted HuR protein, benefits and caveats*. *Curr Drug Targets*, 2015. **16**(5): p. 499-515.
106. Martinez-Chantar, M.L., et al., *S-adenosylmethionine regulates cytoplasmic HuR via AMP-activated kinase*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(1): p. 223-32.
107. Zhang, C., et al., *Cytoplasmic expression of the ELAV-like protein HuR as a potential prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(1): p. 73-80.

108. Iruarrizaga-Lejarreta, M., et al., *The RNA-binding protein human antigen R controls global changes in gene expression during Schwann cell development.* J Neurosci, 2012. **32**(14): p. 4944-58.
109. Gouble, A. and D. Morello, *Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development.* Oncogene, 2000. **19**(47): p. 5377-84.
110. Yoon, J.H., et al., *Tyrosine phosphorylation of HuR by JAK3 triggers dissociation and degradation of HuR target mRNAs.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 1196-208.
111. Yang, H., et al., *Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells.* J Biol Chem, 2013. **288**(32): p. 23161-70.
112. Woodhoo, A., et al., *Human antigen R contributes to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis.* Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1870-82.
113. Lopez de Silanes, I., et al., *Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis.* Oncogene, 2003. **22**(46): p. 7146-54.
114. Raineri, I., et al., *Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(4): p. 1279-88.
115. Yang, Y., et al., *AU-binding factor 1 expression was correlated with metadherin expression and progression of hepatocellular carcinoma.* Tumour Biol, 2014. **35**(3): p. 2747-51.
116. Yusup, A., et al., *Clinical features and prognosis in colorectal cancer patients with different ethnicities in Northwest China.* World J Gastroenterol, 2013. **19**(41): p. 7183-8.
117. Wang, J., et al., *Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10015-41.
118. Wei, Y.C., et al., *HuR cytoplasmic expression is associated with increased cyclin A expression and inferior disease-free survival in patients with gastrointestinal stromal tumours (GISTs).* Histopathology, 2013. **63**(4): p. 445-54.
119. Wang, W., et al., *AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3425-36.
120. Yoon, J.H., et al., *AUF1 promotes let-7b loading on Argonaute 2.* Genes Dev, 2015. **29**(15): p. 1599-604.
121. Yang, H., et al., *Role of promoter methylation in increased methionine adenosyltransferase 2A expression in human liver cancer.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(2): p. G184-90.
122. Rada, P., et al., *SIRT1 Controls Acetaminophen Hepatotoxicity by Modulating Inflammation and Oxidative Stress.* Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(13): p. 1187-1208.
123. Jeong, Y., et al., *Histone deacetylase isoforms regulate innate immune responses by deacetylating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1.* J Leukoc Biol, 2014. **95**(4): p. 651-9.

124. Zhang, M. and W. Ying, *NAD(+) Deficiency Is a Common Central Pathological Factor of a Number of Diseases and Aging: Mechanisms and Therapeutic Implications*. Antioxid Redox Signal, 2018.
125. Sharif, T., et al., *Regulation of Cancer and Cancer-Related Genes via NAD()*. Antioxid Redox Signal, 2018.
126. Khoury, N., et al., *The NAD(+)-Dependent Family of Sirtuins in Cerebral Ischemia and Preconditioning*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(8): p. 691-710.
127. Hassinen, I.E., *Signaling and Regulation Through the NAD(+) and NADP(+) Networks*. Antioxid Redox Signal, 2018.
128. D'Onofrio, N., L. Servillo, and M.L. Balestrieri, *SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(8): p. 711-732.
129. Dong, Y.J., et al., *Renal protective effect of sirtuin 1*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 843786.
130. Zhang, L., et al., *Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis*. Faseb Journal, 2014. **28**(3): p. 1435-45.
131. Argus, M.F. and C. Hoch-Ligeti, *Comparative study of the carcinogenic activity of nitrosamines*. J Natl Cancer Inst, 1961. **27**: p. 695-709.
132. Weisburger, J.H., E.K. Weisburger, and N. Mantel, *New carcinogenic nitrosamines in rats*. Naturwissenschaften, 1966. **53**(19): p. 508.
133. Shvemberger, I.N., *[Carcinogenic nitrosamines]*. Vopr Onkol, 1967. **13**(1): p. 97-105.
134. Guerra, D., et al., *S-Nitrosation of Conserved Cysteines Modulates Activity and Stability of S-Nitrosoglutathione Reductase (GSNOR)*. Biochemistry, 2016. **55**(17): p. 2452-64.
135. Aune, T., *Nitrite, nitrosamines and cancer*. Nord Vet Med, 1972. **24**(7): p. 356-69.
136. Gao, J., et al., *High CYP2E1 activity correlates with hepatofibrogenesis induced by nitrosamines*. Oncotarget, 2017. **8**(68): p. 112199-112210.
137. Li, H., et al., *N-nitrosamines are associated with shorter telomere length*. Scand J Work Environ Health, 2011. **37**(4): p. 316-24.
138. Brown, J.L., *N-Nitrosamines*. Occup Med, 1999. **14**(4): p. 839-48.
139. Archer, M.C., et al., *Reactive metabolites from N-nitrosamines*. Adv Exp Med Biol, 1991. **283**: p. 521-4.
140. *Nitrosamines and cancer*. Nutr Rev, 1975. **33**(1): p. 19-20.
141. Ahotupa, M., et al., *Rapid oxidative stress induced by N-nitrosamines*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **146**(3): p. 1047-54.
142. *Nitrites, nitrosamines, and cancer*. Lancet, 1968. **1**(7551): p. 1071-2.
143. Lin, J.K., *Nitrosamines as potential environmental carcinogens in man*. Clin Biochem, 1990. **23**(1): p. 67-71.
144. Castonguay, A., et al., *Study of DNA methylation by tobacco-specific N-nitrosamines*. Environ Health Perspect, 1985. **62**: p. 197-202.
145. Kawanishi, T., et al., *Relation between hepatic microsomal metabolism of N-nitrosamines and cytochrome P-450 species*. Biochem Pharmacol, 1985. **34**(7): p. 919-24.

146. Tu, Y.Y. and C.S. Yang, *Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes*. Arch Biochem Biophys, 1985. **242**(1): p. 32-40.
147. Yang, C.S., et al., *Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes*. Cancer Res, 1985. **45**(3): p. 1140-5.
148. Lijinsky, W. and R.M. Kovatch, *The effect of age on susceptibility of rats to carcinogenesis by two nitrosamines*. Jpn J Cancer Res, 1986. **77**(12): p. 1222-6.
149. Dominguez, M., J. Colmenero, and R. Bataller, *[Treatment of liver fibrosis]*. Gastroenterol Hepatol, 2009. **32**(9): p. 627-32.
150. Bataller, R., et al., *Fibrosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(2): p. 231-44.
151. Chagoya-de Sanchez, V., J.A. Suarez-Cuenca, and R. Hernandez-Munoz, *Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis*. Gac Med Mex, 2007. **143**(1): p. 44-50.
152. Chagoya-de-Sánchez, V., J.A. Suárez, and R. Hernández-Muñoz, *Investigación y desarrollo de un fármaco para el tratamiento de la cirrosis*. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2005. **8**(2): p. 106-114.
153. Pérez-Cabeza-de-Vaca, R., *Efecto del hepatoprotector IFC-305 en las células de Kupffer en el modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄*, in *Biología Celular 2012*, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
154. Perez-Carreón, J.I., et al., *An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl₄-induced rat cirrhosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(2): p. 287-96.
155. Chagoya de Sánchez, V., et al., *Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase*. J Biochem Toxicol., 1995. **10**(1): p. 41-50.
156. Chagoya de Sanchez, V., et al., *Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation*. Int J Biochem, 1991. **23**(12): p. 1439-43.
157. Chagoya de Sánchez, V., *Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms?* Can J Physiol Pharmacol. , 1995. **73**(3): p. 339-355.
158. Chagoya de Sanchez, V., A. Brunner, and E. Piña, *In vivo modification of the energy charge in the liver cell*. Biochemical and Biophysical Reserach Communications, 1972. **46**(3): p. 1441-1445.
159. Garcia-Sainz, J.A., et al., *Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine*. Biochem Pharmacol, 1979. **28**(8): p. 1409-13.
160. Hernandez-Munoz, R., et al., *On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine*. Arch Biochem Biophys, 1978. **190**(1): p. 155-62.
161. Garcia-Sainz, J.A., et al., *Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism*. Biochem Pharmacol, 1980. **29**(12): p. 1709-14.

162. Hernandez-Munoz, R., et al., *Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride*. *Biochem Pharmacol*, 1984. **33**(16): p. 2599-604.
163. Velasco-Loyden, G., et al., *Cancer Chemopreventive Effect of an Adenosine Derivative in a Model of Cirrhosis Hepatocellular Carcinoma Induced by Diethylnitrosamine in Rats*. *Tumor Biology*, 2016. **in press**.
164. Velasco-Loyden, G., et al., *Cancer chemoprevention by an adenosine derivative in a model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(2): p. 1010428317691190.
165. Velasco-Loyden, G., et al., *Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(11): p. 1690-9.
166. Chavez, E., et al., *Functional, Metabolic, and Dynamic Mitochondrial Changes in the Rat Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Model and the Protective Effect of IFC-305*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017. **361**(2): p. 292-302.
167. Schiffer, E., et al., *Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis*. *Hepatology*, 2005. **41**(2): p. 307-14.
168. Lozano-Rosas, M.G., et al., *Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative*. *Cancer Biol Ther*, 2020. **21**(1): p. 81-94.
169. INEGI. *Principales causas de mortalidad por residencia habitual, sexo y grupo de edad del fallecido*. Domingo 27 de noviembre 2011]; Available from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/tabulados/PC.asp?s=est&c=11817>.
170. Fernández, E. and A. Galván. *Métodos para la Cuantificación de Proteínas*. 2001 [cited 2012 25 de marzo]; Available from: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>.
171. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
172. Frau, M., et al., *Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma*. *Mol Aspects Med*, 2010. **31**(2): p. 179-93.
173. Wallace, D.C., *Mitochondria and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(10): p. 685-98.
174. Ubah, O.C. and H.M. Wallace, *Cancer therapy: Targeting mitochondria and other sub-cellular organelles*. *Curr Pharm Des*, 2014. **20**(2): p. 201-22.
175. Zhao, J., et al., *Unmasking the pathological and therapeutic potential of histone deacetylases for liver cancer*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. **13**(3): p. 247-256.
176. Rodriguez-Aguilera, J.R., et al., *Epigenetic Effects of an Adenosine Derivative in a Wistar Rat Model of Liver Cirrhosis*. *J Cell Biochem*, 2018. **119**(1): p. 401-413.

177. Lafaro, K.J., A.N. Demirjian, and T.M. Pawlik, *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*. Surg Oncol Clin N Am, 2015. **24**(1): p. 1-17.
178. Wu, M.C., et al., *Expert consensus on local ablation therapies for primary liver cancer*. Chin Clin Oncol, 2012. **1**(1): p. 11.
179. Tovar, V., A. Villanueva, and J.M. Llovet, [*Cell biology and genetics in liver cancer*]. Gastroenterol Hepatol, 2007. **30**(6): p. 360-9.
180. Severi, T., et al., *Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(11): p. 1409-20.
181. Wang, Y., Z. Sun, and M. Szyf, *S-adenosyl-methionine (SAM) alters the transcriptome and methylome and specifically blocks growth and invasiveness of liver cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(67): p. 111866-111881.
182. Shibata, T. and H. Aburatani, *Exploration of liver cancer genomes*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(6): p. 340-9.
183. Carlisi, D., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce in human hepatoma HepG2 cells acetylation of p53 and histones in correlation with apoptotic effects*. Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 177-84.
184. Zuo, F., et al., *Effects of Different Methionine Sources on Methionine Metabolism in the IPEC-J2 Cells*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 5464906.
185. Yang, H., et al., *S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S)*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 221-31.
186. Tomasi, M.L., et al., *S-adenosylmethionine regulates apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 stability: implication in hepatocarcinogenesis*. Gastroenterology, 2009. **136**(3): p. 1025-36.
187. Varela-Rey, M., et al., *Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide*. Hepatology, 2010. **52**(1): p. 105-14.
188. Shimi, T. and R.D. Goldman, *Nuclear lamins and oxidative stress in cell proliferation and longevity*. Adv Exp Med Biol, 2014. **773**: p. 415-30.
189. Gionfra, F., et al., *The Role of Thyroid Hormones in Hepatocyte Proliferation and Liver Cancer*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 532.
190. Xiao, W., et al., *NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(3): p. 251-272.
191. Avila, M.A., et al., *S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function*. Alcohol, 2002. **27**(3): p. 163-7.
192. Wallace, D.C. and W. Fan, *Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics*. Mitochondrion, 2010. **10**(1): p. 12-31.
193. Modica-Napolitano, J.S. and K.K. Singh, *Mitochondrial dysfunction in cancer*. Mitochondrion, 2004. **4**(5-6): p. 755-62.
194. Comerford, S.A., et al., *Acetate dependence of tumors*. Cell, 2014. **159**(7): p. 1591-602.
195. Chowdhury, G., et al., *Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1*. Biochemistry, 2012. **51**(50): p. 9995-10007.

196. Lu, Y. and A.I. Cederbaum, *Cytochrome P450s And Alcoholic Liver Disease*. Curr Pharm Des, 2018.
197. Reyes-Palomares, A., et al., *A combined model of hepatic polyamine and sulfur amino acid metabolism to analyze S-adenosyl methionine availability*. Amino Acids, 2012. **42**(2-3): p. 597-610.
198. Yang, J., et al., *Association of One-Carbon Metabolism-Related Vitamins (Folate, B6, B12), Homocysteine and Methionine With the Risk of Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 493.
199. Wu, G., et al., *Dietary Methionine Restriction Ameliorated Fat Accumulation, Systemic Inflammation, and Increased Energy Metabolism by Altering Gut Microbiota in Middle-Aged Mice Administered Different Fat Diets*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(29): p. 7745-7756.

16. ANEXO I

Functional, Metabolic, and Dynamic Mitochondrial Changes in the Rat Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma Model and the Protective Effect of IFC-305^{SI}

Enrique Chávez, María Guadalupe Lozano-Rosas, Mariana Domínguez-López, Gabriela Velasco-Loyden, Jesús Rafael Rodríguez-Aguilera, Concepción José-Nuñez, Marietta Tuena de Gómez-Puyou, and Victoria Chagoya de Sánchez

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico (E.C., M.G.L.-R., M.D.-L., G.V.-L., J.R.R.-A., V.C.S.); and Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico (C.J.-N., M.T.G.-P.)

Received November 29, 2016; accepted February 13, 2017

ABSTRACT

Background: Mitochondrion is an important metabolic and energetic organelle that regulates several cellular processes. Mitochondrial dysfunction has been related to liver diseases including hepatocellular carcinoma. As a result, the energetic demand is not properly supplied and mitochondrial morphologic changes have been observed, resulting in an altered metabolism. We previously demonstrated the chemopreventive effect of the hepatoprotector IFC-305. **Aim:** In this work we aimed to evaluate the functional, metabolic, and dynamic mitochondrial alterations in the sequential model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats and the possible beneficial effect of IFC-305. **Methods:** Experimental groups of

rats were formed to induce cirrhosis-hepatocellular carcinoma and to assess the IFC-305 effect during cancer development and progression through the evaluation of functional, metabolic, and dynamic mitochondrial parameters. **Results:** In this experimental model, dysfunctional mitochondria were observed and suspension of the diethylnitrosamine treatment was not enough to restore them. Administration of IFC-305 maintained and restored the mitochondrial function and regulated parameters implicated in metabolism as well as the mitochondrial dynamics modified by diethylnitrosamine intoxication. **Conclusion:** This study supports IFC-305 as a potential hepatocellular carcinoma treatment or as an adjuvant in chemotherapy.

Introduction

Mitochondria are organelles responsible for most of the energetic metabolism in eukaryotic cells. As an integral part of ATP production, through the oxidative phosphorylation, the tricarboxylic acid cycle (TCA) donates electrons to the electron transport chain (ETC), which consists of five complexes (I-V), where complex I is the electron entry site for NADH and generates NAD⁺ and complex V is in charge of ATP synthesis. The ability of mitochondria to regulate the energetic, redox state and metabolism of the cells could result in the production of epigenetic intermediates, point them out as a major therapeutic target because mitochondrial dysfunction is involved in several diseases including cancer (Mughal et al., 2012; Boland et al., 2013).

Studies have revealed several metabolic alterations in liver diseases including modifications in energy supply (Hernandez-Munoz et al., 1991; Hernandez-Munoz and Chagoya de Sanchez,

1994). Otto Warburg suggests that mitochondria from tumor cells supply the energetic demand, through the glycolytic flux because of the lack of oxygen or due to genetic-epigenetic alterations that affect the oxidative metabolism (Wallace and Fan, 2010). In fact, metabolic alterations and some anti-apoptotic proteins such as BCL-K_L reduce the acetyl-CoA level (Ac-CoA) (Yi et al., 2011); this intermediate also plays an important role as a signal transducer and gene expression modulator (Pietrocola et al., 2015). Oxidative stress diminishes oxidative metabolism flux, which includes TCA enzymes such as isocitrate dehydrogenase (IDH) and malate dehydrogenase (MDH). Indeed, studies have identified mutations in IDH producing an oncometabolite in different tumor types (Dang et al., 2016). A good indicator of the mitochondrial redox state is the NAD⁺/NADH ratio and if it is correctly regulated, an efficient ETC activity is possible; as shown in the limitation of breast tumor growth (Santidrian et al., 2013). Previously our research group demonstrated the ability of adenosine to maintain the energetic and redox state of the cell (Hernandez-Munoz et al., 1978; Hernandez-Munoz et al., 1987). In addition to the metabolic role of NAD⁺, it participates in the

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (240315). E. Chávez was a fellow of DGAPA-UNAM Mexico.

<https://doi.org/10.1124/jpet.116.239301>

^{SI} This article has supplemental material available at jpet.aspetjournals.org.

ABBREVIATIONS: Ac-CoA, acetyl-CoA; CP, cancer progression; DEN, diethylnitrosamine; DRP1, dynamin-related protein 1; ETC, electron transport chain; HCC, hepatocellular carcinoma; IDH, isocitrate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; MFN-2, mitofusin-2; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α ; Sirt-1, -3, sirtuin-1, -3; TCA, tricarboxylic acid cycle.

activity of multiple enzymes. According to this, Sirtuin-1 (Sirt-1), a NAD⁺-dependent protein and a member of class III histone deacetylase, targets several transcription factors including the peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α (PGC-1 α). The latter coactivates major transcription factors involved in mitochondrial and nuclear gene expression directing the complex program of mitochondrial biogenesis (Finley and Haigis, 2009). However, Sirt-1 and PGC-1 α have been found overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and are related to defective mitochondrial accumulation (Chen et al., 2012; Boland et al., 2013). Another NAD⁺-dependent protein is PARP-1 [Poly(ADP-ribose)] polymerase-1 whose activity modulates transcription and DNA repair; nevertheless, overexpression and increased activity of PARP-1 have been found in HCC and has been considered as a cancer hallmark (Hanahan and Weinberg, 2011).

Mitochondria are not static organelles; their dynamism depends, at least in part, on the fission and fusion phenomena that determine their shape. Mitochondrial fusion requires polarized mitochondrial membrane and the activity of proteins such as mitofusin 1 and 2 (MFN 1, 2); this process promotes cristae integrity and oxidative phosphorylation. Mitochondrial fission is induced by different kinds of stress and requires proteins such as the dynamin-related protein 1 (DRP1); membrane depolarization is observed during fission and, if the membrane potential is not recovered, mitochondria are targeted to autophagy (Boland et al., 2013). Altered mitochondrial fission and fusion have been observed in tumor cells mainly due to increased DRP1 and decreased MFN-2 expression (Rehman et al., 2012).

Our research group demonstrated the hepatoprotective effects of IFC-305, an adenosine-derived compound (Perez-Carreón et al., 2010; Velasco-Loyden et al., 2010; Chagoya de Sanchez et al., 2012; Velasco-Loyden, 2016); this compound has been evaluated in a diethylnitrosamine (DEN)-induced sequential rat model of cirrhosis-HCC, where it inhibited preneoplastic lesion development in comparison with DEN-treated groups. The chemopreventive effect was associated with the reduction of the expression of collagen, thymidylate synthase, the tumor marker γ -glutamyl transferase, the hepatocyte growth factor, and the induction of the cell cycle inhibitor p27 expression (Velasco-Loyden, 2016).

In this work we evaluated the mitochondrial alterations in the sequential cirrhosis-hepatocellular carcinoma model, previously described by Schiffer et al. (2005), and the possible beneficial effects of the hepatoprotector IFC-305 during HCC development and progression on mitochondrial function, metabolism, and dynamics. We measured the mitochondrial function through the respiratory quotient, membrane potential, complex I activity, and ATP synthesis. The activity of the malate-aspartate shuttle, IDH and MDH, and the level of Ac-CoA and lactate were determined as metabolic parameters. Dynamic mitochondrial proteins were determined to evaluate the morphology and biogenesis; electron microscopy was also used for morphology studies.

Materials and Methods

Chemicals

IFC-305 is the aspartate salt of adenosine prepared with adenosine free base (MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France) and L-aspartic acid (MP Biomedicals, Inc., Eschwege, Germany) is as described (Patent No. MX220780; MX 207422; US 8,507,459 B2) (Chagoya de Sanchez,

2002,2004, 2013). Diethylnitrosamine, sucrose, EDTA, Trisma base, KCl, MgCl₂, glutamate, ADP, rhodamine 123, HEPES, EGTA, cyclosporine A, valinomycin, succinate, 2,6-dichlorindophenol, ATP, NAD, NADH, acetophenone were purchased from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

Animal Treatment and Experimental Groups

Male Wistar rats (weighing 200 g) were obtained from and housed at the Animal Facility of the National Autonomous University of Mexico (UNAM), and all procedures were conducted according to our institutional guidelines for the care and use of laboratory animals. Groups of rats ($n = 6$, each group) were divided in two different schemes: hepatocellular carcinoma (HCC) and cancer progression (CP). These were treated as follows: 1) the HCC groups were injected with DEN (Sigma-Aldrich) at 50 mg/kg body weight i.p., once a week and saline solution or IFC-305 at 50 mg/kg body weight i.p., 3 times weekly (HCC+IFC-305) for 16 weeks plus 2-weeks wash out; 2) the CP groups were administered DEN at 50 mg/kg body weight i.p., once a week for 16 weeks and then received saline solution or IFC-305 (CP+IFC-305) at 50 mg/kg body weight i.p., 3 times weekly during 6 weeks (Table 1). To euthanize animals, a lethal dose of sodium pentobarbital was used and the liver was removed.

Mitochondrial Function

Mitochondria Isolation and Oxygen Uptake. Liver samples were homogenized (1:10 w/v) in a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Trizma base, and 0.1% BSA, pH 7.3. The tissue homogenate was centrifuged at 755 *g* for 5 minutes to remove nuclei and plasma membrane fragments. The supernatant was filtered through organza fabric and centrifuged at 8400 *g* for 10 minutes to obtain the mitochondrial pellet. Mitochondria were resuspended in 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Trizma base, pH 7.3. Mitochondrial respiration was recorded polarographically with a Clark-type oxygen electrode in 3 ml of a medium containing 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM potassium phosphate, 10 mM Trizma base; 10 mM glutamate, and malate were used as substrates for site I. Mitochondrial state 3 was initiated by adding 226 μ M ADP (final concentration).

Mitochondrial Membrane Potential. The mitochondrial membrane potential was determined according to Baracca et al. (2003). Briefly, a calibration curve was done by plotting rhodamine 123 fluorescence against the membrane potential calculated through the Nerst equation. To determine the mitochondrial membrane potential, 0.15 mg of mitochondria were added to a medium containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 100 μ M EGTA, 2 mM MgCl₂, 4 mM KH₂PO₄, pH 7.4, and 10 mM sucrose and 2.5 U hexokinase. Then, 1 μ g/ml of 33 nM cyclosporine A and 0.1 mM ADP were added. Finally, rhodamine (50 nM) fluorescence was measured in the presence of 20 mM succinate.

TABLE 1

Experimental groups design

Five experimental groups ($n = 6$) were formed as indicated. Control group received saline solution only. DEN was administered at 50 mg/kg i.p. once a week for 16 weeks and the IFC-305 compound at 50 mg/kg i.p. 3 times weekly during the DEN intoxication (HCC+IFC-305) or 6 weeks after DEN administration was stopped (CP+IFC-305).

Group	Treatment	
	16 weeks	6 weeks
Control	Saline solution	
HCC	DEN + saline solution	
HCC+IFC-305	DEN + IFC-305	
CP	DEN	Saline solution
CP+IFC-305	DEN	IFC-305

HCC, hepatocellular carcinoma; CP, cancer progression.

Complex I Activity. The 2,6-dichloroindophenol reduction was used to determine complex I activity in mitochondria isolated from the liver. Briefly, 1 mg of mitochondrial protein was added to a medium containing 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 100 μ M KCN, 10 mM glutamate as substrate, and 152 μ M rotenone. The absorbance was followed at 600 nm and the activity was calculated using the 2,6-dichloroindophenol extinction coefficient (21 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Determination of the ATPase Activity and the Content of the α Subunits. Rat liver mitochondria (2 mg) were resuspended in different volumes of the mitochondrial preparation medium. Mitochondria were centrifuged at 180 g for 10 minutes at 4°C. The mitochondrial pellet was resuspended in 50 μ l of 250 mM sucrose and 1 mM MgCl_2 and centrifuged in an air-driven ultracentrifuge at 5249 g at 10 psi. The pellet was resuspended in a medium containing 50 mM NaCl, 50 mM imidazole, 1 mM EDTA, 2 mM aminocaproic acid, and 0.66 mg digitonin/mg mitochondria. The suspension was centrifuged at 9860 g at 22 psi for 5 minutes. The supernatant was used for protein determination with first dimension blue native PAGE and second dimension SDS-PAGE.

First dimension: Protein extracted with digitonin (100 μ g) was mixed with 10 μ l buffer 3 \times (1.5 M 6-aminocaproic acid, 150 mM Bis-Tris) plus serva blue G (7 μ g/ μ l stock serva blue G in 1.5 M 6-aminocaproic acid) (final concentration, 30 ng serva blue/1 μ g protein). The sample was charged to a 3.5–11% linear blue native-PAGE and electrophoresis was performed at 70 V for 2 hour and 100 V for 8 hour at 4°C. ATPase activity was identified by incubating the first dimension gel in a preincubation-solution containing 35 mM Tris, 250 mM glycine, pH 8.3. Then, the gel was stirred and incubated for 1 and 2 hours at 37°C with 5 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 0.15% (w/v) lead acetate, and 150 mM glycine, pH 8.3. After that, the gel was stirred and incubated at room temperature for 24 hours. Monomer and dimer bands with dark background were scanned at 1, 2, and 24 hours. Monomer bands were read at 1, 2, and 24 hours, with Image J software.

Metabolic Evaluation

Malate-Aspartate Shuttle. The activity of the malate-aspartate shuttle was determined using the assay previously described for Scholz et al. (1998). Briefly, 50 μ l of mitochondrial suspension was mixed with 2 ml of 300 mM mannitol, 10 mM potassium phosphate, 10 mM Tris, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM aspartate, 2 mM ADP, and 0.14 mM NADH, pH 7.4. Then, 2 IU/ml of AST was added, and basal oxidation of NADH was followed at 340 nm at 37°C for 4 minutes. The shuttle activity was started with the addition of 4 mM malate and 4 mM glutamate. Oxidation of NADH was followed at 340 nm for 4 minutes at 37°C.

Isocitrate Dehydrogenase and Malate Dehydrogenase Activities. Isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities were estimated using the following commercial kits: Isocitrate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Cat. MAK062) and Malate Dehydrogenase Assay Kit (Cat. MAK196) following the instructions provided by the manufacturer (Sigma-Aldrich).

Acetyl-CoA, 3-Hydroxybutyric Acid, and Lactate Determination. The levels of acetyl-CoA, 3-hydroxybutyric acid, acetoacetate, and lactate were determined using the following commercial kits: Acetyl-Coenzyme A Assay Kit (Cat. MAK039, Sigma-Aldrich); Acetoacetate Colorimetric Assay Kit (Cat. MAK199); EnzyChrom Ketone Body Assay Kit (Cat. EKBD-100, Hayward, CA). The instructions provided by the manufacturers were followed.

PARP-1 Enzymatic Activity. The PARP-1 enzymatic activity was determined according to (Putt and Hergenrother, 2004). Briefly, liver samples were homogenized in a buffer containing 50 mM Tris, 2 mM MgCl_2 , pH 8.0, and protease inhibitors cocktail (Roche Diagnosis, Indianapolis, IN). The tissue homogenate was centrifuged at 13,700 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was separated and protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Laboratories, Inc., Hercules, CA). A DNA sample was obtained from the control liver tissue through a modified salt extraction method described by Lopera-Barrero (2008). Briefly, 20 μ l of 100 μ M NAD^+ was added to the

plate; subsequently, 30 μ g of protein and DNA (at 12.5 μ g/ml), previously activated with UV irradiation, was added. The plate was incubated at room temperature for 20 minutes, and the amount of NAD^+ present was determined by the addition of 10 μ l of 2 M KOH and 10 μ l of 20% acetophenone (in ethanol). The plate was incubated at 4°C for 10 minutes. Finally, 45 μ l of 88% formic acid was added, and the plate was incubated at 110°C for 5 minutes. The plate was allowed to cool and was read at 378 nm. To quantitate the NAD^+ , absorbances were interpolated in a NAD^+ calibration curve, previously performed.

Evaluation of Mitochondrial Dynamics

Nuclear Protein Extraction. The isolation of intact and stable nuclei consisted in an iso-osmotic lysis procedure, as reported by Dyer and Herzog (1995). With this lysis procedure, the nuclear envelope remained intact even during further manipulations of washing, freezing, and ultracentrifugation and provided nuclear protein extract. Briefly, 0.8 g of liver tissue was homogenized in 1.6 ml of buffer containing 0.25 M sucrose, 0.05 M Tris-Cl, 0.005 M KCl_2 . The homogenate was filtered and supplemented with 3 ml of a 2.3 M sucrose solution to increase the homogenate's density. Then, the sucrose gradient was created by adding 1.5 ml of a 2.3 M sucrose solution to the bottom of the tube containing the homogenate. The nucleus was isolated by centrifugation for 30 minutes at 4°C at 255,000 g . After the isolation, nuclear lysis was performed by incubating and stirring with a hypotonic and hypertonic solution. The nuclear extract protein was determined by the Bradford method and used for the corresponding assays.

Total Protein Extraction. Liver samples were homogenized with RIPA buffer (100 mg of tissue/ml buffer) containing protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics Corp.). The homogenate was centrifuged at 16,000 g for 10 minutes at 4°C; the supernatant was used as total liver homogenate.

Western Blot Assays. Mitochondrial, nuclear, and total protein extracts were used as corresponding. Volumes equivalent to 50 μ g of protein were electrophoresed on 12% polyacrylamide gel (20% polyacrylamide for histones); separated proteins were transferred onto PVDF (Immobilon P). Next, blots were blocked with 5% skim milk and 0.05% Tween-20 for 30 minutes at room temperature and independently incubated overnight at 4°C with selective antibodies (dilution 1:1000) against PGC-1 α (MAB 1032 from Chemicon Int. Inc.), Sirt-1, Drp-1, Sirt-3, Mfn-2 (Santa Cruz Biotechnology sc-15404, sc-32898, sc-99143, sc-50331, respectively), H4ac, Hsp60, H3, H4 (06-946, MAB 3844, 06-755, 04-858 from Millipore, respectively), as appropriate. On the following day, the membranes were washed and then exposed to a secondary peroxidase-labeled antibody at dilution 1:10,000 (Jackson ImmunoResearch) in the blocking solution for 1 hour at room temperature. Blots were washed and protein was developed using the ECL detection system. Densitometric analyses of bands were performed with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

Electron Microscopy. Liver samples for electron microscopy were fixed with glutaraldehyde (6%) and stained with osmium tetroxide (1% phosphate-buffered saline solution) according to Mascorro and Yates (1976).

Statistical Analysis

Data are expressed as mean values \pm standard error of the mean (S.E.M.). Comparisons were carried out by analysis of variance, followed by Tukey's test, as appropriate, using Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA) for Windows. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Results

IFC-305 Treatment was Helpful to Maintain and Recover the Mitochondrial Function that Was Altered in the Sequential Model of Cirrhosis-Hepatocellular Carcinoma

Mitochondria are the main source of energy and act as an energy modulator to orchestrate their physiologic responses.

For this reason, we decided to evaluate some parameters that reflect the mitochondrial function in the sequential model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma in the rat and the effect of IFC-305 treatment. The respiratory quotient was obtained from the state 3 and state 4 ratio. Chronic treatment with DEN induced an increased oxidation of glutamate in the absence of ADP (state 4) and a lower response for ADP (state 3), resulting in a diminished respiratory quotient in the HCC and CP groups compared with the control group (Table 2); the IFC-305 treatment prevented and reversed this alteration as seen in the HCC+IFC-305 and CP+IFC-305 groups. Moreover, there was a significant decrease in ATP synthesis in the groups treated with DEN that was not restored even in the CP group, and the beneficial effect of IFC-305 to prevent and reverse the damage caused by DEN can be observed in the groups receiving IFC-305 (Table 2). A significant reduction in the complex I activity in the HCC and CP groups and the beneficial effect of the IFC-305 treatment can be observed, which was able to reverse this alteration to the normal level. Mitochondrial membrane potential provides an electrochemical gradient required to regulate mitochondrial function. We found important changes in this parameter; depolarization was observed in mitochondria from HCC and CP groups and a tendency to prevent and reverse this effect can be observed in groups HCC+IFC-305 and CP+IFC-305 (Table 2). These results clearly indicate the functional impairment due to the chronic intoxication with DEN and the improvement effect exerted by the IFC-305 treatment.

Considering the aforementioned findings, we evaluated complex V, which is in charge of ATP synthesis as an integral part of the mitochondrial function. Through the isolation of the F1F0 complex from samples at week 22, we evaluated its ability to hydrolyze ATP. In this approach, we observed that the ATPase activity remained lower in the CP group than in the control one. The IFC-305 treatment restored this activity, which became higher at 24 hours (Fig. 1A). Moreover, the absence of the dimeric form of the F1F0 complex was seen the DEN intoxication even after it had been suspended (CP group); the control group and that treated with the IFC-305 compound (CP+IFC-305 group) revealed the presence of the dimeric form of the F1F0 complex (Fig. 1B). Similar results were obtained through the monomer quantification in blue gel and Coomassie staining and, the $\alpha\beta$ subunits content (Supplemental Fig. 1). These findings support the IFC-305 beneficial effect on the $\alpha\beta$ ATPase subunits.

The mitochondrial function was damaged in the HCC and CP groups; as it was previously mentioned, the suspension of DEN did not recovered mitochondrial functionality but the IFC-305 compound helps to maintain mitochondrial integrity.

The Hepatoprotector Improved the Metabolic Alterations Generated by Dysfunctional Mitochondria

Because of the previously described results, we decided to evaluate parameters that could show metabolic modifications. As seen in Fig. 2A, the malate-aspartate shuttle activity is decreased in preparations obtained from HCC and CP groups; IFC-305 treatment inhibited the effect of DEN and restored the activity of this shuttle, HCC+IFC-305, and CP+IFC-305, respectively. From the levels of 3-hydroxybutyric acid and acetoacetate we calculated the NAD^+/NADH ratio. Mitochondria isolated from the HCC and CP groups had a marked diminution of the mitochondrial NAD^+/NADH ratio. In the HCC+IFC-305 group, small protection against this damage was observed and the CP+IFC-305 group reached the control value (Fig. 2B).

Because we observed alterations in the NAD^+ mitochondrial regulation, we decided to evaluate the activity of two NAD^+ -dependent enzymes that participate in the TCA cycle, IDH and MDH. As shown in Fig. 2C, IDH activity did not change significantly when it was compared with the control group. Nevertheless, treatment with IFC-305 increased the activity of this enzyme compared with the HCC and CP groups, respectively. MDH activity of HCC and HCC+IFC-305 is similar to the control group. In the CP group, the MDH activity decreased but the treatment with IFC-305 tended to reverse this effect (Fig. 2D). The impaired IDH and MDH activity suggest an altered TCA function due to DEN administration; IFC-305 treatment improved mainly the IDH activity, possibly related to the increase in redox potential.

As mentioned in the introduction, the experimental model used in this study is associated with HCC and because we found modifications in mitochondrial function, we determined the level of hepatic lactate as an indicator of metabolic adaptation. Chronic administration of DEN increased the amount of lactate in the liver and it did not return to the control level 6 weeks after the DEN treatment had been suspended as shown in the HCC and CP groups (Fig. 3). IFC-305 treatment significantly decreased the level of lactate

TABLE 2

Effect of DEN and IFC-305 administration on the mitochondrial respiratory quotient, ATP synthesis, complex I activity, and membrane potential

Values are expressed as mean \pm S.E.

Group	State III/State IV	ATP Synthesis	Complex I Activity	$\Delta\Psi_m$
		<i>nmol/min/mg</i>	<i>$\mu\text{mol/min/mg}$</i>	<i>ml</i>
Control	8.39 \pm 0.62	171.60 \pm 22.01	20.16 \pm 3.03	163.77 \pm 11.17
HCC	2.98 \pm 1.43 ^a	100.27 \pm 24.61 ^a	1.62 \pm 0.76 ^a	58.29 \pm 7.19 ^a
HCC+IFC-305	6.13 \pm 0.55 ^b	173.46 \pm 17.27 ^b	4.46 \pm 1.30 ^a	100.55 \pm 13.94 ^{a,b}
CP	4.86 \pm 1.39 ^a	125.02 \pm 4.18 ^a	6.96 \pm 2.17 ^a	67.01 \pm 8.46 ^a
CP+IFC-305	7.80 \pm 1.25	174.94 \pm 12.81 ^c	17.57 \pm 3.70 ^c	102.19 \pm 15.65 ^{a,c}

^aSignificant difference versus control.

^bSignificant difference versus HCC.

^cSignificant difference versus CP.

Isolated mitochondria were used to determine the respiratory quotient with glutamate plus malate as substrates ($P < 0.05$), complex I activity ($P < 0.01$), and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) ($P < 0.001$). ATP synthesis was calculated from data obtained in the oximetry analysis in the presence of glutamate plus malate (state III X ADP/O) ($*P < 0.05$).

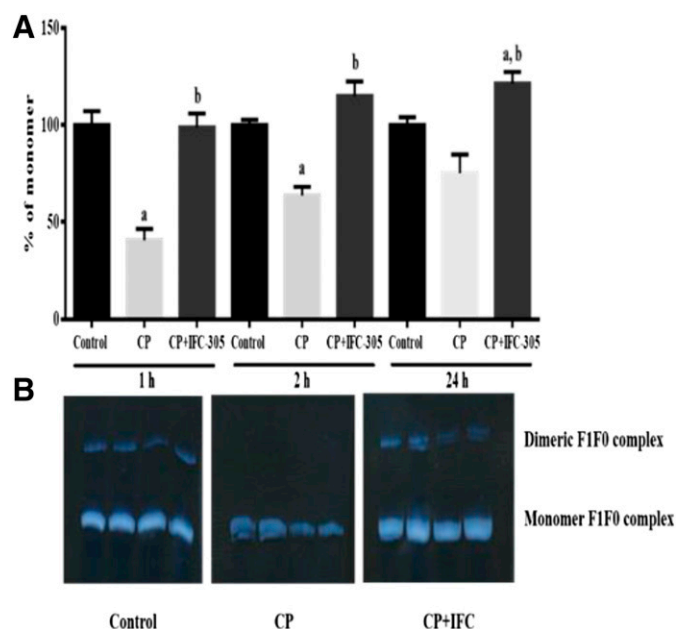


Fig. 1. Changes in ATPase activity and determination of the monomeric and dimeric F1FO ATPase complex in mitochondria. (A) Monomer F1FO-ATPase activity quantification at 1, 2, and 24 hours in digitonin mitochondrial extracts in gradient blue native gels. Optical density data were normalized taking the control group as 100%. Each bar represents the mean of each group \pm SE. ^aStatistical significant difference versus control; ^bsignificant difference versus CP group ($P < 0.05$). (B) Monomer and dimer F1FO-ATPase at 24 hour sin digitonin mitochondrial extracts from four different samples in blue native gels.

(HCC+IFC-305), suggesting metabolic adaptation in response to recuperated mitochondrial function.

Another intermediate that depends on mitochondrial energetics is Ac-CoA. DEN administration had no significant effect on the amount of Ac-CoA in both groups, HCC and CP, but IFC-305 treatment significantly increased Ac-CoA levels in the HCC+IFC-305 and CP+IFC-305 groups (Fig. 4A) consequently to the recuperation of mitochondrial function. Previous studies showed the ability of IFC-305 to modulate some epigenetic modifications including histone acetylation (Rodríguez-Aguilera, 2015). Thanks to this and considering the increased level of this metabolic intermediate, we decided to determine this posttranslational modification because Ac-CoA is a required cofactor for histone acetyltransferases. Diminution of H4ac was observed in the HCC and CP groups; an increment trend was observed in HCC+IFC-305 and CP+IFC-305 groups (Fig. 4, B and C), suggesting Ac-CoA availability. This result could be important because it might establish a link between mitochondrial function and epigenetic control of gene expression.

In addition to the mitochondrial alterations, other enzyme activities could be modified, dependent, at least in part, on mitochondrial integrity and functionality. Specifically, PARP-1 overexpression and overactivation have been shown to be a characteristic of HCC. The PARP-1 activity is dependent on NAD⁺ and Fig. 5 shows a significant increment in the CP group, whereas the CP+IFC-305 group revealed the IFC-305 ability to decrease it. The overactivation of PARP-1 obtained in the DEN-intoxicated groups could be the cause of the diminution of NAD⁺ level previously described in Fig. 2B.

IFC-305 Treatment Was Beneficial to Avoid and Recover the Altered Mitochondrial Dynamics Induced by DEN Intoxication

The interplay between the mitochondrion and the nucleus is relevant in the regulation of the mitochondrial response to stress, and PGC-1 α and Sirt-1 are proteins involved in this process. The nuclear amount of both proteins was increased by DEN treatment, even in the CP group, as compared with the control (Fig. 6, A and B). The pharmacological treatment with IFC-305, HCC+IFC-305, and CP+IFC-305, reduced the nuclear content of both Sirt-1 and PGC-1 α , suggesting a diminution of mitochondrial stress induced by DEN.

Mitochondrial networks determined by fission and fusion cycle were evaluated through the mitochondrial level of proteins regulating this process. Figure 7 shows the effect of DEN and IFC-305 on mitochondrial localization of three important proteins related to fission and fusion processes. DRP-1, required for mitochondrial fission by pinching them off into smaller fragmented mitochondria, was induced in HCC and CP groups and it was prevented by the hepatoprotector (Fig. 7A). Figure 7B shows no significant differences in the MFN-2 content between the experimental groups; however, a tendency to increase this protein in the HCC group can be seen. However, when the DRP-1/MFN-2 ratio was determined (Fig. 7C), an important increase in this parameter was observed in the CP group, reflecting a predominance of the fission process. This alteration was not observed in the CP+IFC-305 group.

Until now important mitochondrial alterations were observed, but we wanted to know if there were changes in mitochondrial content of Sirt-3, a NAD⁺-dependent deacetylase, that would be indicative of a correlation between mitochondrial dynamics and metabolic function. The progressive damage, observed when the toxicant was suspended, induced a decreased in mitochondrial Sirt-3 (CP group) and the administration of IFC-305 increased Sirt-3 level (CP+IFC-305), even more than the control group (Fig. 7D). The upregulation in the presence of the compound could be related to the improved mitochondrial redox state. Mitochondrial modifications prompted us to obtain liver slices to observe the changes in mitochondrial morphology through electron microscopy. The control group depicted mainly elongated mitochondria. Circular shaped mitochondria were abundant in HCC and CP groups (Fig. 8, B and D), and elongated shape was observed in groups receiving IFC-305 (Fig. 8, C and E). As well as the altered mitochondrial shape, altered cristae were observed in the HCC and CP groups, whereas the IFC-305-treated groups maintained and recovered cristae. An important observation is the large amount of ribosomes observed in the slices from the HCC+IFC-305 and CP+IFC-305 groups marked with black arrows (Supplemental Fig. 2). To appreciate better these effects, in Supplemental Fig. 2 mitochondria can be observed in a more amplified size than in Fig. 8. This observation supports the previous observations in mitochondrial functions, metabolism, and dynamic.

Discussion

This study shows that mitochondria from the liver of DEN-treated rats underwent alterations resulting in decreased respiratory quotient, which means that uncoupled mitochondria

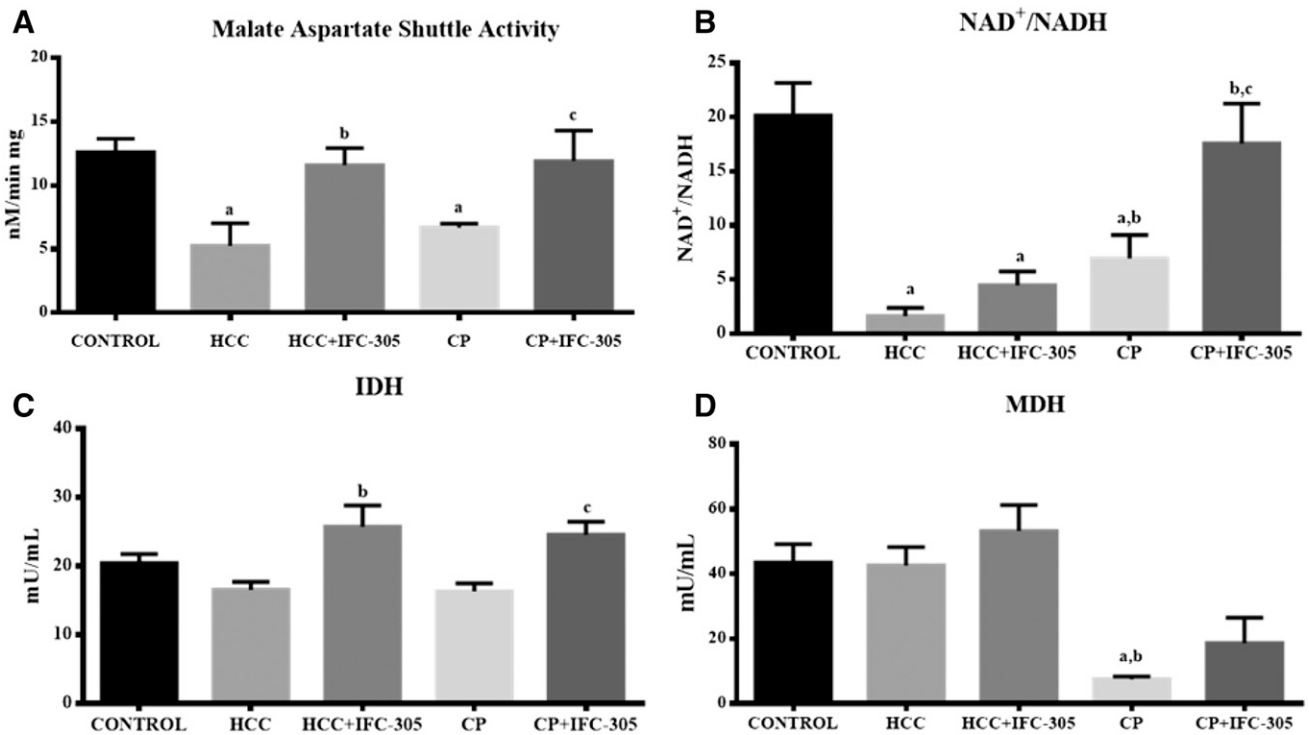


Fig. 2. Metabolic mitochondrial parameters evaluated in isolated mitochondria from the liver in the different experimental groups. (A) Malate-aspartate shuttle ($P < 0.05$); (B) NAD⁺/NADH ratio ($P < 0.001$); (C) isocitrate dehydrogenase activity ($P < 0.01$); and (D) malate dehydrogenase activity ($P < 0.001$). Values are expressed as means \pm S.E. ^aSignificant difference versus CONTROL; ^bstatistical significant difference versus HCC group; ^csignificant difference versus CP group.

with low phosphorylating capacity depicted lower ATP synthesis probably because of the altered $\Delta\Psi_m$ and complex I activity (Table 2). Moreover, ATP synthase plays an essential role in energy metabolism, because it is in charge of ATP synthesis; the dimeric and oligomeric ATP synthase complexes increase its stability and promote the formation of mitochondrial cristae (Garcia-Trejo and Morales-Rios, 2008; Couoh-Cardel et al., 2010). The regeneration of the dimeric form of the F1F0 ATPase is an indicator that the mitochondrial energetic machinery and morphology of cristae were recovered with IFC-305 administration to the CP. Previously, the sensitivity of the ETC complex I to the hepatotoxic action of CCl₄, ethanol, and DEN had been demonstrated; for DEN, this effect is attributed to the inhibition of NAD⁺-linked respiration at this site (Cederbaum et al., 1974; Schilling and Reitz, 1980; Boitier et al., 1995). The malate-aspartate shuttle maintains appropriate NADH equivalents, and its intermediates are coupled to the TCA cycle. The activity of this system was diminished in mitochondria from DEN-treated rats (Fig. 2A), supporting the idea that mitochondria are the site for DEN-induced damage. As mentioned before, the treatment with IFC-305 improved the mitochondrial redox state damaged by DEN. Mitochondrial function requires an optimal NAD⁺/NADH ratio to be efficient. The ability to restore the mitochondrial NAD⁺/NADH ratio was achieved when the IFC-305 was given after the discontinuation of DEN injection (CP+IFC-305 group) (Fig. 2B). The maintenance of this ratio allowed the correct supply of electrons to complex I and the proper function of mitochondria. The decreased $\Delta\Psi_m$ in the DEN-treated rats was expected because of the alterations previously mentioned.

These results demonstrate relevant mitochondrial function impairment induced by DEN and the beneficial effects of IFC-305 to maintain the mitochondrial function, supporting the previously mentioned adenosine findings, which is the base molecule of the compound studied in this work (Hernandez-Munoz et al., 1978).

IDH and MDH are mitochondrial TCA enzymes coupled to the mitochondrial redox potential. IDH activity is decreased in patients with chronic liver injury after several years of alcohol abuse and in rats treated with DEN (Suresh et al., 2013; Popov et al., 2014). We found a tendency to diminish the IDH activity by DEN intoxication and its increased activity by

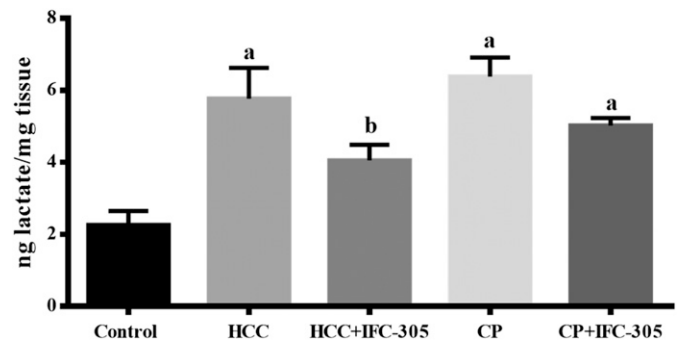


Fig. 3. Lactate level in the liver as an indicator of metabolic adaptation. Perchloric extracts from the liver were obtained to determine the levels of lactate. Values are expressed as means \pm S.E. ^aSignificant difference versus CONTROL; ^bstatistical significant difference versus HCC group; ^csignificant difference versus CP group ($P < 0.01$).

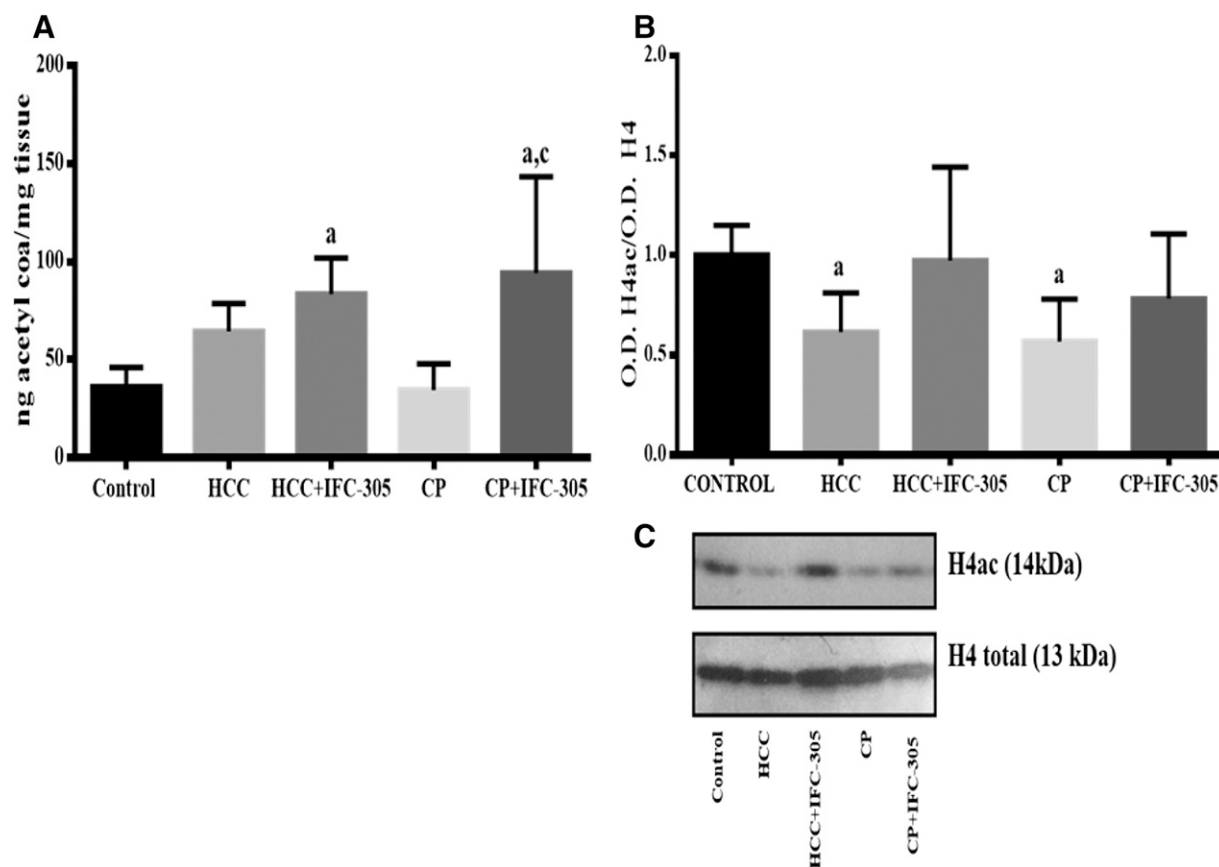


Fig. 4. Changes in the mitochondrial amount of Ac-CoA might reflect mitochondrial dysfunction and epigenetic changes. (A) Ac-CoA determined with a commercial kit in mitochondria isolated following manufacturer's instructions ($P < 0.001$). (B) Densitometric analysis of the acetylated H4, Western blot normalized respect to H4 ($P < 0.05$). (C) Representative Western blot of (B). ^aSignificant difference versus Control; ^c statistically significant difference versus CP group ($P < 0.05$).

IFC-305-treatment (Fig. 2C). This compound might promote the correct function of mitochondrial enzymes by modulating the redox state as we mentioned above. A similar effect was seen in MDH activity in the CP scheme.

The PARP-1 enzyme activity consists in the poly-adenosine diphosphate ribosylation [poly(ADP-ribose)] of different substrates, and there is evidence of increased PARP-1 expression and auto-poly(ADP-ribose) in HCC and cirrhosis (Nomura et al., 2000; Shiobara et al., 2001; Shimizu et al., 2004). Here, we demonstrated an increased PARP-1 activity in the liver of rats treated with DEN, and this result correlates with the diminution of the NAD^+ / $NADH$ ratio, suggesting depletion in NAD^+ content. The IFC-305 compound prevented PARP-1 activation by DEN as previously was showed in the presence of adenosine (Jagtap et al., 2004). This result favored the NAD^+ availability and contributed to the maintenance of the redox state.

Mitochondrial changes affect the cytosolic redox state and, hence, metabolic alterations such as lactate production. It has been suggested the aerobic glycolysis is the main source of energy in cancer (Linehan and Rouault, 2013). In this context, glucose metabolism produces lactate. Here, we found an induction of high levels of lactate with DEN even 6 weeks after intoxication was stopped. This metabolic adaptation was inhibited and reversed with the IFC-305 compound (Fig. 3). Probably the source of energy became glycolysis dependent because of the altered mitochondrial function observed in the

DEN-treated rats; the beneficial effect of IFC-305 treatment could be explained by its ability to maintain mitochondrial integrity.

The synthesis of Ac-CoA, a carbon donor in anabolic reactions, is altered by mitochondrial dysfunction (Wellen and Thompson, 2012). Moreover, it represents the link between pyruvate and the mitochondrial TCA cycle and ETC; thus, it might reflect the mitochondrial energetic supply. In addition to its energetic role, Ac-CoA represents

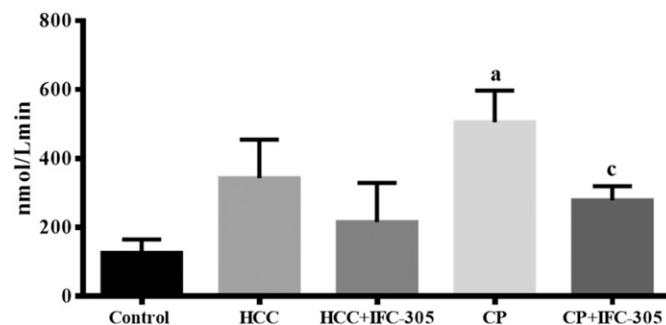


Fig. 5. Enzymatic activity of PARP-1, a NAD^+ -dependent enzyme. This parameter was determined in liver slices through the consumption of NAD^+ in presence of DNA previously activated. Values are expressed as means \pm S.E. ^aStatistically significant difference versus, Control; ^csignificant difference versus CP group ($P < 0.01$).

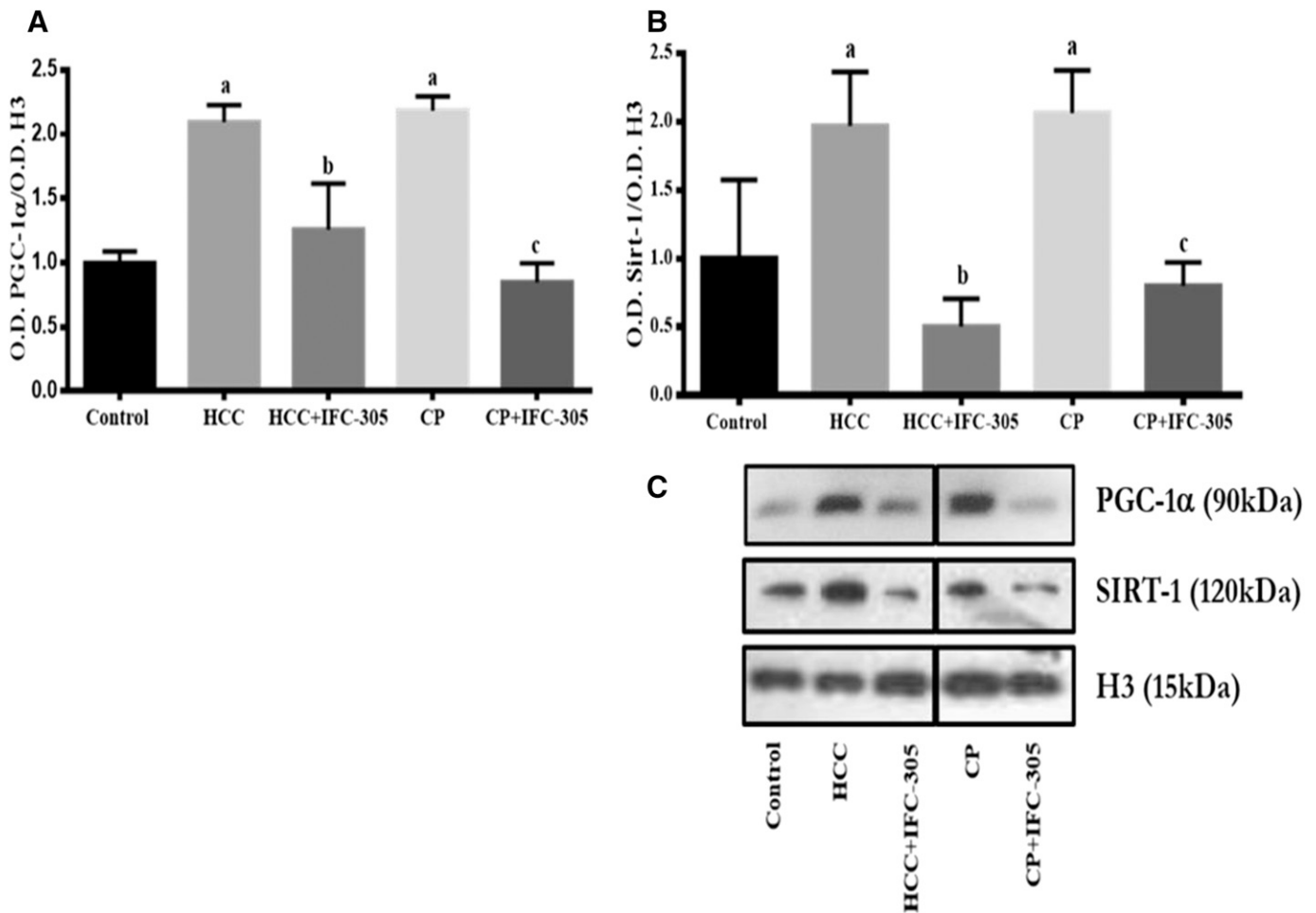


Fig. 6. Changes in the nuclear amount of proteins implicated in mitochondrial biogenesis. (A) PGC-1 α and (B) Sirt-1; the bars correspond to the densitometric analysis. Values are expressed as means \pm S.E. ^aSignificant difference versus Control; ^bsignificant difference versus HCC group; ^csignificant difference versus CP group ($P < 0.001$). (C) Representative Western blot of (A) and (B).

availability of the substrate for acetylation reactions; it is important in the nucleus to modulate the gene expression through acetylation of histone lysines in DNA-binding proteins reducing the protein-DNA interaction (Wallace and Fan, 2010). Although DEN did not significantly change the Ac-CoA level with respect to the control group, IFC-305 treatment did change it (Fig. 4A); moreover, we observed a tenuous and not significant increased H4ac induced by IFC-305, suggesting that Ac-CoA levels regulated by IFC-305 might affect the mark of histones acetylation (Fig. 4B). In cancer cells, Ac-CoA is ectopically synthesized in the nucleus and is involved in cell cycle progression and DNA replication (Comerford et al., 2014). However, our results show Ac-CoA from mitochondria, indicating that the source of this metabolite is from the normal glycolytic flux through pyruvate, β -oxidation, and the catabolism of amino acids. These results confirm the ability of IFC-305 to increase the energy status of the liver and to improve the mitochondrial integrity. Possibly, H4ac allowed the transactivation of genes involved in growth and replication and it must be considered that the experimental model used implies cirrhosis, i.e., the whole liver, was affected by the administration of DEN. Further studies are necessary to test if replication of healthy hepatocytes is facilitated in this

experimental model by IFC-305, as we previously reported in the CCl₄ model (Chagoya de Sanchez et al., 2012).

The diminished Sirt-3 mitochondrial content obtained with DEN reflects the inability to control the redox state and the metabolic activity. Recently, Sultana et al. (2016) demonstrated the protective effect of Sirt-3 on the mitochondrial function, probably by the oxidative stress modulation through the mitochondrial antioxidant enzymes such as Mn-SOD. Moreover, some authors have demonstrated downregulation of Sirt-3 in human HCC, suggesting that this pattern is associated with differentiation and tumor multiplicity (Xiong et al., 2016). Our results suggest a role of Sirt-3 in the mitochondrial effects of the IFC-305 compound possibly by deacetylation of the ATPase and complex I subunits (Vassilopoulos et al., 2014). Further studies are needed to demonstrate this. Overexpression of Sirt-3 induces apoptosis in HCC culture cells through mitochondrial translocation of the Bcl-2-associated X protein (Zhang and Zhou, 2012; Song et al., 2015). The transcriptional coactivator PGC-1 α and Sirt-1 are considered important inducers of mitochondrial biogenesis through nuclear-encoded mitochondrial genes. Sirt-1 maintains PGC-1 α in a deacetylated active state, promoting its transcriptional activity (Gerhart-Hines et al., 2007). Our results suggest the ability of IFC-305 to inhibit the activation of PGC-1 α , at least in part, to maintain

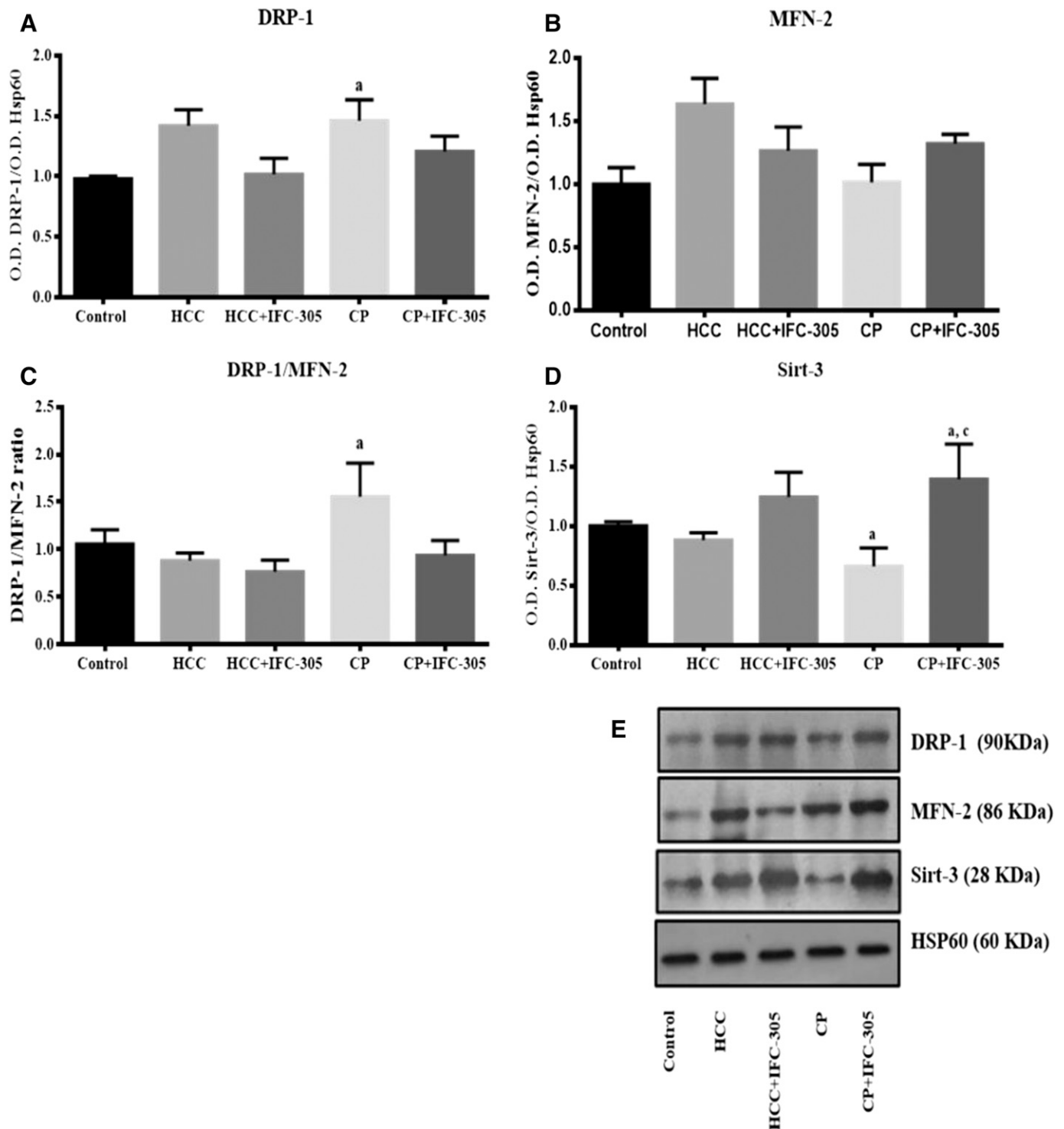


Fig. 7. Level of proteins related to the mitochondrial dynamics determined by Western blot. (A) DRP-1 ($P < 0.05$), (B) MFN-2, (C) DRP-1/MFN-2 ratio ($P < 0.05$), and (D) Sirt-3 ($P < 0.001$) ($*P < 0.05$). Bars correspond to the densitometric analysis. Values are expressed as means \pm S.E.. ^aSignificant difference versus Control; ^bmeans significant difference versus HCC group; ^cmeans significant difference versus CP group. (E) Representative Western blot of each protein.

the Ac-CoA levels and the decreased nuclear amount of Sirt-1. This effect allows us to explain the lower accumulation of dysfunctional mitochondria. Additionally, Sirt-1 has been linked to tumorigenesis and its depletion inhibits proliferation of HCC cells by cellular senescence or apoptosis (Chen et al., 2012). The nuclear localization of both proteins is

increased in the rats intoxicated with DEN compared with the control group (Fig. 4). The IFC-305 compound was able to decrease the nuclear content of both Sirt-1 and PGC-1 α . It is suggested that biogenesis induced by PGC-1 α is tumor promoting, but production of new healthy mitochondria could be tumor suppressive (Boland et al., 2013).

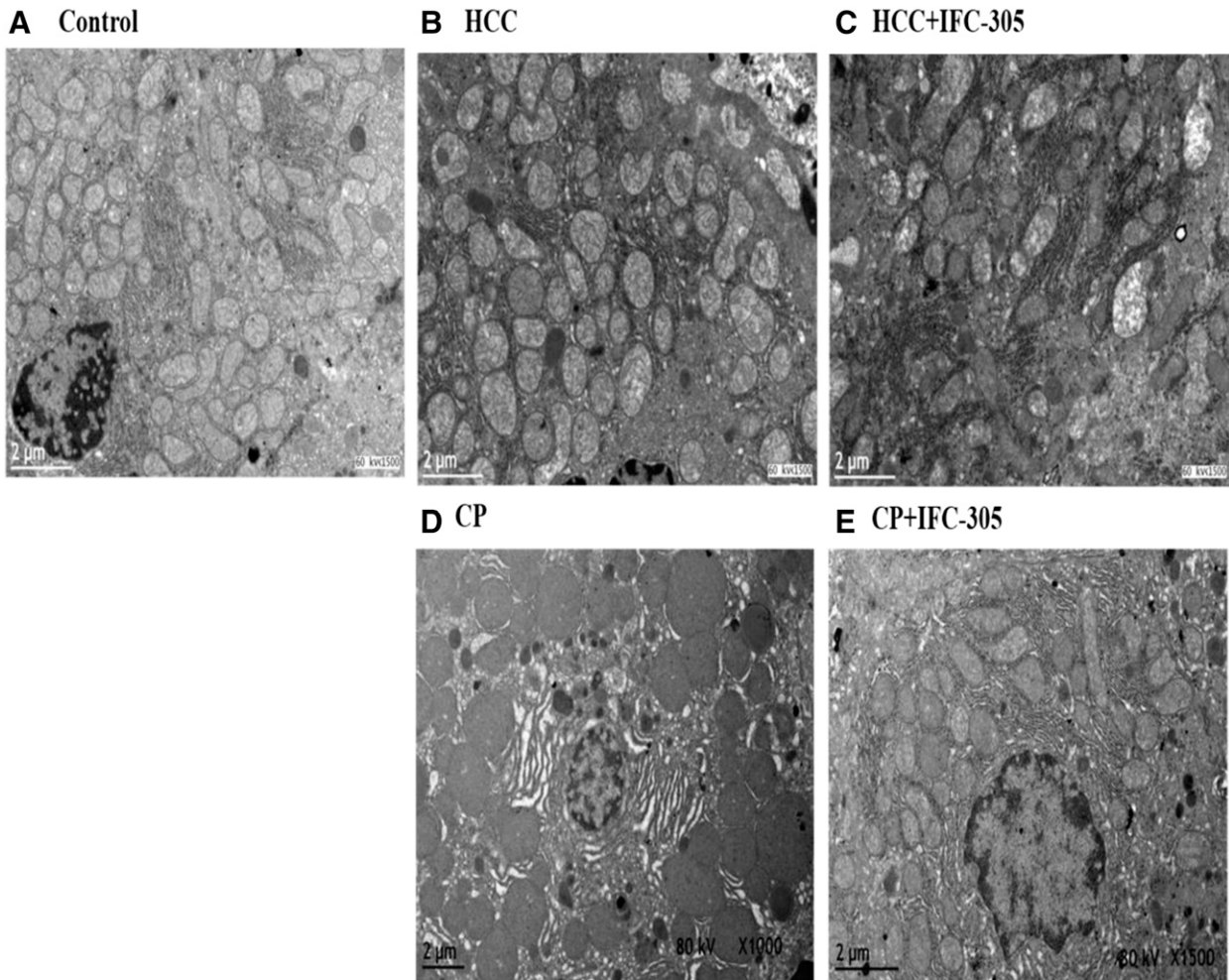


Fig. 8. Morphologic changes evaluated through electron microscopy. Each panel is representative of each group. Liver slices were fixed with glutaraldehyde and stained with osmium tetroxide. The square in the right inferior border represents a magnification of a mitochondrion. (A) Control; (B) HCC; (C) HCC+IFC-305; (D) CP; (E) CP+IFC-305.

Mitochondria are dynamic organelles to maintain their correct functionality and morphology. DRP1 regulates mitochondrial fission through scission of the outer mitochondrial membrane. Mitochondrial fusion is regulated by MFN-1 and -2, which facilitates binding of the outer mitochondrial membrane of different mitochondria (Dhingra and Kirshenbaum, 2014). According to this, small and fragmented mitochondria have been found in mice with reduced levels of MFN-2, but when this protein is restored, the normal mitochondria phenotype is obtained (Liesa et al., 2008). Here, we show that DEN intoxication induces important changes in the DRP-1/MFN-2 ratio 6 weeks after DEN administration was suspended. This alteration indicates a predominance fission over fusion. The mitochondrial morphology observed by electronic microscopy corroborates these results, because those isolated from HCC and CP groups depicted a circular shape instead of the elongated phenotype shown by the control and those receiving IFC-305 treatment. These results support the idea that mitochondrial shape regulates their function and integrity and that the hepatoprotector IFC-305 favors the fusion process promoting the functional mitochondria.

We conclude that chronic DEN intoxication induces mitochondrial alterations favoring the establishment of liver damage,

resulting in abnormal mitochondrial accumulation and cellular behavior. The damage with DEN had been established for 16 weeks and, according to the results, it continued even after the insult had been stopped. IFC-305 maintains and restores the mitochondrial activity damaged by DEN and probably allows mitochondria to be repaired. The beneficial effects of IFC-305 reveal an integrative effect of the compound between mitochondrion and nucleus. This study demonstrated the mitochondrial impairment through functional, metabolic, and dynamic alterations in the sequential model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma and the hepatoprotector IFC-305 helps to repair them, supporting its use as a potential hepatocellular carcinoma treatment or as an adjuvant in chemotherapy.

Acknowledgments

The authors dedicate this work to the memory of Dr. Armando Gómez-Puyou, one of the initiators of Bioenergetic in Mexico.

Authorship Contributions

Participated in the research design: Chávez, Tuena de Gómez-Puyou, and Chagoya de Sánchez.

Conducted experiments: Chávez, Lozano-Rosas, Rodríguez-Aguilera, Domínguez-López, Velasco-Loyden, and José-Nuñez.

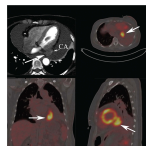
Performed data analysis: Chávez, Lozano-Rosas, and Chagoya de Sánchez.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Chávez and Chagoya de Sánchez.

References

- Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, and Lenaz G (2003) Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1606**:137–146.
- Boitier E, Merad-Boudia M, Guguen-Guillouzo C, Defer N, Ceballos-Picot I, Leroux JP, and Marsac C (1995) Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen-free radicals. *Cancer Res* **55**:3028–3035.
- Boland ML, Chourasia AH, and Macleod KF (2013) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* **3**:292.
- Cederbaum AI, Lieber CS, and Rubin E (1974) Effects of chronic ethanol treatment of mitochondrial functions damage to coupling site I. *Arch Biochem Biophys* **165**:560–569.
- Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, et al. (2014) Acetate dependence of tumors. *Cell* **159**:1591–1602.
- Couoh-Cardel SJ, Uribe-Carvajal S, Wilkens S, and García-Trejo JJ (2010) Structure of dimeric F1F0-ATP synthase. *J Biol Chem* **285**:36447–36455.
- Chagoya de Sánchez V, Martínez-Pérez L, Hernández-Muñoz R, and Velasco-Loyden G (2012) Recovery of the Cell Cycle Inhibition in CCK(4)-Induced Cirrhosis by the Adenosine Derivative IFC-305. *Int J Hepatol* **2012**:212530.
- Chagoya de Sanchez VH-M (2002) Método para preparar aspartato de adenosina a partir de la adenosina, composición farmacéutica que las contiene y uso de las mismas en el tratamiento de enfermedades hepáticas fibrosantes., in.
- Chagoya de Sanchez VH-M (2004) Uso de la adenosina para preparar medicamentos para el tratamiento de enfermedades hepáticas fibrosantes., in.
- Chagoya de Sanchez VH-M, R; Villa-Treviño, S. (2013) Use of adenosine Aspartate for the preparation of pharmaceutical products for the treatment of liver cancer., in.
- Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, Ng MH, Ho CY, Cheng SH, Lai PB, et al. (2012) Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res* **72**:4138–4149.
- Dang L, Yen K, and Attar EC (2016) IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Ann Oncol* **27**:599–608.
- Dhingra R and Kirshenbaum LA (2014) Regulation of mitochondrial dynamics and cell fate. *Circulation* **78**:803–810.
- Dyer RB and Herzog NK (1995) Isolation of intact nuclei for nuclear extract preparation from a fragile B-lymphocyte cell line. *Biotechniques* **19**:192–195.
- Finley LW and Haigis MC (2009) The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* **8**:173–188.
- García-Trejo JJ and Morales-Ríos E (2008) Regulation of the F1F0-ATP synthase rotary nanomotor in its monomeric-bacterial and dimeric-mitochondrial forms. *J Biol Phys* **34**:197–212.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, and Puigserver P (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* **26**:1913–1923.
- Hanahan D and Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:646–674.
- Hernández-Muñoz R and Chagoya de Sánchez V (1994) In vivo correlation between liver and blood energy status as evidenced by chronic treatment of carbon tetrachloride and adenosine to rats. *Can J Physiol Pharmacol* **72**:1252–1256.
- Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, and Chagoya de Sánchez V (1987) In vivo and in vitro adenosine stimulation of ethanol oxidation by hepatocytes, and the role of the malate-aspartate shuttle. *Biochim Biophys Acta* **930**:254–263.
- Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, Suárez J, Lozano J, and Chagoya de Sánchez V (1991) Alterations of ATP levels and of energy parameters in the blood of alcoholic and nonalcoholic patients with liver damage. *Alcohol Clin Exp Res* **15**:500–503.
- Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sáinz JA, Piña E, and Chagoya de Sánchez V (1978) On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Arch Biochem Biophys* **190**:155–162.
- Jagtap PG, Southan GJ, Baloglu E, Ram S, Mabley JG, Marton A, Salzman A, and Szabó C (2004) The discovery and synthesis of novel adenosine substituted 2,3-dihydro-1H-isoindol-1-ones: potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Bioorg Med Chem Lett* **14**:81–85.
- Liesa M, Borda-d'Agua B, Medina-Gómez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, Palacín M, Vidal-Puig A, and Zorzano A (2008) Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. *PLoS One* **3**:e3613.
- Linehan WM and Rouault TA (2013) Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer—targeting the Warburg effect in cancer. *Clin Cancer Res* **19**:3345–3352.
- Lopera-Barrero NP, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, and da Silva Lopes T. (2008) Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cienc Investig Agrar* **35**:77–86.
- Mascorro JALM and Yates RD (1976) Rapid infiltration of biological tissues nucleoside. The latter could be particularly true regarding utilizing h-hexenyl succinic anhydride (HXSA)/vinyl ciclohexane dioxo formation of the extracellular matrix, which is similar ide (VCD), and ultra-low viscosity embedding medium. *Proc Ann Meeting Soc Am* **34**:346-347.
- Mughal W, Dhingra R, and Kirshenbaum LA (2012) Striking a balance: autophagy, apoptosis, and necrosis in a normal and failing heart. *Curr Hypertens Rep* **14**:540–547.
- Nomura F, Yaguchi M, Togawa A, Miyazaki M, Isoe K, Miyake M, Noda M, and Nakai T (2000) Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **15**:529–535.
- Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredano ML, Yáñez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, Ramírez-Salcedo J, Hernández-Luis F, Velázquez-Martínez I, Suárez-Cuenca JA, et al. (2010) An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:287–296.
- Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, and Kroemer G (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab* **21**:805–821.
- Popov SS, Shulgin KK, Pashkov AN, and Agarkov AA (2014) The effect of melaxen on the activity of caspases and the glutathione antioxidant system in toxic liver injury. *Acta Naturae* **6**:110–118.
- Putt KS and Hergenrother PJ (2004) An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD(+): application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors. *Anal Biochem* **326**:78–86.
- Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C, and Archer SL (2012) Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* **26**:2175–2186.
- Rodríguez-Aguilera JR (2015) Estudio de las modificaciones epigenéticas en un modelo de cirrosis experimental y su reversión por el hepatoprotector IFC-305. *Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México.*
- Santidrián AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, Seo BB, LeBoeuf SE, Gay LJ, Yagi T, and Felding-Habermann B (2013) Mitochondrial complex I activity and NAD+/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest* **123**:1068–1081.
- Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, Clergue F, Poupon R, Barbu V, and Rosmorduc O (2005) Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* **41**:307–314.
- Schilling RJ and Reitz RC (1980) A mechanism for ethanol-induced damage to liver mitochondrial structure and function. *Biochim Biophys Acta* **603**:266–277.
- Scholz TD, Koppenhafer SL, tenEyck CJ, and Schutte BC (1998) Ontogeny of malate-aspartate shuttle capacity and gene expression in cardiac mitochondria. *Am J Physiol* **274**:C780–C788.
- Shimizu S, Nomura F, Tomonaga T, Sunaga M, Noda M, Ebara M, and Saisho H (2004) Expression of poly(ADP-ribose) polymerase in human hepatocellular carcinoma and analysis of biopsy specimens obtained under sonographic guidance. *Oncol Rep* **12**:821–825.
- Shiobara M, Miyazaki M, Ito H, Togawa A, Nakajima N, Nomura F, and Morinaga N, and Noda M (2001) Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma tissues in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **16**:338–344.
- Song CL, Tang H, Ran LK, Ko BC, Zhang ZZ, Chen X, Ren JH, Tao NN, Li WY, Huang AL, et al. (2015) Sirtuin 3 inhibits hepatocellular carcinoma growth through the glycogen synthase kinase-3beta/BCL2-associated X protein-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **35**:631–641.
- Sultana MR, Bagul PK, Katara PB, Anwar Mohammed S, Padiya R, and Banerjee SK (2016) Garlic activates SIRT-3 to prevent cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diabetes. *Life Sci* **164**:42–51.
- Suresh V, Anbazhagan C, Thangam R, Senthilkumar D, Senthilkumar N, Kannan S, Rengasamy R, and Palani P (2013) Stabilization of mitochondrial and microsomal function of fucoidan from *Sargassum plagiophyllum* in diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis. *Carbohydr Polym* **92**:1377–1385.
- Vassilopoulos A, Pennington JD, Andresson T, Rees DM, Bosley AD, Fearnley IM, Ham A, Flynn CR, Hill S, Rose KL, et al. (2014) SIRT3 deacetylates ATP synthase F1 complex proteins in response to nutrient- and exercise-induced stress. *Antioxid Redox Signal* **21**:551–564.
- Velasco-Loyden G, Pérez-Carreón JI, Agüero JF, Romero PC, Vidrio-Gómez S, Martínez-Pérez L, Yáñez-Maldonado L, Hernández-Muñoz R, Macías-Silva M, and de Sánchez VC (2010) Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochem Pharmacol* **80**:1690–1699.
- Velasco-Loyden G, Pérez-Martínez L, Vidrio-Gómez S, Pérez-Carreón JI, and Chagoya de Sánchez V (2016) Cancer chemoprevention by an adenosine derivative in a model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Tumour Biol*. DOI: 10.1177/1010428317691190.
- Wallace DC and Fan W (2010) Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* **10**:12–31.
- Wellen KE and Thompson CB (2012) A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:270–276.
- Xiong Y, Wang M, Zhao J, Han Y, and Jia L (2016) Sirtuin 3: A Janus face in cancer. *Int J Oncol* **49**:2227–2235.
- Yi CH, Pan H, Seebacher J, Jang IH, Hyberts SG, Heffron GJ, Vander Heiden MG, Yang R, Li F, Locasale JW, et al. (2011) Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell* **146**:607–620.
- Zhang YY and Zhou LM (2012) Sirt3 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through reducing Mdm2-mediated p53 degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **423**:26–31.

Address correspondence to: Victoria Chagoya de Sánchez, Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. C.P. 04510. E-mail: vchagoya@ifc.unam.mx




Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative

María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Gabriela Velasco-Loyden, Mariana Domínguez-López, Lidia Martínez-Pérez & Victoria Chagoya De Sánchez

To cite this article: María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Gabriela Velasco-Loyden, Mariana Domínguez-López, Lidia Martínez-Pérez & Victoria Chagoya De Sánchez (2019): Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative, Cancer Biology & Therapy, DOI: [10.1080/15384047.2019.1665954](https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1665954)


To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1665954>

 View supplementary material 

 Published online: 25 Sep 2019.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 67

 View related articles 

 View Crossmark data 

RESEARCH PAPER



Diminished S-adenosylmethionine biosynthesis and its metabolism in a model of hepatocellular carcinoma is recuperated by an adenosine derivative

María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Gabriela Velasco-Loyden, Mariana Domínguez-López, Lidia Martínez-Pérez, and Victoria Chagoya De Sánchez

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

S-adenosylmethionine (SAM), biosynthesis from methionine and ATP, is markedly decreased in hepatocellular carcinoma (HCC) for a diminution in ATP levels, and the down regulation of the liver specific MAT1a enzyme. Its metabolic activity is very important in the transmethylation reactions, the methionine cycle, the biosynthesis of glutathione (GSH) and the polyamine pathway, which are markedly affected in the HCC. The chemo-preventive effect of IFC305 in HCC induced by DEN, and the increase of ATP and SAM in CCl₄-induced cirrhosis have been previously demonstrated. The aim of this work was to test whether this chemo-preventive effect is mediated by the induction of SAM biosynthesis and its metabolic flow. SAM hepatic levels and the methionine cycle were recovered with IFC305 treatment, restoring transmethylation and transsulfuration activities. IFC305 treatment, increased MAT1a levels and decrease MAT2a levels through modulation of their post-transcriptional regulation. This occurred through the binding of the AUF1 (binding factor 1 AU-rich sites) and HuR (human antigen R) ribonucleoproteins to *Mat1a* and *Mat2a* messenger RNAs, which maintained their nuclear localization. Finally, the compound inhibited the polyamine pathway favoring the recuperation of the normal methionine and one carbon cycle recuperating the metabolic flow of methionine, which probably facilitated its HCC chemo-preventive effect.

ARTICLE HISTORY

Received 11 January 2019
Revised 19 June 2019
Accepted 1 September 2019

KEYWORDS

Hepatocellular carcinoma;
S-adenosylmethionine;
IFC305; *Mat1a*; *Mat2a*;
methionine cycle;
glutathione

1. Introduction

Liver cancer, mainly hepatocellular carcinoma (HCC), is the fourth leading cause of cancer-related deaths globally.¹ Risk factors for HCC include chronic infection with hepatitis B and C viruses (HBV and HCV), dietary aflatoxin, excessive alcohol intake, and cigarette smoking, as well as diabetes and obesity, which play a prominent role in HCC development.^{2,3} Mortality is high due to difficulties in early detection and a lack of available treatment therapies.⁴ HCC is characterized by epigenetic alterations that contribute to preneoplastic and neoplastic lesions. Among them, DNA and protein methylation that induce genomic instability result in a hepatocarcinogenic effect in methyl-deficient conditions with a decrease in S-adenosylmethionine (SAM) in the liver. SAM is an ubiquitous methyl donor that was reported to have chemoprotective activity against liver cancer.^{5–8} Several authors have studied the chemopreventive effects of SAM administration in HCC.^{5,6}

SAM is synthesized in all mammalian cells but is most abundant in the liver. It is synthesized from L-methionine and adenosine triphosphate (ATP), and this reaction is catalyzed by the enzyme methionine adenosyltransferase (MAT; E.C. 2.5.6.1).^{7,8} In mammals, two distinct genes encode MAT enzymes (MAT1A and MAT2A). *Mat1a* is predominantly expressed in the adult liver, while *Mat2a* is ubiquitously expressed in all extrahepatic tissues. MAT2A is found predominantly in the liver during the

fetal period and is progressively replaced by MAT1A during development.^{7,9}

Chronic liver damage initiates a switch in MAT protein expression due to a decrease in MAT1A activity that occurs concomitantly with MAT2A upregulation.^{7,10,11} The kinetics of MAT1A and MAT2A are different since MAT2A is inhibited by its product, which consequently results in lower levels of SAM.^{7,12}

SAM is mostly used in the transmethylation pathway to produce S-adenosylhomocysteine (SAH), which is transformed by SAH-hydrolase into homocysteine and adenosine.^{7,13} SAH is a potent and competitive inhibitor of transmethylation reactions and must be quickly removed.⁷ The SAM/SAH ratio is considered an indicator of methylation activity and liver injury sensitivity.^{9,14} Therefore, low SAM levels and high SAH levels are characteristics of the development of liver cancer.^{15,16}

Previous studies described the effect of the RNA binding proteins (RBPs) HuR (human antigen R) and AUF1 (binding factor 1 AU-rich sites) on the posttranscriptional regulation of the *Mat2a* and *Mat1a* transcripts, for a review, see ref.¹⁷ Both RBPs are nuclear proteins that are translocated to the cytoplasm to regulate MAT mRNA stability through their association with the 3' UTR of specific mRNAs. The translocation of the RBPs is related to various processes, including fetal liver dedifferentiation, apoptosis, hepatic proliferation, and HCC progression, and consequently, diminishes the biosynthesis of SAM.^{18–21}

Previously, we demonstrated that an increased adenosine level coincided with a rise in SAM levels and a decline in SAH levels, suggesting flux in the methylation pathway and phospholipid methylation.^{14,22} In addition, an important circadian change in SAM and adenosine in the rat liver coincides with changes in ATP levels, for a review, see ref.²³ Thus, these findings suggested a correlation between energetic metabolism and SAM formation.

SAM regulates a number of methionine cycle pathways that are perturbed in liver cancer, including the generation of glutathione (GSH) from homocysteine, which can be converted to cysteine via the transsulfuration pathway that utilizes methionine for GSH synthesis.^{24–26}

In addition, SAM also donates an aminopropyl group to putrescine to produce spermidine and 5′methylthioadenosine (MTA) through the polyamine pathway. MTA is used to regenerate methionine by the salvational pathway.^{9,27} Cancer cells have enhanced polyamine biosynthesis and uptake resulting in high intracellular polyamine concentrations. This increase is coupled with different tumors, such as breast, colon, prostate and liver cancer.^{28,29} The high polyamine levels are essential for the rapidly growing cancer cells.^{9,30} In fact, a decline in SAM and MTA levels is necessary for the development of liver cancer.^{9,28,30} However, many other mechanisms are related to decreases in SAM levels and MAT proteins switching.

It has been shown that adenosine administration induces increased SAM and phospholipid methylation, for a review, see ref.¹⁴

Recently, we showed HCC chemoprevention by IFC305 in a sequential model of cirrhosis-HCC induced by diethylnitrosamine (DEN) in rats. DEN is a carcinogen used in different experimental models of HCC. To exert its carcinogenic effects, DEN needs to be bio activated by CYP2E1.³¹ Once bio activated, DEN can generate DNA adducts through alkylation mechanisms. Moreover, the importance of oxidative stress in the development of hepatocarcinogenesis induced by DEN has been suggested because there is a correlation between the induction of lipid peroxidation and preneoplastic

lesions, and it has been further shown that the addition of an antioxidant prevents this effect.³² IFC305 induces the down-regulation of thymidylate synthase and hepatocyte growth factor (HGF), along with augmented protein levels of the cell cycle inhibitor p27, resulting in the inhibition of cell proliferation, for a review, see ref.³³ In addition, we demonstrated that IFC305 promotes increases in ATP levels and the normalization of mitochondrial function in the cirrhosis-HCC model studied here, for a review, see ref.³⁴

As described above, the development of HCC is promoted by a decrease in hepatic SAM. Therefore, the aim of this work was to test whether the chemopreventive effect of IFC305 is mediated by the recovery of the metabolic flow of SAM, the regulation of the SAM/SAH ratio and the inhibition of the polyamine pathway, thereby avoiding cell proliferation.

2. Results

The sequential model of cirrhosis-HCC previously described by Schiffer was histologically corroborated using Masson's trichrome stain. Cirrhosis was detected at week 12, when nodules surrounded by collagen fibers were observed. HCC was established at week 16 when preneoplastic nodules were observed, which were maintained until week 22 (Figure 1 and Supplementary Figure 1). After having ensured the reproducibility of the model, we proceeded to study the effect of IFC305 on SAM synthesis and metabolism.

2.1 IFC305 treatment recovered decreased SAM levels and the SAM/SAH ratio in a sequential model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma

A drop in the biosynthesis of SAM affects hepatic function since it regulates cell differentiation and proliferation and thus sensitivity to liver injury. SAM and SAH levels and the SAM/SAH ratio were quantified in this chronic damage model induced by DEN (Figure 2a). Our results showed

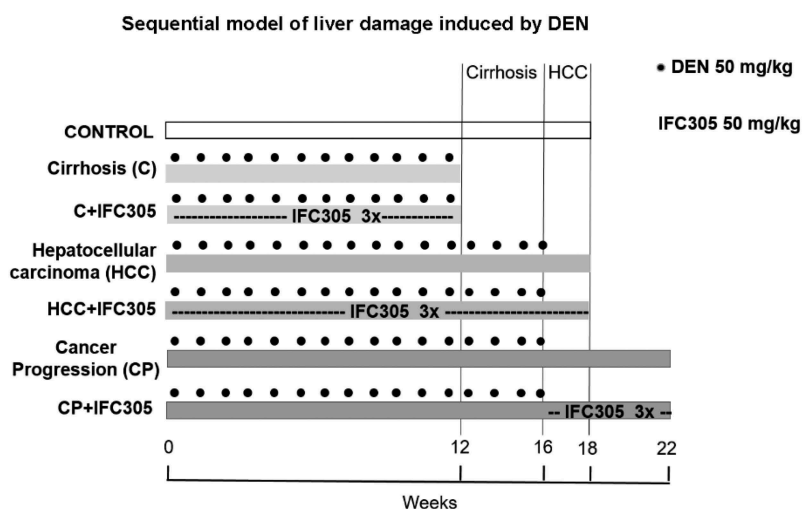


Figure 1. Sequential model of liver damage induced by DEN.

Rats received DEN for 12 weeks to induce cirrhosis (C) and for 16 weeks to induce HCC development. IFC305 was injected in parallel with DEN as a prevention scheme (C+ IFC305 and HCC+IFC305). After suspending DEN treatment, IFC305 was administered from week 16 to week 22 in the cancer progression scheme (CP+IFC305). Rats received DEN dissolved in saline solution once a week, and IFC305 was administered three times per week (IFC305 3X).

a significant diminution in SAM levels in the HCC and CP groups, which were increased with IFC305 treatment in both groups. Once the transmethylation reaction occurs, the product of the reaction is SAH, which is a potent inhibitor of methylation reactions. There were no significant changes in SAH levels in the HCC and CP groups compared to the control group; however, SAH levels diminished significantly in the HCC+IFC305 group and slightly in the CP+IFC305 group (Figure 2b). The SAM/SAH ratio controls the activity of methylation reactions; this calculated ratio indicated a decrease in methylation activity in the HCC and CP groups but a significant increase in the presence of IFC305 (Figure 2c). Similar results in the cirrhosis stage were obtained (Supplementary Figure 2A, 2B, and 2C), in which decreased SAM levels were obtained upon DEN treatment, and IFC305 increased the SAM/SAH ratio.

2.2 IFC305 treatment differentially regulated MAT genes implicated in methionine synthesis in a hepatocellular carcinoma model

We next evaluated the transcriptional changes in the *Mat1a* and *Mat2a* genes in our experimental groups with and without IFC305 treatment. We found that *Mat1a* expression was significantly diminished in DEN-treated samples in both the HCC and CP groups, while treatment with IFC305 increased *Mat1a* expression (Figure 3a). Although *Mat2a* did not show a change in the HCC group, its expression was upregulated in the CP group and downregulated in IFC305-treated rats (Figure 3b).

Next, we analyzed MAT1A protein content. We found that upon DEN treatment, MAT1A protein content was significantly diminished in the HCC group and slightly decreased in the CP group. Our analysis showed a significant increase in

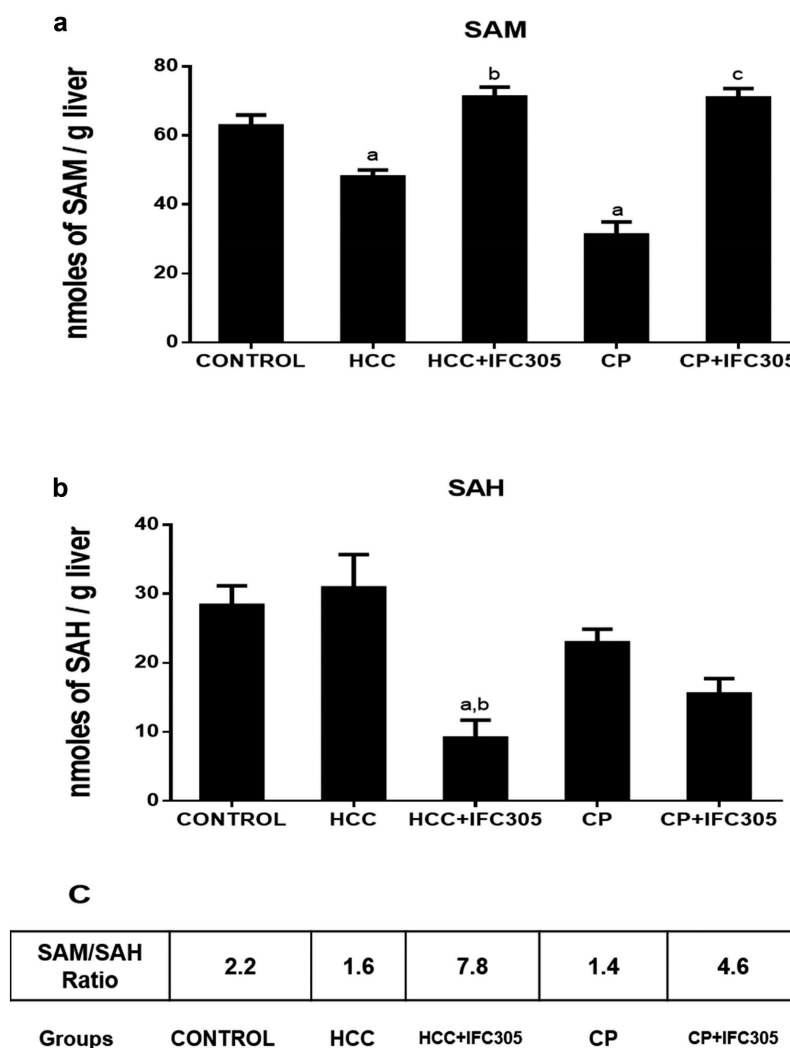


Figure 2. SAM, SAH and SAM/SAH ratio.

A Knauer HPLC system, a UV monitor operating at 254 nm, and a C18 column were used to quantify SAM and SAH in perchloric extracts. A) SAM; B) SAH; C) The SAM/SAH ratio was calculated from the mean of the SAM and SAH quantifications. Values are expressed as the mean \pm standard error (SE) ($n = 7$ rats/group); ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; ^c indicates a significant difference vs. the CP group; $P < .05$.

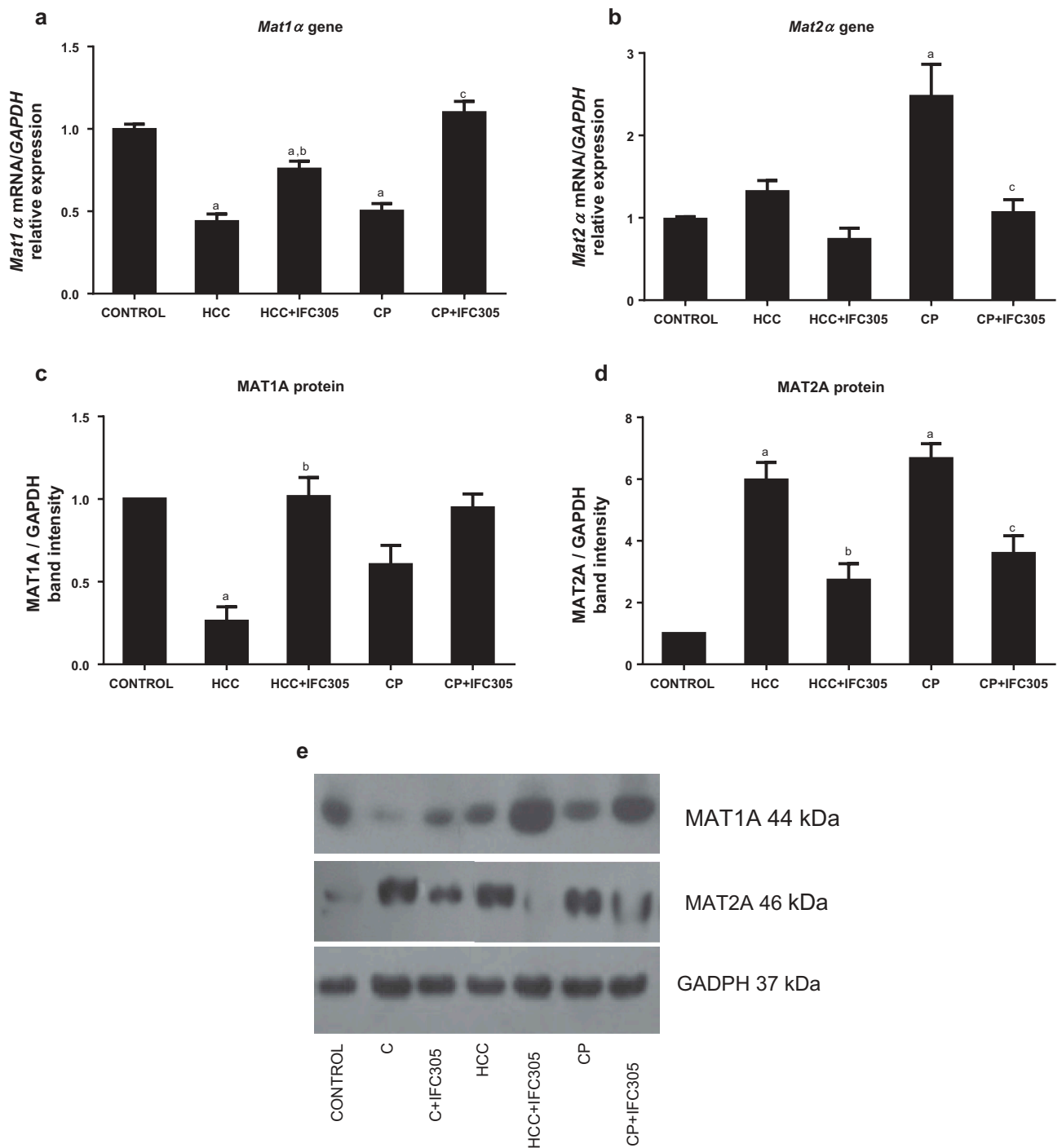


Figure 3. *Mat1a* and *Mat2a* mRNA quantification by qRT-PCR and protein quantification by Western blot.

A) Expression level of the *Mat1a* gene; B) Expression level of the *Mat2a* gene; C) Determination of MAT1A protein level; D) Determination of MAT2A protein level; E) Representative blot showing each experimental group of this model including cirrhosis stage. Values are expressed as the mean \pm SE (n = 7 rats/group). ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; ^c indicates a significant difference vs. the CP group; $P < .05$.

MAT1A protein upon IFC305 treatment (Figure 3c,e). Compared with the control group, the amount of MAT2A protein increased in both the HCC and CP groups, whereas MAT2A protein levels were significantly diminished in the IFC305-treated groups (Figure 3d,e).

We also determined the levels of MAT genes and proteins in the cirrhosis stage. We observed a switch in protein level with a decreased level of MAT1A and an increased level of MAT2A; these changes were prevented by IFC305 treatment

(Supplementary Figure 3). Interestingly, the MAT protein switch that was reversed by IFC305 treatment is strongly implicated in liver cancer progression and prognosis.

2.3 IFC305 treatment changed the status of the cellular distribution of RBPs in a hepatocarcinogenesis rat model

The MAT expression pattern in chronic damage can occur through different mechanisms, such as post transcriptionally

through RBPs. For this reason, the levels of the RBPs, HuR and AUF1 were determined in both cellular compartments (nuclei and cytosol). There is a great interest in understanding how the mature *Mat2a* gene transcript is targeted for upregulation by HuR.

Figure 4a shows that the *HuR* expression level was significantly reduced in the HCC group but did not change in the CP group with respect to the control group. The *HuR* expression level was significantly reduced in the HCC+IFC305 group with

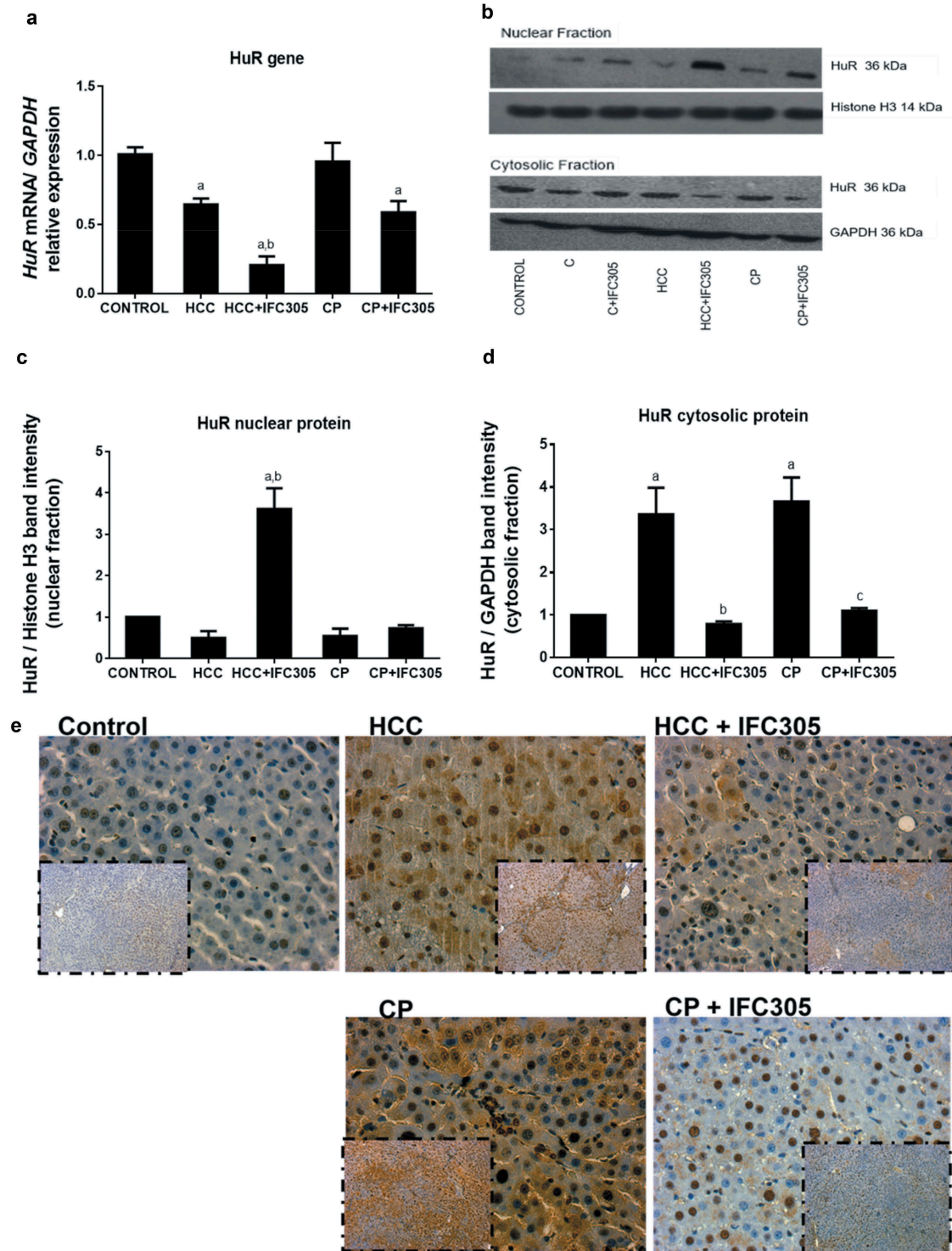


Figure 4. HuR expression, protein level, and immunohistochemical localization.

A) *HuR* mRNA quantification by qRT-PCR; B) Representative blot showing each experimental group of this model including cirrhosis stage; C) Amount of HuR protein in the nuclear compartment; D) Amount of HuR protein in the cytosolic compartment; E) Immunohistochemical localization of HuR at 40X amplification. Values are expressed as the mean \pm SE (n = 5 rats/group). ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; ^c $P < .05$.

respect to the control and HCC groups, and CP+IFC305 samples was reduced only with respect to the control group.

Next, we analyzed the changes in HuR subcellular localization by Western blot and immunohistochemical analysis. Nuclear HuR levels in the HCC and CP groups decreased slightly compared to the control group, but nuclear levels were increased with IFC305 treatment (HCC+IFC305). By contrast, the CP+IFC305 group did not show a change in the amount of nuclear HuR with respect to the control group (Figure 4b,c). However, we also determined the amount of cytoplasmic HuR protein. This assay showed an important increase in this protein in DEN-treated samples in comparison to the control group, while the IFC305-treated groups maintained and restored cytosolic HuR levels (Figure 4b,d). As shown by the representative images of the control, DEN and IFC305-treated samples in Figure 4e, we observed significantly reduced staining of these proteins in IFC305-treated samples compared to DEN-treated control groups.

The alteration in the subcellular localization of HuR in our sequential hepatic damage model in response to DEN and the IFC305-induced translocation of this protein from the cytosol to the nucleus were also documented at the cirrhosis stage. In addition, the level of the HuR protein in a total liver extract was also measured (Supplementary Figure 4).

There is a great interest in understanding how the mature *Mat1a* gene transcript is targeted for downregulation by AUF1. For this reason, we also evaluated changes in the levels of AUF1 in the nuclear and cytoplasmic compartments.

As shown in Figure 5a, the expression level of the *Auf1* gene was increased in the DEN-treated groups and diminished by IFC305 administration. Furthermore, the amount of AUF1 protein detected in the nuclear fraction was enhanced by IFC305 (Figure 5c). In the cytoplasm, the hepatoprotective IFC305 treatment dramatically reduced AUF1 levels compared with the augmented content in the HCC and CP groups (Figure 5d). The immunohistochemical analysis corroborated these results (Figure 5e).

In cirrhosis, the nuclear AUF1 protein content was reduced in the cirrhosis group, and consequently, the AUF1 cytoplasmic protein content was enriched. This effect was prevented by IFC305 treatment. In addition, the level of the AUF1 protein in a total liver extract was also measured (Supplementary Figure 5).

Additionally, the effect of the IFC305 compound on the level of the MAT proteins and RBPs were evaluated in the HUH7 cell line; we found an increment of MAT2A, HuR and AUF1 after 4 h of IFC305 (5mM) treatment and after this time, a diminution was observed. In the case of MAT1A a diminution was observed at 4 and 6 h after IFC305 (5mM) treatment but a recuperation to the level of the not treated cells was detected. Thus, we observed that IFC305 also modulates the levels of these proteins in the human HuH7 cell line and that supports the data obtained in tissue (data not show).

2.4 The hepatoprotective IFC305 treatment aided in recovering the interactions of RBPs and MAT genes that are altered by DEN

The cytoplasmic stability of eukaryotic mRNA is an important checkpoint in the control of gene expression. In fact, AUF1 and HuR are also involved in liver dedifferentiation and the

development and progression of HCC. We next examined the effect of IFC305 on RNP (ribonucleoprotein) complexes.

As shown in Figure 6a, RNP complexes (HuR-*Mat2a* mRNA) were increased markedly in the HCC group, whereas RNP complex formation was reduced in the HCC+IFC305 group. However, in the CP and CP+IFC305 groups, the number of HuR-*Mat2a* mRNA complexes was not modified with respect to the control group.

We found that the AUF1-*Mat1a* mRNA complex was reduced in both the HCC and CP groups, however, only a slight increase in complex formation was observed with IFC305 treatment compared to DEN treatment (Figure 6b).

2.5 IFC305 treatment stimulated GSH biosynthesis and reduced spermidine synthetase expression that is altered by DEN

In hepatocytes, methionine can be generated by the one carbon cycle (Figure 8), and HCyst can be converted to cysteine to generate GSH. We determined the effect of the IFC305 adenosine derivative on the GSH pool and its contribution to protection against hepatic damage. Our results showed that DEN administration for 16 weeks did not induce significant changes in the levels of GSH seen in the HCC group; however, treatment with IFC305 increased GSH levels significantly compared to the control group. No significant diminution was observed in the CP or CP+IFC305 group (Figure 7a). A significant increase in the levels of GSSG were observed in the HCC group (Figure 7b), whereas no changes were observed in the HCC+IFC305 group compared to the control group. A significant decrease in the GSSG content in the CP and CP+IFC305 groups was observed compared to the HCC group. The GSH/GSSG ratio is a useful parameter as an indicator of the redox state. Despite the changes described in GSH and GSSG, no changes in the GSH/GSSG ratio were observed, except in the CP +IFC305 group, where a significant increase was observed compared with the control, HCC and CP groups (Figure 7c). The total glutathione content (GSH+GSSG) is shown in Figure 7d. An increased glutathione content in the HCC and HCC+IFC305 groups compared to the control group was seen. No significant changes in the CP and CP+IFC305 groups compared to the control group were found. Our results from the experimental HCC group treated with IFC305 suggest that this adenosine derivative salt also mediates the GSH biosynthesis in the cirrhosis stage, and the effect of IFC305 on the GSH pool is not significant (Supplementary Figure 6A-D).

It is well known that GSH is the most abundant non-protein thiol in mammalian cells and it protects against oxidative stress. As such, we next assessed the antioxidant potential of IFC305 treatment.

MDA (malondialdehyde) is one of the products of lipid peroxidation and has been related to carcinogenesis induced by DEN; thus, measuring MDA levels is a useful approach to assess lipid peroxidation. A significant increase in lipid peroxidation in the HCC group was observed, which was prevented by IFC305 treatment (HCC+IFC305 group). MDA levels were diminished in the CP group, and there was no change in the CP+IFC305

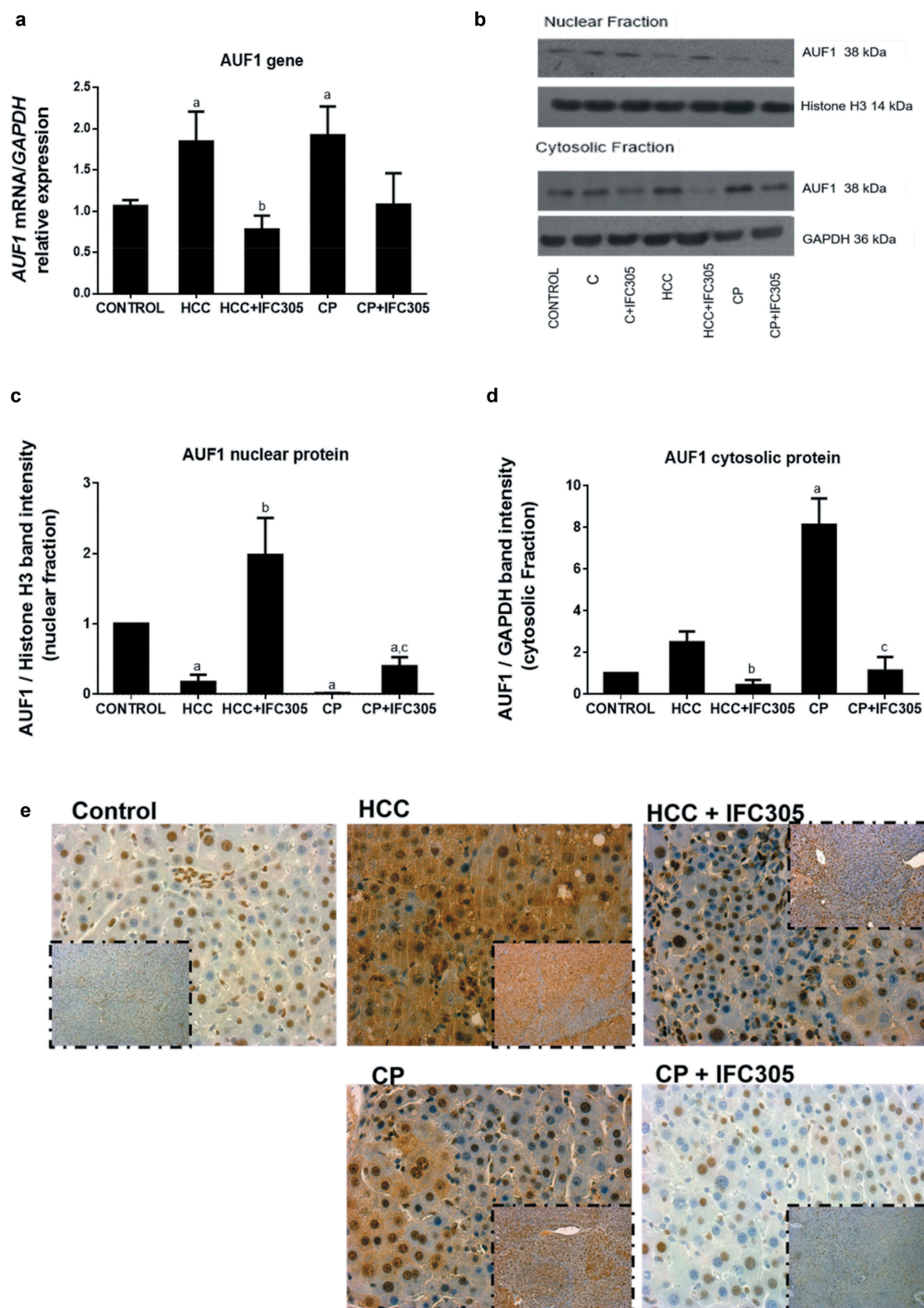


Figure 5. AUF1 expression, protein level, and immunohistochemical localization.

A) AUF1 mRNA quantification by qRT-PCR; B) Representative blot showing each experimental group of this model including cirrhosis stage; C) Amount of AUF1 protein in the nuclear compartment; D) Amount of AUF1 protein in the cytosolic compartment; E) Immunohistochemical localization of AUF1 at 40X amplification. Values are expressed as the mean \pm SE (n = 5 rats/group). ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; ^c indicates a significant difference vs. the CP group; $P < .05$.

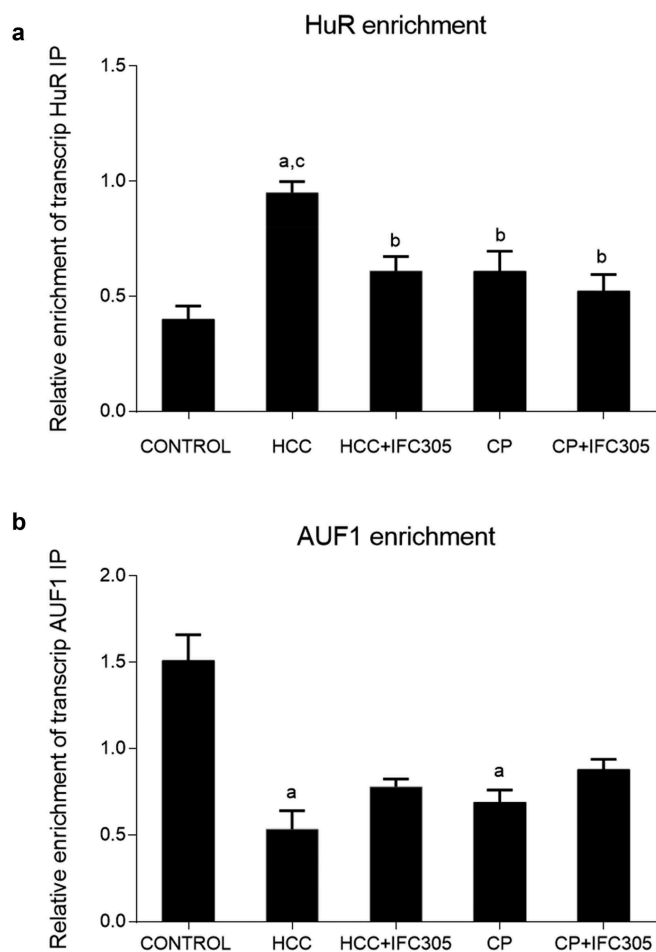


Figure 6. A) Enrichment of IP AUF-1 transcript; B) Enrichment of IP HuR-1 transcript.

Values are expressed as the mean \pm SE ($n = 5$ rats/group). ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; $P < .05$.

group (Figure 7e). No significant changes in the cirrhotic stage were observed (Supplementary Figure 6E).

As mentioned above, polyamine levels increase in different types of cancer through a pathway derived from SAM. We next measured *Sms* gene expression since it is part of the polyamine pathway. A significant increase in *Sms* expression in the HCC group was observed compared to the control group, and a slight decrease in *Sms* expression was observed in the CP group compared to the HCC group. *Sms* expression was diminished markedly with IFC305 treatment (Figure 7f), which probably decreased the activity of the polyamine pathway. This effect was evaluated in the cirrhosis stage (Supplementary Figure 6F), where diminished *Sms* expression (C group) and a slight effect of IFC305 were observed (C+ IFC305 group).

3. Discussion

S-adenosylmethionine deficiency strongly favors HCC development, which can be inhibited by reconstitution of normal levels by exogenous administration of SAM.^{6,35} SAM biosynthesis requires methionine and ATP as substrates for the enzyme MAT1A. Nevertheless, methionine is not synthesized de novo, but it can be recovered from homocysteine remethylation by methionine synthetase or betaine/homocysteine methyltransferase through the one carbon cycle (Figure 8). ATP is an energetic substrate generated through oxidative phosphorylation in mitochondria. Previous studies in hepatotoxicity induced with ethanol or carbon tetrachloride showed that decreased ATP levels generated an energetic unbalance that was recuperated by adenosine treatment.^{23,36,37} Similar effects of increasing ATP in hepatocytes³⁸ and in the blood by adenosine treatment³⁹ have been reported. At the time of publication, the mechanism of the effect was not clear, but we have recently described an important effect of adenosine

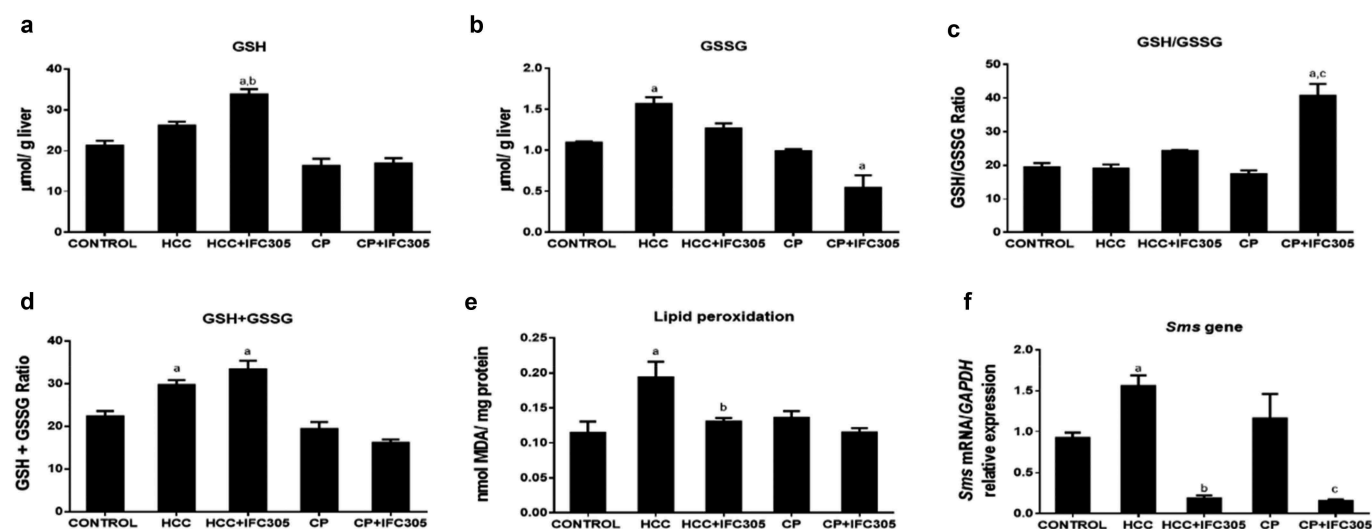


Figure 7. Oxidative stress determined through lipid peroxidation and glutathione content and *Sms* gene expression in the HCC and CP groups and the effect of IFC305.

A) Lipid peroxidation as determined by malondialdehyde (MDA) content; B) Reduced glutathione (GSH) content; C) Oxidized glutathione (GSSG) content; D) GSH/GSSG ratio; E) Total glutathione (GSH+GSSG) content; F) *Sms* gene expression. Values are expressed as the mean \pm standard error (SE) ($n = 5$ rats/group). ^a indicates a significant difference vs. the control group; ^b indicates a significant difference vs. the HCC group; ^c indicates a significant difference vs. the CP group; $P < .05$.

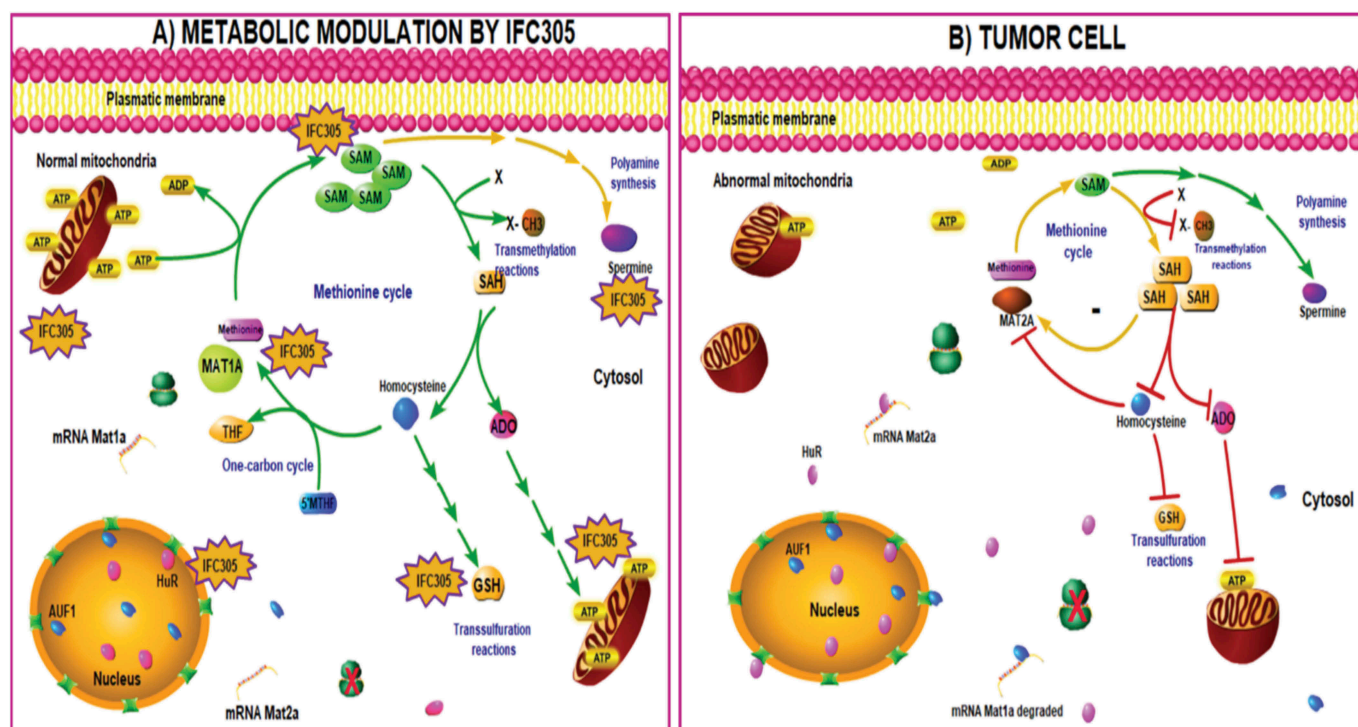


Figure 8. SAM metabolic deficiency in liver cancer and its recovery induced by a hepatoprotective agent derived from adenosine.

A) In tumor cells, SAM synthesis is low due to mitochondrial dysfunction and the consequent decrease in ATP levels. Additionally, biosynthesis catalyzed by MAT2A, which is only expressed in chronic liver damage such as cirrhosis or hepatocellular carcinoma, is limited. This is supported by the RNA-binding proteins HuR and AUF1. HuR positively regulates *Mat2a* mRNA stability, promoting its cytosolic translation and consequently altering the methionine cycle and SAM levels. *Mat1a* mRNA is rapidly destabilized and degraded due to the specific binding of AUF1, which is translocated to the cytosol during the tumor process. B) The hepatoprotective agent IFC305 normalizes mitochondrial function, recuperating ATP levels and SAM biosynthesis, which is also favored by the normalization of MAT1A expression. The IFC305 compound promotes *Mat1a* mRNA translation, avoiding AUF1 translocation to the cytosol, whereas *Mat2a* mRNA is not stabilized by HuR and its translation is not carried out. As a consequence of the recovery of mitochondrial function and SAM levels, the methylation index and the metabolic flow of the methionine cycle are recuperated, which facilitate glutathione biosynthesis, thereby preventing the oxidative imbalance in the tumor.

derivatives in recovering and maintaining ATP synthesis in the HCC and CP groups induced by DEN. We have shown that this occurs through a recuperation of the functional, metabolic and dynamic mitochondrial changes observed in this model.³⁴ There is much evidence that MAT protein switching and RBPs play an important role in the transcriptional regulation of liver cancer.^{20,40,41} The results of this study showed a cytoplasmic increase in HuR and AUF1 in the HCC and CP groups; the presence of IFC305 administration increased the nuclear levels of these RBPs, with a consequent reduction in the cytoplasmic levels favoring the increase in MAT1A and the recuperation of SAM biosynthesis.

Pioneering observations have demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF) induces the phosphorylation and activation of LKB1 and, consequently, AMPK.^{19,42} AMPK phosphorylation then induces HuR translocation to cytoplasm, promoting an increase in the half-life of MAT2A mRNA, which further contributes to decreasing SAM synthesis. Although a clear mechanism is not described for AUF1, a similar regulation is likely to occur since both RBPs are preferably nuclear and respond to various cell stresses through cytoplasmic translocation. We observed that the hepatoprotective agent IFC305 reduced AMPK protein phosphorylation in our sequential model induced by DEN (data not shown) preventing such translocation.

In chronic liver damage, the nuclear membrane becomes permeable due to the high levels of reactive oxygen species (ROS). Previously, we demonstrated that adenosine and IFC305 have antioxidant properties that repair the mitochondria and prevent the main ROS source from diminishing lipid peroxidation.^{34,37} Therefore, the probable mechanism by which IFC305 blocks the cytoplasmic translocation of HuR and AUF1 could be through repairing mitochondrial function and reducing the cellular energy stress and ROS formation. However, other possibilities must be explored, for example, a decrease in proteins that favor subcellular translocation, such as nucleolin 5, or perhaps increased RBP degradation by the proteasome. Once IFC305 is able to maintain the AUF1 protein in the nucleus, MAT1A-mRNA can be translated freely and normally in the cytosol. The MAT1A enzyme is ubiquitously expressed in normal hepatocytes and is downregulated in HCC. In the case of MAT2A mRNA and HuR protein, IFC305 promotes a reduction in the level of these RBPs in the cytosol, and consequently MAT2A protein levels were reduced to control levels. This in vivo study suggests that the IFC305 hepatoprotective compound can reduce the interaction of HuR-MAT2A mRNA in preneoplastic or neoplastic stages of HCC. Furthermore, we found a significant decrease in nuclear AUF1 content, favoring the decrease in *Mat1a* mRNA expression and consequently SAM content, starting

in the cirrhosis stage and maintained until HCC in this sequential model. Because the exact mechanism of the progression from cirrhosis to HCC is not yet known, this result suggests a potential role for the MAT protein switch in the promotion and evolution of damage.

Once the substrate levels and MAT1A activity recuperated, there was an increase in the SAM level in the HCC and CP groups and in cirrhosis. We calculated the methylation activity through the SAM/SAH ratio, obtaining a high ratio in the HCC and CP groups treated with IFC305. Specific studies are in progress, but previous epigenetic studies in a cirrhotic model induced with CCl₄ showed that IFC305 induced an increase in total DNA methylation, as well as an increase in specific genes, such as the *Coll1a1* gene.⁴³ The low methylation ratio in the HCC and CP groups results from the accumulation of SAH, which is an inhibitor of the methylation reaction and is not degraded by S-adenosylhomocysteine hydrolase, thereby preventing the progression of the methionine cycle. Our results showed that IFC305 helped to maintain the methionine cycle through the activity of SAH-hydrolase, which generates adenosine and homocysteine that can be converted to cysteine, and the transsulfuration pathway, which contributed to maintaining a high GSH pool in the liver in HCC. No changes were observed in glutathione content in the cancer progression groups (CP and CP+IFC305), probably due to the absence of DEN and the fact that IFC305 recovers mitochondrial function and, therefore, decreases ROS generation.

Chemical carcinogenesis is strongly associated with the formation of ROS, and DEN, which was used in this model, generates ROS during its metabolism.⁴⁴ In this study, we assessed its participation through lipid peroxidation as evaluated by liver MDA levels. The results showed an important increase in the HCC group that was normalized in the presence of IFC305, possibly by the effect that the compound has on GSH formation and the reduction of damage from free radicals.

Hepatocarcinogenesis is also associated with marked increases in polyamine synthesis, which is also modulated by SAM.⁴⁵ This process was evaluated by measuring the expression of the *Sms* gene of the spermine synthase pathway, which was increased in the HCC and CP groups. IFC305 decreased the expression of *Sms* markedly, resulting in the decrease in polyamines and representing another anticarcinogenic effect of the compound. The results of this study reflect the differential effects of IFC305 in a sequential model of hepatocarcinogenesis induced by DEN. These effects include the increase in antioxidant reactions and an inhibition of polyamine synthesis that is related to cell growth, proliferation and the promotion of liver cancer. Furthermore, it was previously demonstrated that this compound induces the downregulation of hepatocyte growth factor and thymidylate synthase, which together with the augmentation of the cell cycle inhibitor p27, resulted in proliferation inhibition,³³ confirming the chemopreventive effect of IFC305.

A schematic representation of the changes observed in the present work and their modulation by the chemopreventive compound IFC305 is shown in [Figure 8](#).

4. Concluding remarks

Cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by chronic DEN intoxication results in SAM diminution, modifies the activity of MAT proteins, induces the posttranscriptional modification of MAT mRNAs, causes abnormalities in the methionine cycle and favors cellular proliferation. Our studies indicated that IFC305 could prevent DEN-induced liver injury by increasing ATP levels, SAM biosynthesis, normalizing MAT protein activities, inducing MAT protein switching and RBP localization to the nucleus, normalizing the methionine cycle that regulates GSH and polyamines in the liver, and reducing proliferation pathways.

The changes in methionine and SAM metabolism induced by DEN strongly contribute to HCC. However, IFC305-induced changes maintain physiological SAM levels, metabolism and function, which could be therapeutic targets in preneoplastic liver lesions and liver tumors.

5. Materials and methods

5.1 Chemicals

IFC305 is the aspartate salt of adenosine, and it was prepared with adenosine free base (MP Biomedicals, (100199)) and L-aspartic acid (MP Biomedicals, (100809)) as described previously (Patent No. MX220780; MX 207422; US 8,507,459 B2).^{46–48} N-Diethylnitrosamine (DEN, N0756), SAM (A4377), SAH (A9384), and 1-heptanosulfonic acid sodium salt (PH015877) were purchased from Sigma-Aldrich. NH₄H₂PO₄ and HClO₄ (109065) solutions (at a 0.4 N concentration) were from Merck (Darmstadt, Germany), and methanol (HPLC grade, 822283) was obtained from Merck.

5.2 Study design

Male Wistar rats weighing 200–250 g were obtained from and housed at the Animal Facility of the *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. The animals were fed *ad libitum* and housed under controlled conditions (22 ± 2°C, 50–60% relative humidity, and 12 h light-dark cycles).

The rats received DEN (0.05 g kg⁻¹ of body weight, i.p) dissolved in saline solution once a week, and IFC305 was administered (0.05 g kg⁻¹ of body weight, i.p) three times per week (IFC305 3X). The sequential model induced by DEN was divided into two main groups: hepatocellular carcinoma (HCC) and cancer progression (CP) ([Figure 1](#)).

The HCC group was treated over 16 weeks with DEN, followed by a 2-week wash-out period for multifocal HCC development. The HCC plus IFC305 group (HCC+IFC305) was treated for 16 continuous weeks with both compounds. The cancer progression group (CP) received DEN for 16 weeks, followed by saline solution for 6 weeks. Finally, the cancer progression plus IFC305 group (CP+IFC305) received DEN for 16 weeks and then IFC305 for 6 weeks after DEN was suspended ([Figure 1](#)).⁴⁹ Age-matched normal rats were used as controls; these animals received only saline solution. Animals were euthanized by sodium pentobarbital (Pisa, Mexico) anesthesia, after which the liver was recovered,

and the cirrhotic area and tumor foci were frozen in liquid nitrogen for the determinations described later. An additional fraction was fixed with paraformaldehyde.

Animals received humane care and were used according to institutional guidelines, and the protocol was approved by the *Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (VCHH53-14)* and the Mexican Official Norm (NORM-062-ZOO-1999).

5.3 Total protein extraction

Liver samples were homogenized with RIPA buffer (0.1 g of tissue per milliliter of buffer) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche Diagnostics Corp, 116974498001). The homogenate was centrifuged at 15,965 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatant was utilized as the total liver homogenate.

5.4 Nuclear protein extraction

The isolation of intact and stable nuclei was accomplished through an isosmotic lysis procedure, as reported previously.⁵⁰ The nuclear envelope remained intact even during further manipulations of washing, freezing, and ultracentrifugation. Briefly, 0.8 g of liver tissue was homogenized in 1.6 ml of buffer containing 0.25 M sucrose (S9378, Sigma), 0.05 M Tris-Cl (T1503, Sigma), and 0.005 M KCl (3040-01 JT Baker). The homogenate was filtered and supplemented with 3 ml of a 2.3 M sucrose solution to increase the homogenate's density. Then, a sucrose gradient was created by adding 1.5 ml of a 2.3 M sucrose solution to the bottom of the tube. The nucleus was isolated by centrifugation at 255,000 *g* for 30 min at 4°C. After isolation, nuclear lysis was achieved by incubation and stirring with hypotonic and hypertonic solutions.

5.5 Western blot

Volumes equivalent to 30 µg of protein (determined using a Bradford assay, 500-0114, Biorad) were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (IPVH00010, Merck) and blotted using the following antibodies: HuR (sc-20694), MATIA (sc-13142), and MATIIA (H-48) (Santa Cruz Biotechnology); AUF1 (Abcam, ab61193), histone H3 (SC56616, Santa Cruz Biotechnology) and GAPDH (Ab2302, Millipore Corp).⁵¹ Densitometric analyzes of bands were performed with Quantity-One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

5.6 Assessment of lipid peroxidation

The extent of lipid peroxidation was determined by measuring the formation of malondialdehyde (MDA) using the thiobarbituric acid method as previously described by Okawa et al.⁵²

5.7 Determination of GSH and GSSG levels

Liver samples were homogenized on ice in a solution consisting of 3.75 ml of phosphate-EDTA (E5134, Sigma) and 1 ml of 25% H₃PO₄. The total homogenate was centrifuged at 17,700 *g* at 4°C for 30 min, and the supernatant was used in

the assay. Determination of the GSH level was performed according to Hissin and Hilf.⁵³ To dilute the supernatant, 0.01 ml of the supernatant and 4.9 ml of phosphate-EDTA buffer, pH 8.0, were mixed. The assay mixture (2.0 ml) contained 100 µl of the diluted supernatant, 1.8 ml of phosphate-EDTA buffer, and 100 µl of o-phthalaldehyde (1 µg/µl, PO6576 Sigma). After incubation at room temperature for 15 min, the solution was transferred to a quartz cuvette. To determine the GSSG content,⁵³ 0.5 ml of the supernatant was incubated at room temperature with 200 µl of 0.04 M N-ethylmaleimide (E3876, Sigma) for 30 min to interact with the GSH in the tissue. Then, 4.3 ml of 0.1 N NaOH (S8045, Sigma) was added. This mixture was used to measure GSSG using the assay for GSH, but 0.1 N NaOH was used as the diluent rather than phosphate-EDTA buffer. Fluorescence at 420 nm was determined with excitation at 350 nm.

5.8 RT-PCR

Total RNA was obtained using an RNA isolation kit (Direct-*Trizol* RNA mini Prep R205S, Zymo Research, The Epigenetics Company). RNA quantity and purity were determined spectrophotometrically at 260/280 nm with a Nanodrop®. RNA quality was verified by agarose-gel electrophoresis. cDNA synthesis was performed with 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) following the manufacturer's protocol. The mRNA determinations of *Mat1a* (Rn00563454_m1), *Mat2a* (Rn01643368_g1), *HuR* (Rn01403240_m1), *AUF1* (Rn01450137_g1), *Sms* (Rn01770794_g1), and *Gapdh* (Rn01775763_g1) were carried out with a TaqMan® Gene expression assay using a FAM™ dye-labeled probe for rats (Applied Biosystems, Inc.). *Mat1a*, *Mat2a*, *HuR*, *AUF1* and *Sms* expression was normalized against *Gapdh* expression with the comparative Ct method. All reactions were performed in the Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.9 HPLC

Liver tissue (0.250 g) was homogenized in ice-cold 0.4 M perchloric acid (500 µl). Then, it was centrifuged at 8380 *g* for 10 min. The supernatant was divided into aliquots and frozen until quantification was done. The method was performed according to She *et al.*⁵⁴ Briefly, aliquots of the acid extracts (50 µl) were directly subjected to HPLC analysis.

A Knauer HPLC system (UV detector Model 2500, Isocratic Pump Model 1000 and Manager Model 5000), a UV monitor operating at 254 nm, and a C18 150 × 4.6 mm × 5 µm column (ACE-Generix, Scotland) were used. The mobile phase was chosen according to She *et al.*,⁵⁴ filtered through a 0.45 µm RC membrane filter and degassed under vacuum. The isocratic elution was carried out at a flow-rate of 1 ml/min at 25°C. During HPLC analysis, the SAM and SAH standards and biological samples were identified according to their retention times.

The standards were dissolved in Milli-Q^R grade water at a concentration of 10 mM and then diluted with 0.4 N HClO₄ to the final concentration used in the HPLC system (14 µM SAM and 41.5 µM SAH). Aliquots of a standard solution (50 µl) were injected into the column.

5.10 RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP)

Liver tissue (200 mg) was finely fragmented, resuspended in 1 ml PBS plus protease and phosphatase inhibitors (freshly prepared) and 37% formaldehyde (F8775, Sigma, 27 μ l) and kept at room temperature for 10 min with frequent mixing. Glycine was added (G8898, Sigma, 75 μ l), and samples were kept at room temperature for 10 min with frequent mixing, after which they were subsequently centrifuged (1,397.5 g, 5 min, 4°C).

The pellet was resuspended in 1 ml PBS plus protease and phosphatase inhibitors (freshly prepared), followed by centrifugation (1,397.5 g, 5 min, 4°C).

The pellet was then resuspended in freshly prepared RIP buffer (1.5 ml; 150 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5 mM DTT (D0632, Sigma), 0.5% IGEPAL I3021, Sigma), 100 U/mL RNase Inhibitor and protease and phosphatase inhibitors).

Samples were homogenized with a Teflon rod with 15–30 strokes. The nuclear pellet and debris were separated by centrifugation (9,447.1 g, 10 min, 4°C).

Next, the supernatant was divided into three fractions of 500 μ l (for Input, IgG, and IP). The input fraction was kept at 4°C until use.

Antibody (5 μ g for HuR and AUF1) was added to the protein of interest, and IgG (5 μ g) was added to the supernatant (500 μ g of protein, previously quantified), followed by incubation overnight at 4°C with gentle rotation. A/G beads (40 μ l, Chip-Grade Protein A/G Magnetic Beads, Thermo Scientific) were then added, followed by a 2 h incubation at 4°C with gentle rotation. The beads were then pelleted by centrifugation (349.3 g, 30 s), the supernatant was removed, and the beads were resuspended in RIP buffer (500 μ l). This was repeated for a total three RIP washes, followed by one wash in PBS, and finally centrifugation at 349.3 g for 1 min.

For purification of RNA bound to immunoprecipitated RBPs, the coprecipitated RNAs were isolated by resuspending beads in Tripure RNA extraction reagent (1166716S001, Roche; 1 ml, according to the manufacturer's instructions). An INPUT sample was also included.

The RNA was eluted with nuclease-free water (20 μ l). The RNA was reverse transcribed into DNA according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit), and qRT-PCR analyses were performed as described above.

5.11 Tissue preparation, histology and immunohistochemistry

Liver samples were taken from all the animals and fixed with 10% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline for 24 h and transferred to 70% ethanol. Fixed tissues were embedded in paraffin, sectioned to a thickness 4 μ m and stained for primary antibodies at 1:100, anti-HuR and anti-AUF1; and 1:50 anti-Mat1a and anti-MAT2A with the DakoEnVision⁺ System-HRP (DAB) (Dako, Carpinteria, CA) as previously described.⁵¹ Histological slides were analyzed with the MBF ImageJ processing software for microscopy.

5.12 Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SE). Statistical significance was evaluated by Tukey's test using Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA). Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.1$.

Acknowledgments

We are grateful for the Histology unit and the Bioterium technical collaboration of the Instituto de Fisiología Celular. We thank Dr. Julio Isael Pérez-Carreón for the donation of the SMS Taqman probe.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors report no conflict of interest

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) under grant [240315] and Dirección General de Asuntos del Personal Académico–Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) under grant [IN208915].

Authorship contributions

Participated in the research design: María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Mariana Domínguez-López, Gabriela Velasco-Loyden and Victoria Chagoya de Sánchez.

Conducted experiments: María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Gabriela Velasco-Loyden, Mariana Domínguez-López and Lidia Martínez-Pérez.

Performed data analysis: María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, and Victoria Chagoya de Sánchez.

Contributed to the writing of the manuscript: María Guadalupe Lozano-Rosas, Enrique Chávez, Mariana Domínguez-López, Gabriela Velasco-Loyden and Victoria Chagoya de Sánchez.

References

- IARC. 2018. Available from: www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf
- Gan L, Liu Z, Sun C. Obesity linking to hepatocellular carcinoma: A global view. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1869:97–102.
- Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res*. 1989;49:2506–2509.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer J Int Du Cancer*. 2010;127:2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.
- Wang Y, Sun Z, Szyf M. S-adenosyl-methionine (SAM) alters the transcriptome and methylome and specifically blocks growth and invasiveness of liver cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8:111866–111881. doi:10.18632/oncotarget.22942.
- Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Feo F. Chemoprevention of hepatocarcinogenesis: S-adenosyl-L-methionine. *Alcohol*. 2002;27:193–198.
- Lu SC, Mato JM. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol Rev*. 2012;92:1515–1542. doi:10.1152/physrev.00047.2011.
- Li TW, Yang H, Peng H, Xia M, Mato JM, Lu SC. Effects of S-adenosylmethionine and methylthioadenosine on

- inflammation-induced colon cancer in mice. *Carcinogenesis*. 2012;33:427–435. doi:10.1093/carcin/bgr295.
9. Pascale RM, Feo CF, Calvisi DF, Feo F. Deregulation of methionine metabolism as determinant of progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018;3:36. doi:10.21037/igh.
 10. Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J*. 2002;16:15–26. doi:10.1096/fj.01-0401rev.
 11. Anstee QM, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: a review of current evidence and clinical utility. *J Hepatol*. 2012;57:1097–1109. doi:10.1016/j.jhep.2012.04.041.
 12. Ramani K, Mato JM, Lu SC. Role of methionine adenosyltransferase genes in hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2011;3:1480–1497. doi:10.3390/cancers3021480.
 13. Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, Cantoni GL. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends in Genet*. 1997;13:51–52.
 14. Chagoya de Sanchez V, Hernandez-Munoz R, Sanchez L, Vidrio S, Yanez L, Suarez J. Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int J Biochem*. 1991;23:1439–1443. doi:10.1016/0020-711x(91)90287-w.
 15. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830:3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
 16. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*. 2000;39:13005–13011. doi:10.1021/bi001088w.
 17. Vazquez-Chantada M, Fernandez-Ramos D, Embade N, Martinez-Lopez N, Varela-Rey M, Woodhoo A, Luka Z, Wagner C, Anglim PP, Finnell RH, et al. HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed during liver proliferation, differentiation, and carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138:1943–1953. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.032.
 18. Zucal C, D'Agostino V, Loffredo R, Mantelli B, NatthakanThongon LP, Lal P, Latorre E, Provenzani A. Targeting the multifaceted HuR protein, benefits and caveats. *Curr Drug Targets*. 2015;16:499–515.
 19. Gomez-Santos L, Vazquez-Chantada M, Mato JM, Martinez-Chantar ML. SAME and HuR in liver physiology: usefulness of stem cells in hepatic differentiation research. *Methods Mol Biol*. 2012;826:133–149. doi:10.1007/978-1-61779-468-1_12.
 20. Frau M, Tomasi ML, Simile MM, Demartis MI, Salis F, Latte G, Calvisi DF, Seddaiu MA, Daino L, Feo CF, et al. Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. *Hepatology*. 2012;56:165–175. doi:10.1002/hep.25643.
 21. Trojanowicz B, Dralle H, Hoang-Vu C. AUF1 and HuR: possible implications of mRNA stability in thyroid function and disorders. *Thyroid Res*. 2011;4(Suppl 1):S5. doi:10.1186/1756-6614-4-S1-S5.
 22. Chagoya de Sanchez V. Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms? *Can J Physiol Pharmacol*. 1995;73:339–355. doi:10.1139/y95-044.
 23. Chagoya de Sanchez V, Brunner A, Pina E. In vivo modification of the energy charge in the liver cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46:1441–1445. doi:10.1016/s0006-291x(72)80138-4.
 24. Ishii I, Akahoshi N, Yamada H, Nakano S, Izumi T, Suematsu M. Cystathionine gamma-Lyase-deficient mice require dietary cysteine to protect against acute lethal myopathy and oxidative injury. *J Biol Chem*. 2010;285:26358–26368. doi:10.1074/jbc.M110.147439.
 25. Meredith MJ, Cusick CL, Soltaninassab S, Sekhar KS, Lu S, Freeman ML. Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine-dependent GSH efflux. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248:458–463. doi:10.1006/bbrc.1998.8998.
 26. Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *Faseb J*. 2001;15:1335–1349. doi:10.1096/fj.00-0650rev.
 27. Mato JM, Martinez-Chantar ML, Lu SC. S-adenosylmethionine metabolism and liver disease. *Ann Hepatol*. 2013;12:183–189.
 28. Cervelli M, Pietropaoli S, Signore F, Amendola R, Mariottini P. Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;148:233–248. doi:10.1007/s10549-014-3156-7.
 29. Bae DH, Lane DJR, Jansson PJ, Richardson DR. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1862:2053–2068. doi:10.1016/j.bbagen.2018.06.004.
 30. Olsen RR, Chung I, Zetter BR. Knockdown of antizyme inhibitor decreases prostate tumor growth in vivo. *Amino Acids*. 2012;42:549–558. doi:10.1007/s00726-011-1032-x.
 31. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther*. 1996;71:57–81.
 32. Sanchez-Perez Y, Carrasco-Legleu C, Garcia-Cuellar C, Perez-Carreón J, Hernandez-García S, Salcido-Neyoy M, Alemán-Lazarini L, Villa-Treviño S. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2005;217:25–32. doi:10.1016/j.canlet.2004.07.019.
 33. Velasco-Loyden G, Perez-Martinez L, Vidrio-Gomez S, Perez-Carreón JI, Chagoya de Sanchez V. Cancer chemoprevention by an adenosine derivative in a model of cirrhosis-hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine in rats. *Tumour Biol*. 2017;39:1010428317691190. doi:10.1177/1010428317691190.
 34. Chavez E, Lozano-Rosas MG, Dominguez-Lopez M, Velasco-Loyden G, Rodriguez-Aguilera JR, Jose-Nunez C, Tuena de Gómez-Puyou M, Chagoya de Sánchez V. Functional, metabolic, and dynamic mitochondrial changes in the rat cirrhosis-hepatocellular carcinoma model and the protective effect of IFC-305. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;361:292–302. doi:10.1124/jpet.116.239301.
 35. Yang HP, Zheng YH, Li TWH, Peng H, Fernandez-Ramos D, Martinez-Chantar ML, Rojas AL, Mato JM, Lu SC. Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells (vol 288, pg 23161, 2013). *J Biol Chem*. 2014;289:696. doi:10.1074/jbc.A113.487157.
 36. Garcia-Sainz JA, Hernandez-Munoz R, Glender W, Pina E, Chagoya de Sanchez V. Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 1980;29:1709–1714. doi:10.1016/0006-2952(80)90129-x.
 37. Chagoya de Sanchez V, Hernandez-Munoz R, Yanez L, Vidrio S, Diaz-Munoz M. Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *J Biochem Toxicol*. 1995;10:41–50.
 38. Lund P, Cornell NW, Krebs HA. Effect of adenosine on the adenine nucleotide content and metabolism of hepatocytes. *Biochem J*. 1975;152:593–599. doi:10.1042/bj1520593.
 39. Lerner MH, Rubinstein D. The role of adenine and adenosine as precursors for adenine nucleotide synthesis by fresh and preserved human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1970;224:301–310. doi:10.1016/0005-2787(70)90563-0.
 40. Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(Suppl 1):S73–7. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05289.x.
 41. Xu R, Wang D, Wang C, Zhang G, Wei G. Improved S-adenosylmethionine and glutathione biosynthesis by heterologous expression of an ATP6 gene in *Candida utilis*. *J Basic Microbiol*. 2018;58:875–882. doi:10.1002/jobm.201800151.

42. Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Garnacho M, Latasa MU, Varela-Rey M, Dotor J, Santamaria M, Martínez-Cruz LA, Parada LA, Lu SC, et al. S-adenosylmethionine regulates cytoplasmic HuR via AMP-activated kinase. *Gastroenterology*. 2006;131:223–232. doi:10.1053/j.gastro.2006.04.019.
43. Rodriguez-Aguilera JR, Guerrero-Hernandez C, Perez-Molina R, Cadena-Del-Castillo CE, de Vaca RP, Guerrero-Celis N, Domínguez-López M, Murillo-de-Ozores AR, Arzate-Mejía R, Recillas-Targa F, et al. Epigenetic effects of an adenosine derivative in a Wistar rat model of liver cirrhosis. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):401–413. doi:10.1002/jcb.26192.
44. Aparicio-Bautista DI, Perez-Carreón JI, Gutierrez-Najera N, Reyes-Grajeda JP, Arellanes-Robledo J, Vasquez-Garzon VR, Jiménez-García MN, Villa-Treviño S. Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1834:2528–2538. doi:10.1016/j.bbapap.2013.08.005.
45. Damiani E, Wallace HM. Polyamines and Cancer. *Methods Mol Biol*. 2018;1694:469–488. doi:10.1007/978-1-4939-7398-9_39.
46. Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R inventors. Uso de la adenosina para preparar medicamentos para el tratamiento de enfermedades hepáticas fibrosantes. Patent N° 220780. Mexico City: Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual; 2004.
47. Chagoya-Hazas V, Hernandez Munoz R, Villa-Trevino S inventors. Use of Adenosine Aspartate for the preparation of pharmaceutical products for the treatment of liver cancer. EE.UU. Patent N°. 8,507,459 B2. Washington (DC): U.S. Patent and Trademark Office; 2013.
48. Chagoya de Sanchez V, Hernández-Muñoz R. Método para preparar aspartato de adenosina a partir de la adenosina, composición farmacéutica que las contiene y uso de las mismas en el tratamiento de enfermedades hepáticas fibrosantes. Patent N° 207422. Mexico City: Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual; 2002.
49. Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, Clergue F, Poupon R, Barbu V, Rosmorduc O. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41:307–314. doi:10.1002/hep.20538.
50. Dyer RB, Herzog NK. Isolation of intact nuclei for nuclear extract preparation from a fragile B-lymphocyte cell line. *Biotechniques*. 1995;19:192–195.
51. Chagoya de Sanchez V, Martinez-Perez L, Hernandez-Munoz R, Velasco-Loyden G, McVicker BL, Tuma DJ, Wisecarver JL, Bailey SM. Recovery of the cell cycle inhibition in CCl(4)-induced cirrhosis by the adenosine derivative IFC-305. *Int J Hepatol*. 2012;2012:212530. doi:10.1155/2012/962183.
52. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
53. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74:214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
54. She QB, Nagao I, Hayakawa T, Tsuge H. A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:1748–1754. doi:10.1006/bbrc.1994.2871.