

EL ACCESO RESTRINGIDO AL ALIMENTO AMINORA EL CRECIMIENTO NEOPLÁSICO Y PRESERVA LA ESTRUCTURA CELULAR DEL HÍGADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS-HEPATOCARCINOMA

DAYTIME RESTRICTED FEEDING AMILORATES THE NEOPLASIC GROWING AND PRESERVES THE CELULAR STRUCTURE OF THE LIVER IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CIRROSIS-HEPATOCARCINOMA

Resumen

**Christian Molina Aguilar,
María de Jesús Guerrero Carrillo y
Mauricio Díaz Muñoz.**

**Instituto de Neurobiología, UNAM
Facultad de Ciencia Naturales,
Universidad Autónoma de Querétaro.**

**Autor para correspondencia:
mdiaz@comunidad.unam.mx**

Fecha de recepción: 16/08/ 2012
Fecha de aceptación: 24/01/2013

El cáncer es uno de los principales problemas de salud en las sociedades modernas, se le conceptualiza como un conjunto de padecimientos que conllevan pérdida de diferenciación y del control del ciclo celular. Para su diagnóstico y eventual cura, es indispensable contar con información fehaciente de los mecanismos fisiopatogénicos implicados. En este proyecto exploramos la posible acción protectora de un régimen de alimentación restringida (2 h de acceso al alimento durante 3 semanas) en un modelo experimental de cirrosis-hepatocarcinoma inducido por tratamiento con el hepatotóxico dietilnitrosamina (DEN). Los resultados principales son: El acceso restringido al alimento aminoró la hepatomegalia mostrada por el grupo cirrótico-canceroso. De manera notable evitó el crecimiento tumoral y disminuyó el diámetro de los crecimientos neoplásicos. También mostró mejoría en el análisis histológico ya que la estructura celular y la arquitectura tisular se alteraron de manera muy discreta en comparación con las ratas

cancerosas alimentadas *ad-libitum*. En contraste, el grupo con restricción alimenticia y cáncer mostró valores más alterados en las pruebas de funcionamiento hepático, así como una mayor cantidad de fibras de colágena en el hígado. Una posible interpretación de estos resultados es que la alimentación restringida rompe la secuencia de daño celular del tratamiento con la DEN, evitando el proceso de pérdida de diferenciación de los hepatocitos al exacerbar la respuesta regenerativa asociada a la cirrosis. Al final, el hígado se protege contra el crecimiento neoplásico y conserva un potencial regenerativo intacto. Este modelo es sencillo de aplicar, no costoso y nos permite estudiar con más detalle los mecanismos bioquímicos y celulares en la progresión del daño desde el hígado fibrótico hasta el hepatocarcinoma. Al mismo tiempo, ofrece una alternativa interesante para implementar un futuro tratamiento racional con que aminorar el desarrollo e implantación del hepatocarcinoma.

Palabras Clave: Hepatocarcinoma, cirrosis, restricción alimenticia, funcionamiento hepático

tico, dietilnitrosamina, sincronización circadiana.

Abstract

Cancer is one of the principal health problems in modern societies. It involves loss of cellular differentiation and deficiency in the control of cellular duplication. In order to improve the diagnosis, the therapy and to get an eventual cure is necessary to get strict experimental data regarding not only epidemiological aspect, but also about their physiopathological mechanisms. In the present project, we explored the potential action of restricted feeding (2 h food access every day during 3 weeks) in an experimental model of cirrhosis-hepatocarcinoma induced by 4 months treatment with the hepatotoxin diethylnitrosamine. The main results are: Restricted feeding reduced the hepatomegalia shown by the group with cirrhosis and hepatocarcinoma. Notably, it avoided the tumoral growing and reduced de size of the neoplastic areas. It also improved the liver histology in both, the hepatocyte cellular structure and the tissular architecture. In contrast, rats under restricted feeding with cancer showed more altered values in parameters of liver functioning as well as more collagen deposited in the liver. A putative explanation of these results is that restricted feeding broke the chain of toxic events related with diethylnitrosamine treatment, avoiding the loss of cellular differentiation and improving the regenerative response associated to the cirrhotic state. At the end, the liver is protected against cancer with a well-preserved regenerative potential by the restricted feeding schedule. This experimental protocol is simple to apply, cheap and can be useful to study the biochemical, metabolic and cellular mechanisms involved in the damage progression from fibrosis until the liver cancer state. At the same time, it offers and interesting alternative to visualize a suitable treatment in the future to prevent and treat hepatocarcinoma.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, cirrhosis, liver function, dietilnitrosamina, feed restriction, circadian timing.

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades de etiología múltiple que se caracterizan por una pérdida de diferenciación y crecimiento más allá de los límites normales, generando masas tumorales. El proceso de carcinogénesis tiene 3 fases principales: Iniciación, Promoción y Progresión. La etapa de iniciación es un estado pre-neoplásico caracterizado por ser reversible; por el contrario, el proceso de promoción-progresión es irreversible (Park y col., 2009).

De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, ~7.6 millones de personas murieron de cáncer durante el 2007 a nivel global. Las estadísticas en el 2008 del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) muestran que en nuestro país los tumores malignos se asocian aproximadamente al 13% de las defunciones. La OMS prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de ~7.9 a ~11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; y durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de ~11.3 a ~15.5 millones.

En México, la tasa de defunción asociada a procesos cancerosos tiende a aumentar. De 1998 a 2008, la mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 58 a 67 por cada 100,000 habitantes. Es pertinente para el presente proyecto, señalar que el cáncer de hígado, conocido como Hepatocarcinoma (HCC), se encuentra entre las primeras causas de muerte en personas mayores de 50 años en nuestro país.

Cirrosis - Hepatocarcinoma

Los eventos moleculares responsables del desarrollo y la progresión del HCC aún se desconocen, pero se ha sugerido que hay una relación directa entre estados de inflamación activa y estrés oxidativo asociados con daño genético, que a la larga generan mutaciones en el DNA de hepato-

citocitos o células madre, y que eventualmente pueden conducir a una pérdida de diferenciación y al crecimiento neoplásico. El proceso se inicia mediante la generación de focos de hepatocitos displásicos (focis) sin un fenotipo maligno aparente, pero con la probabilidad de evolucionar a HCC. Los nódulos displásicos aumentan de tamaño, y promueven angiogénesis activa, lo que resulta en un mayor suministro de sangre desde la arteria hepática; posteriormente su grado de diferenciación se pierde, y el tumor desarrolla entonces una capacidad metabólica independiente que es característica de las neoplasias (Rodés, 2007).

Es importante señalar que más del 90% de los casos de HCC en humanos están relacionados con un estado fibrótico-cirrótico previo. La cirrosis es una patología donde las células parenquimatosas del hígado son sustituidas por tejido de tipo cicatricial (principalmente colágena) formado a partir del tejido estromal del propio órgano. Se le considera como una enfermedad en que se pierde la coordinación entre las células del hígado y su matriz extracelular. Produce desestructuración del lobulillo hepático por un estímulo regenerativo continuo y un estado crónico inflamatorio que deriva en daño oxidativo con pérdida de la función del hepatocito. La acumulación exacerbada de colágena produce insuficiencia hepática progresiva, cursando por una serie de grados de afectación clínica que van desde ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, hasta encefalopatía hepática, síndrome hepato-renal y el HCC (Hanna y col., 2008; Sanyal y col., 2011). La etiología de la cirrosis es multifactorial y se produce principalmente por infección viral (Hepatitis B y C), ingesta crónica de alcohol, aflatoxinas e hígado graso recurrente (Sanyal y col., 2011).

Modelo Experimental (*dietilnitrosamina*)

En los últimos años se han desarrollado protocolos experimentales que permiten estudiar eventos moleculares y celulares asociados a la progresión fibrosis-cirrosis-HCC, haciendo reproducible

en condiciones de laboratorio la situación clínica que con frecuencia aflige a cientos de pacientes con HCC en nuestro país. Los protocolos experimentales permiten estudiar los aspectos mecanísticos que se asocian a estas entidades patológicas, meta deseable que eventualmente nos permitirá entender su etiología, y eventualmente proponer terapias que prevengan o alivien el daño hepático. Schiffer y colaboradores describieron en el 2005 un método experimental en roedores de instalación de fibrosis con progresión a un estado cirrótico, y eventualmente culminando en HCC mediante inyecciones i.p. de DEN durante 16 semanas.

El DEN es un fármaco que genera una necrosis hepática significativa asociada con una marcada inflamación y fibrosis. El DEN es metabolizado por enzimas hepáticas de la familia del citocromo P-450 (CYP450) a un intermediario electrofílico que interacciona con el material genético dañándolo, y por consiguiente, promueve mutaciones causando muerte celular y la regeneración alterada del tejido hepático, que posteriormente conduce a la formación del HCC. La actividad de las isoformas de CYP450 que participan en la bioactivación del DEN varían entre especies, entre los diferentes sistemas de estudio y también con las diferentes técnicas utilizadas, pero se han propuesto las siguientes como las más probables en la biotransformación del DEN: CYP2E1, CYP1A1/1A2 y CYP2B1/2B2 (Beltrán-Ramírez y col., 2006).

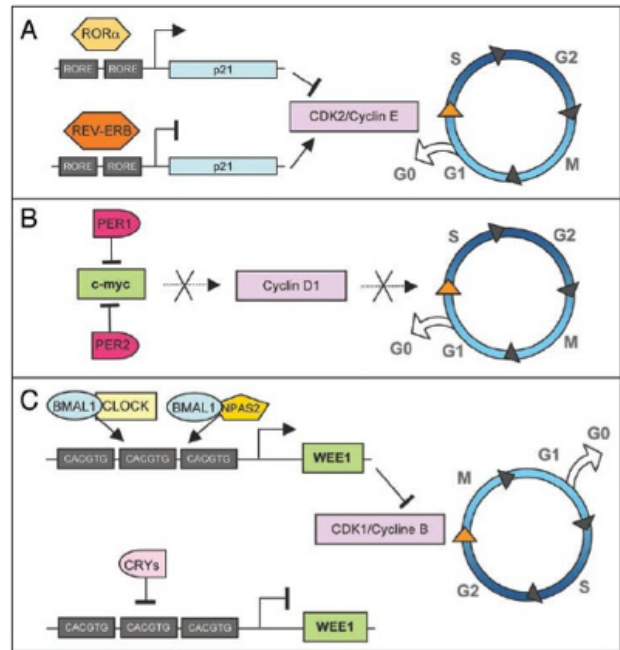
Cáncer y Ritmos Biológicos

En los seres humanos, al igual que en la gran mayoría de organismos, la mayoría de las funciones fisiológicas y conductuales se manifiestan en forma rítmica durante el día y la noche. Esta ritmicidad que se ajusta a periodos aproximados de 24 h, se le denomina circadiana. Algunos ejemplos son: el dormir y el despertar, las variaciones diurnas de temperatura corporal, presión arterial, gasto cardiaco, consumo de oxígeno, equilibrio de los fluidos y secreción de glándulas endocrinas (Reppert y Weaver, 2002).

Reportes recientes sugieren que trastornos del sistema circadiano constituyen un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer y de otras patologías. En estudios realizados con pilotos de líneas aéreas y trabajadores de turno nocturno se encontró que presentan una mayor incidencia de cáncer, de piel, de próstata, de mama y de colon (Rafnsson y col., 2001; Davis y col., 2001; Schernhammer y col., 2001).

El sistema de medición temporal comprende osciladores periféricos y un marcapaso central en el hipotálamo ventral conocido como núcleo supraquiasmático (NSQ) (Sobia y Saqib, 2010). La maquinaria molecular circadiana está conformada por genes reloj: Bmal1, Clock, Per1,2 y Cry1,2 y sus proteínas correspondientes. Su actividad genera 2 asas de retroalimentación (positiva y negativa) con un periodo cercano a las 24 h (Preitner y col., 2002). La inducción de la expresión de los componentes de la familia Per y Cry que forman el asa negativa, son activados por la heterodimerización de los factores de transcripción Bmal y Clock que forman el asa positiva.

La regulación transcripcional de los genes reloj se basa en una región promotora conocida como caja E (Shearman y col., 2000). Además de los genes reloj, muchos otros genes, incluyendo varios que participan en el ciclo celular, presentan cajas Es, sustentando una regulación circadiana también en la proliferación celular y las redes metabólicas. Se ha observado que Clock-Bmal regulan la transcripción de los siguientes genes: *Wee1* (cinasa que controla la transición de las fases G2-M) (Matsuo, 2003), *c-Myc* (proto-oncogen que modula la transición entre G0-G1) y *ciclina D1* (modulador de la transición entre G1-S) (Fu y col., 2002). El inhibidor del ciclo celular *p²¹WAF1/CIP1* es regulado por la proteína reloj RevErv- α/β , miembro de la familia de los receptores nucleares, al expresarse rítmicamente en órganos periféricos regulando la progresión entre las fases G1-S del ciclo celular (Grechez y col., 2008). Una disminución de *c-Myc* por Bmal-Clock genera un mecanismo adicional de disminución en la proliferación celular, aún en ausencia de daño en el ADN (Filipski y col., 2009) (Figura 1).



del reloj molecular (*RORα* y *REV-ERB*, respectivamente) y a su vez permitir que continúe el ciclo o arrestarlo. b) El proto-oncogen *c-myc* es regulado a la baja por proteínas del reloj molecular (*PER*), su reducción arresta el ciclo celular en la transición en la fase G1-M. c) *BMAL1* y *CLOCK* promueven la transcripción de la proteína-quinasa *Wee1*, la cual impide la acción del complejo *CDK1/Ciclina B*, y así permite que el ciclo celular entre a la fase de mitosis. En contraparte, la generación de *WEE1* es inhibida por la proteína *CRY* (Borgs y col., 2009).

En un hígado sano el ciclo celular en hepatocitos tiene una duración de ~24 h y es regulado por la maquinaria del reloj molecular. La duplicación celular también responde a la condición alimenticia, disminuyendo en condiciones de ayuno. En este contexto, protocolos de alimentación restringida son muy efectivos en sincronizar la maquinaria del reloj molecular al horario de acceso al alimento (Matsuo y col., 2003; Luna-Moreno y col., 2009). En un hígado sano de rata, el ayuno de 2 días o la reducción del alimento a un 40-60% durante 5 h por 3 meses, elimina una quinta parte de las células normales mediante apoptosis.

Consecuencias Metabólicas y Fisiológicas del Alimento Restringido

Existe una relación natural entre la actividad metabólica y la disponibilidad de nutrientes por el consumo de alimento. Desde tiempos remotos se ha reconocido que la forma en que se

tiene acceso al alimento determina características fenotípicas y fisiológicas, tanto en la salud como en la enfermedad (bulimia y obesidad, por ejemplo). Sin embargo, en tiempos más recientes se han implementado también protocolos de alimentación como una herramienta experimental que nos ayudan a entender mejor las adaptaciones de los organismos a su medioambiente y los ajustes bioquímicos que subyacen a estos procesos. En este contexto, nuestro grupo ha utilizado el protocolo de alimentación restringida (PAR) (2 h de acceso al alimento a la mitad de la fase luminosa durante 3 semanas) para generar un cambio muy relevante en la actividad bioquímica y fisiológica del organismo que repercute directamente en la relación entre las redes metabólicas y el reloj molecular circadiano. De esta forma el PAR promueve la expresión de un reloj biológico que es independiente del NSQ (el marcapaso circadiano principal). Este oscilador se sincroniza por la disponibilidad del alimento y se le conoce como el oscilador sincronizado por alimento (OSA) (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010). Aunque el PAR y la expresión del OSA afectan a todos los órganos de la economía, nuestro grupo de trabajo se ha interesado en caracterizar las adaptaciones que acontecen en el hígado, siendo éste uno de los principales órganos que responden a la alimentación y el principal tejido que procesa los nutrientes ingeridos. Además, como se mencionó anteriormente, el hígado es un oscilador periférico cuyo reloj molecular se sincroniza de manera exquisita a la disponibilidad de alimento (Aguilar-Roblero y Díaz-Muñoz, 2010).

Las áreas preneoplásicas en hígado presentan tasas altas de replicación de ADN y baja inducción de apoptosis, sin embargo, cuando se restringe el alimento durante 3 meses, esta tendencia se revierte reduciendo las áreas preneoplásicas en tamaño y número hasta en un 85%. Si se regresan las ratas restringidas a alimentación *ad libitum* la proliferación y apoptosis se restablecen, pero hay diferencias claras en el volumen y número de Foci preneoplásicos que persisten hasta los

17 meses (edad adulta de las ratas), siendo mayores en número y tamaño en las ratas que no tuvieron restricción (Grasl-Kraup y col., 1994).

Se ha reportado que la sincronización circadiana aminora la progresión del cáncer: un estudio en ratones con implantación de 3 mm³ de adenocarcinoma pancreático a los que se les restringió la comida a 4 h al día, demostró que las masas tumorales tenían un crecimiento significativamente menor en los ratones con restricción alimenticia en comparación con el grupo que comió *ad libitum* (Xiao-Mey y col., 2010).

Estos resultados se refuerzan con datos publicados del Dr. Lin Yueh-Min en el 2008 donde se demostró que las células cancerosas si expresan la maquinaria del reloj molecular pero a comparación del tejido sano no están sincronizadas, de ahí que su tasa de proliferación pase de 24 h a un periodo menor de 18 h, hecho que se ha asociado al crecimiento tumoral.

En resultados publicados recientemente por nuestro grupo de trabajo se evidenció que la restricción de alimento (2 h de comida al día) durante 3 semanas induce una sincronización de los genes reloj e incrementa la dinámica del recambio celular al incrementar los procesos relacionados con la actividad de ciclo celular y de la apoptosis (Molina-Aguilar y col., 2012).

En experimentos no publicados hemos observado que la actividad de la timidina cinasa del hígado, una enzima marcadora de la fase S del ciclo mitótico, mostró un incremento muy marcado en los animales que expresaron el OSA, con una actividad 4 veces mayor a las 08:00h y 8 veces mayor a las 14:00h. Este aumento de la actividad enzimática es de la magnitud reportada previamente en hígados en regeneración 24 h después de haber sido practicada una hepatectomía parcial del 66%. La presencia del PCNA detectada por inmunohistoquímica y por western blot en muestras de hígado de animales expresando el OSA reafirma lo anterior.

En resumen, los antecedentes reportados y los resultados preliminares hasta ahora obtenidos sugieren que durante el protocolo de alimentación restringida y la concomitante expresión del OSA la comunicación entre la actividad metabólica y el reloj circadiano del hígado favorece un equilibrio entre la duplicación celular y la apoptosis celular que pudiera impedir el desarrollo y el crecimiento tumoral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque existen antecedentes de una posible acción anticancerosa asociados al acceso restringido al alimento, ningún protocolo de los reportados ha abordado la situación que prevalece en el ámbito clínico: un modelo experimental que abarque la progresión de daño hepático desde la fibrosis, la implantación de un estado cirrótico y la culminación en el desarrollo de un HCC. Nuestra propuesta de proyecto incide directamente en este punto en particular: contempla un estudio en donde exploraremos los efectos de la restricción alimenticia en la cirrosis y HCC generados por un tratamiento crónico con DEN.

HIPÓTESIS

El régimen de acceso restringido al alimento generará una sincronización entre las vías metabólicas y el reloj molecular del hígado que repercutirá en una disminución en la tasa de proliferación y un incremento de la apoptosis en las células cancerosas promoviendo así un efecto protector en un modelo experimental de hepatocarcinoma

OBJETIVO

Estudiar el efecto de la sincronización por alimento en la generación de tumores, características histológicas y funcionamiento hepático durante la inducción y desarrollo de la cirrosis y el HCC después de la administración de DEN.

METODOLOGIA

Se usarán ratas macho Wistar (180-220g al inicio de los experimentos) que estarán bajo un ciclo de luz/obscuridad DE 12 h/12 h (el encendido de la luz será a las 08:00 h) y temperatura constante (~21o C). Los tratamientos experimentales a realizarse se harán siguiendo la norma aprobada por “la guía para el cuidado y uso de animales en experimentación” de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Protocolo experimental

Se contará con 4 grupos: a) Ratas con libre acceso al alimento durante las 24 h, *Ad libitum* (AL). b) Ratas con Horario Restringido al Alimentación (HRA), con acceso al alimento de 12:00 a 14:00 h. c) Ratas tratadas con DEN (eventualmente con cirrosis y HCC) y alimentadas *Ad libitum* (HCC-AL). d) Ratas tratadas con DEN y alimentadas bajo un HRA (HCC-HRA).

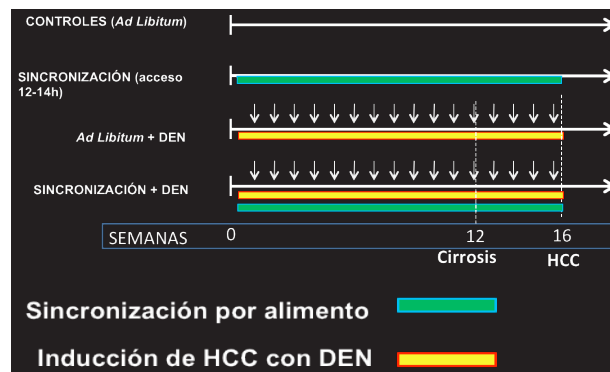


Figura 2. Se representan los 4 grupos de ratas. Las flechas blancas indican las inyecciones semanales, la barra amarilla los grupos tratados con DEN y que desarrollarán cirrosis y HCC y la barra verde los grupos que estarán bajo Horario de Restricción de Alimento (HRA). La cirrosis se detecta después de 12 semanas de administración de DEN, mientras que el HCC se instala a las 16 semanas de tratamiento.

La inducción de HCC en los grupos c y d se realizará según el modelo de Schiffer y col., 2005: Se inyectarán dosis intra-peritoneales de 50 mg/kg de DEN (Sigma-Aldrich, USA) una vez por semana. A las 8 semanas de tratamiento se espera el desarrollo de fibrosis hepática; a las 12 semanas una cirrosis bien establecida, y a las 16 semanas la presencia clara de HCC, con tumores bien definidos. Los 4 grupos serán sacrificados

dos semanas después de terminar las 16 inyecciones para permitir que las ratas metabolizaran el DEN de la última inyección y evitar efectos agudos (**Figura 2**). El día del sacrificio los animales fueron anestesiados, se les decapitó en guillotina para colecta de sangre, y se les retiró el órgano hepático completo. Después de pesarlo y fotografiarlo, se disecó una porción del lóbulo principal para procesamiento histológico convencional. A los cortes de hígado se les practicó la tinción de Tricrómica de Masson, y de Hematoxilina-Eosina. La sangre se centrifugó a 3,500 RPM x 10 min para separar el suero. En esta fracción se realizaron las pruebas de funcionamiento hepático.

Análisis Estadístico

Los datos se expresan como promedios \pm error estándar con una n que oscila entre 5 y 16. La significancia estadística se calculó de 2 formas: 1) para los experimentos que implican un curso temporal se utilizó la ANOVA de 2 vías seguida de la prueba de Bonferroni; 2) para las comparaciones entre grupos se empleó la prueba t de student. El umbral de significancia se estableció con un $p < 0.05$.

RESULTADOS

Peso Corporal

En la **Figura 3** se presenta la variación del peso promedio en los grupos controles (sin DEN) y cancerosos (con DEN). En la Figura también están representados las 3 fases principales del daño asociado al DEN: hasta la semana 4, fibrosis; de la semana 4 a la 12 se implanta el estado cirrótico; de la 12 a la 16 aparece el daño neoplásico asociado al HCC. Se observa que el grupo HCC + AL gana menos peso que su grupo control (AD), pero se vuelve significativo desde la semana 7, a mitad del estadio en que se los animales se vuelven cirróticos. Al final del tratamiento, las ratas cancerosas pesan $\sim 10\%$ menos, valor que tratándose del peso corporal del animal es de gran importancia. Los 2 grupos con restricción alimenticia ganan menos peso y de manera más pausada como era de esperarse por su pro-

toloco de alimentación, sin embargo es interesante notar que los animales cancerosos (HCC + HRA) conservaron un peso estadísticamente similar a su grupo control (HRA), a diferencia de su contraparte con alimento *ad libitum*.

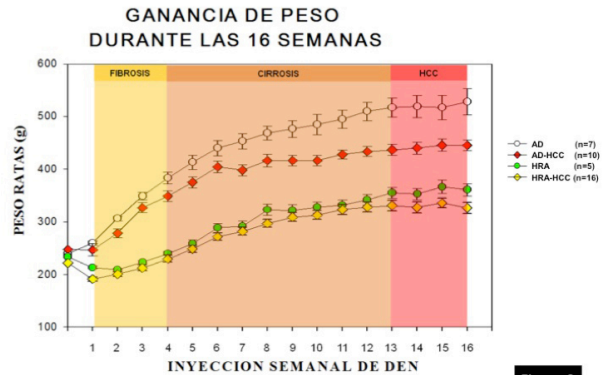


Figura 3

Figura 3. Ganancia de peso corporal a lo largo del tratamiento con el DEN. Las ratas fueron tratadas *ip* con el DEN durante 16 semanas. Los grupos control y experimentales se mencionaron en la METODOLOGÍA. Se ilustra la progresión del daño hepático desde la fibrosis hasta el hepatocarcinoma (HCC). Los resultados se expresan como el $X \pm ES$ de una n que oscila entre 5 y 16 animales.

Peso del Hígado

En la **Figura 4a** se puede apreciar que como resultado del tratamiento del agente hepatotóxico y cancerígeno DEN, el grupo HCC + AL mostró un marcado crecimiento del órgano hepático. En esta Figura es posible observar que en el grupo HCC + HRA se presenta claramente un hígado de menor tamaño. La hepatomegalia cuantificada de manera formal al referir el peso del hígado al peso corporal de cada rata se presenta en la **Figura 5**. Se puede apreciar que este parámetro aumentó de manera evidente y significativa en el grupo HCC + AL ($\sim 77\%$) en comparación al grupo control AL. En contraste, la protección ejercida por la restricción alimenticia se tradujo en una reducción estadísticamente significativa de la hepatomegalia asociada al DEN, al aumentar tan solo $\sim 32\%$ en relación con los grupos controles no cancerosos.

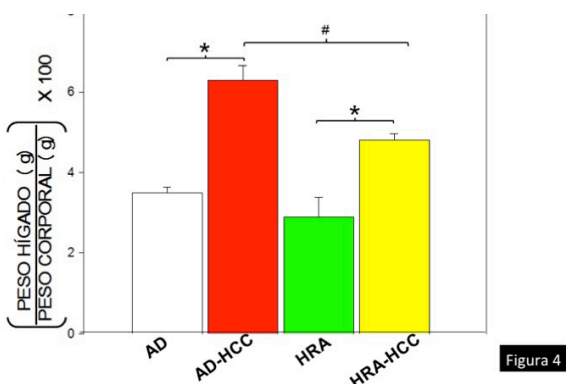


Figura 4

muestra la hepatomegalia que generaron los grupos tratados con DEN. Los resultados se expresan como el $X \pm ES$ de una n que oscila entre 5 y 16 animales. * significativo contra su control; # significativo entre los grupos cancerosos.

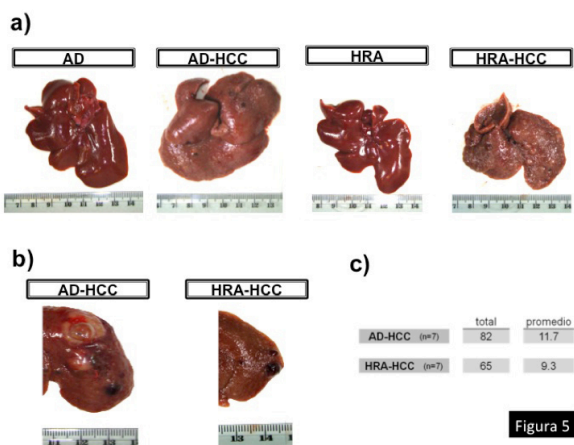


Figura 5

Figura 5. Aspecto macroscópico y conteo de tumores. Imágenes representativas de los hígados de los grupos controles y experimentales. Panel a, dimensiones y aspecto macroscópico de los hígados. Se conserva la escala para apreciar la hepatomegalia. Panel b, acercamiento para ilustrar la diferencia del tipo de tumores que presentaron los grupos tratados con DEN. Panel c) cuantificación del número de tumores. $n = 7$.

Crecimientos Tumoriales

La inspección macroscópica de los animales tratados con DEN mostró un gran número de crecimientos tumorales en la superficie de los lóbulos hepáticos. Ninguno de los grupos control presentó esta anomalía. El análisis detallado del tipo y el número de los tumores arrojó interesantes diferencias entre los grupos HCC + AL y HCC + HRA (**Figura 4b**): 1) Los tumores en el grupo canceroso alimentado *ad libitum* fueron de apariencia blanquizca/amarillenta y tendieron a ser de 0.5 cm o más de diámetro. En cambio los tumores de las ratas cancerosas con alimento

restringido tuvieron una apariencia oscura con tintes marrones y rojizos, y en general fueron más reducidos en diámetro que los tumores del grupo HCC + AL. 2) La cuantificación del número de crecimientos neoplásicos fue ~25% mayor en las ratas HCC + AL en comparación al grupo con alimento restringido (Figura 4c).

Histología

Muestras de tejido hepático de los grupos control y tratados con DEN fueron procesadas con la tinción Tricrómica de Masson y analizadas bajo criterios morfo-patológicos para calificar su grado de alteración. En la **Tabla 1** se muestran los resultados en donde se comparan únicamente los grupos tratados con DEN (AL y HRA), ya que los grupos control no presentaron ninguna modificación. Es notorio que el grupo HCC + AL mostró cambios que indican un daño severo en la estructura celular y en la disposición histológica de los hepatocitos. Este grupo fue calificado con alteraciones “severas” o “muy severas” en parámetros como pleomorfismo celular, necrosis centro-lobulillar, pérdida de integridad, zonas de vacuolización, anisocitosis e hipercromasia. No solo la estructura celular del hígado se vio fuertemente modificada en el grupo HCC + AL, ya que la disociación de los cordones hepáticos también mostraron alteraciones “muy severas”. En evidente contraste, el grupo HCC + HRA presentó en la mayoría de estos parámetros una calificación de daño de “ligero” y “moderado”. De manera interesante, otras particularidades del tejido hepático relacionadas con el estado cirrótico como son la fibrosis y el depósito de colágena, estuvieron más alterados en el grupo HCC + HRA. Parámetros como el grosor de los trabéculas de colágena y el espacio porta conjuntivo mostraron alteración “muy severa”, mientras que en el grupo HCC + AL el daño fue “moderado”. Estos resultados son sugerentes de una respuesta regenerativa más activa en el hígado del grupo tratado con DEN y la alimentación restringida en comparación con los animales cancerosos con alimento *ad libitum*. El conjunto de los datos

histológicos indica que el proceso cirrótico-canceroso asociado al DEN se ve influido de manera muy importante por la restricción alimenticia en 3 aspectos principales: 1) preserva la estructura celular y la arquitectura tisular; 2) evita la pérdida de diferenciación de los hepatocitos; 3) promueve una respuesta regenerativa más vigorosa.

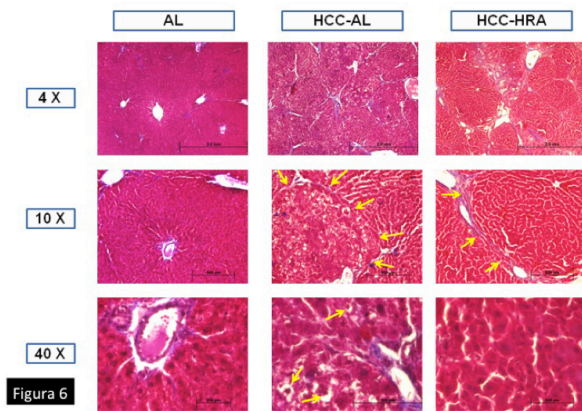


Figura 6. Histología del hígado con tinción de Tricrómica de Masson. Imágenes representativas de cortes histológicos a 3 diferentes aumentos. Se omitió el grupo control HRA ya que no mostró diferencia alguna con el grupo control AL. n = 7.

EVALUACIÓN HISTOLÓGICA			
	HCC-AL	HCC-HRA	
COLAGENA	+++	++++	
TRABECULOS GRUESOS	++	++++	
ESPACIO PORTA CONJUNTIVO	++	++++	
LOBULILLOS (REDUCCION)	++	+++	
DISOCIACIÓN DE CORDONES HEPÁTICOS	++++	++	
ANISOCITOSIS	++++	++	
PLEOMORFISMO CELULAR	+++	++	
HIPERCROMASIA	+++	+	
ZONAS DE VACUOLIZACIÓN	+++	+	
CITOPLASMA GRANULAR	+++	+	
NECROSIS	++++	+	
NECROSIS CENTRO-LOBULILLAR	+++	+	
PERDIDA DE INTEGRIDAD HEPÁTICA	++++	++	

NULO	LIGERO	MODERADO	SEVERO	MUY SEVERO
	+	++	+++	++++

Tabla 1. Evaluación histológica de los hígados con HCC comparados con la condición sana. El daño se evaluó de la siguiente manera: (sin cruz) nulo, (+) ligero, (++) moderado, (+++) severo y (++++) muy severo.

Pruebas de Funcionamiento Hepático

Se realizó una serie de determinaciones en el suero de los animales experimentales para valorar posibles alteraciones del funcionamiento del hígado asociadas a la cirrosis, o a un estado

canceroso (**Tabla 2**). Los grupos controles (AD y HRA) no presentaron cambios significativos, pero sirven de referencia cuando se consideran las alteraciones de los animales cirróticos-cancerosos. En general se observa que en estas pruebas el DEN comprometió la función hepática, pero a la par se observaron cambios específicos según el protocolo de alimentación. Por ejemplo, las ratas de los 2 grupos con HCC presentaron incremento significativo de bilirrubinas (directa e indirecta), sin embargo el grupo HCC + HRA tuvo una hiperbilirrubinemia todavía mayor (3 veces más que el grupo HCC + AL). Este mismo comportamiento se observó con la transaminasa glutámico pirúvica, la fosfatasa alcalina y el tiempo de protrombina. Todas estas pruebas son sugestivas de que el hígado en el grupo HCC + HRA está en mayor estrés metabólico y fisiológico que el grupo HCC + AL. Sin embargo, la restricción alimenticia mejoró un par de parámetros en las ratas con HCC como lo fueron la deshidrogenasa láctica (evitó que aumentara) y la albúmina (promovió su incremento). Los 2 marcadores sanguíneos de procesos cancerosos, la α -fetoproteína y la γ -glutamil transferasa, incrementaron de manera similar en los 2 grupos tratados con DEN, independientemente del protocolo de alimentación.

TABLA 2	AL	AL-HCC	HRA	HRA-HCC
BILIRRUBINA TOTAL	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.02 ☆	0.13 ± 0.01	0.69 ± 0.09 ☆
BILIRRUBINA DIRECTA	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.02 ☆	0.10 ± 0.01	0.52 ± 0.08 ☆
BILIRRUBINA INDIRECTA	0.020 ± 0.004	0.070 ± 0.010 ☆	0.025 ± 0.009	0.180 ± 0.020 ☆
PROTEINAS TOTALES	6.2 ± 0.1	6.6 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.9 ± 0.1 ☆
ALBUMINA	1.40 ± 0.13	1.70 ± 0.22	1.30 ± 0.03	2.00 ± 0.17 ☆
GLOBULINA	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2
REL. A/G	0.30 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.46 ± 0.06 ☆
ALAT	98 ± 9	232 ± 17 ☆	95 ± 4	204 ± 8 ☆
ASAT	268 ± 20	309 ± 30	281 ± 35	404 ± 23 ☆
FOSFATASA ALCALINA	191 ± 14	345 ± 21 ☆	172 ± 13	428 ± 35 ☆
DESHIDROGENASA LACTICA	2105 ± 286	2217 ± 231	2649 ± 410	1786 ± 137 ☆
TIEMPO DE PROTROMBINA	9.6 ± 0.2	9.0 ± 0.1 ☆	9.8 ± 0.2	11.5 ± 0.8 ☆
COLESTEROL TOTAL	57 ± 3	135 ± 10 ☆	66 ± 7	105 ± 6 ☆
GGT	4 ± 0.1	43 ± 5.6 ☆	4 ± 0.1	45 ± 6.4 ☆
α -FETOPROTEINA	0.7 ± 0.3	9.7 ± 1.6 ☆	2.0 ± 0.3	9.1 ± 1.6 ☆

Tabla 2. Pruebas de funcionamiento hepático y marcadores tumorales. Diferencias significativas entre el grupo AL-HCC y AL, y HRA-HCC y HRA; diferencias significativas entre AL-HCC y HRA-HCC.

DISCUSIÓN

Modelo Experimental

Ningún avance significativo en la práctica clínica

nica y en la política de salud pública se puede realizar por decreto y sin tomar en cuenta a la investigación básica. Este hecho tan claro y elemental, con frecuencia se pierde de vista por afanes burocráticos o por la falta de preparación científica de los encargados de tomar decisiones administrativas. La investigación básica proporciona la información de los mecanismos íntimos del funcionamiento biológico en cada uno de sus niveles de complejidad: desde el molecular hasta el ecológico/ambiental. El conocimiento generado por la investigación básica sirve de plataforma para entender de manera racional la etiología de las enfermedades, así como los mecanismos metabólicos, celulares y fisiológicos implicados en la fisiopatología de los padecimientos.

En el caso del estudio y comprensión del cáncer, se hace necesario contar con modelos experimentales que permitan caracterizar en condiciones controladas las alteraciones bioquímicas que se presentan en la práctica hospitalaria, con la finalidad de racionalizar tratamientos y mejorar diagnósticos. Para el HCC se han propuesto varios protocolos con animales de laboratorio, siendo los principales animales transgénicos o con carencia de ciertos genes (Newell y col., 2008). Sin embargo, además de ser costosos, el proceso patológico en estas circunstancias no siempre se acerca a lo establecido en la práctica clínica, muchas veces por compensaciones en la actividad génica de los animales. En este contexto, modelos farmacológicos resultan más prácticos y eficientes: en particular, la administración crónica de DEN induce un daño del hígado que muestra grandes semejanzas a la condición de la enfermedad humana: El DEN genera un daño secuencial en donde se establece en las primeras 4 semanas un aumento en la fibrosis, en los siguientes 2 meses se consolida el estado cirrótico y finalmente después de 16 semanas se culmina el tratamiento con un HCC bien establecido. Esta condición es fiel representativa de lo que se conoce de la expresión del HCC en humanos.

El uso que le hemos dado a este modelo en nuestro laboratorio fue el de explorar el posible efecto protector de un régimen de alimentación restringida en la secuencia de alteraciones que presenta el hígado cirrótico-canceroso tratado con DEN. El racional de este proyecto se basa en el hecho de que la restricción alimenticia es un fuerte sincronizador de los ritmos circadianos, principalmente en los órganos periféricos como el hígado. Nuestra hipótesis de trabajo se sustentó que la pérdida de la fisiología circadiana que caracteriza a los tejidos neoplásicos (Savvidis y Koutsilieris, 2012), se vería contrarrestada por la acción sincronizadora del alimento restringido. Los resultados obtenidos mostraron que la restricción alimenticia influyó de manera importante en el estado celular, histológico y fisiológico del hígado, impactando el desarrollo de la cirrosis y HCC asociados a la administración de DEN.

Efectos de la Restricción Alimenticia en la Cirrosis y Hepatocarcinoma Producidos por DEN

El modelo de HCC por DEN resultó exitoso en nuestro laboratorio: produjo disminución de peso en las ratas tratadas, así como alteraciones histológicas y funcionales del hígado características de un estado cirrótico. De forma clara y contundente también indujo un gran número de tumores y crecimientos indiferenciados propios de un HCC. De manera interesante la restricción alimenticia modificó cada una de estas características: 1) evitó la pérdida de peso corporal, 2) disminuyó el número de tumores generando tumores más pequeños y con morfología diferente, 3) preservó las características estructurales de los hepatocitos y la arquitectura tisular del hígado, 4) incrementó los depósitos de colágena y acentuó alteraciones en varias pruebas de funcionamiento hepático.

El análisis integral de los resultados sugieren que la alimentación restringida afecta de manera diferencial las etapas de daño producido por el DEN: la cirrosis se intensifica, mientras que el desarrollo neoplásico se disminuye. Explorar el mecanismo protector de la alimentación restrin-

gida será objeto de la siguiente etapa del presente proyecto, pero es posible sugerir algunos eventos metabólicos y fisiológicos que pudieran estar implicados: 1) la pérdida de diferenciación en el HCC implica la generación de mutaciones que alteran la señalización y la comunicación celular. Estas modificaciones influyen en la ritmicidad de los hepatocitos, y en su acoplamiento a la maquinaria del reloj molecular (la principal del NSQ y la local en el hígado). Esta situación puede desencadenar desajustes en caminos metabólicos y en respuestas hormonales que originan una pérdida en la sincronización intracelular, y causan disfunción en el acoplamiento tisular. La restricción alimenticia al ser un fuerte estímulo sincronizador de los ritmos circadianos (Schmutz y col., 2012), principalmente en el hígado, pudiera estar amortiguando o aminorando la desincronización celular y el desacoplamiento tisular antes mencionados al mantener el funcionamiento del reloj molecular estable. 2) La restricción alimenticia preservó la estructura celular del hepatocito y la disposición de los cordones celulares, disminuyendo de manera sensible la presencia de los hepatocitos alterados. Una explicación de este resultado podría ser que la alimentación restringida al aminorar las reacciones pro-oxidantes y disminuir la producción de radicales libres (Luna-Moreno y col., 2007), pudiera proteger el estrés oxidativo generado por el DEN. 3) El grupo HCC + HRA presentó una alteración mayor en los marcadores de funcionamiento hepático. Este hecho aislado pudiera interpretarse como sí el daño fuera más severo en estas ratas en comparación con las alimentadas ad-libitum. Sin embargo, estos datos deben integrarse con los otros hallazgos del proyecto, en donde claramente se evidencia que el hígado está mejor preservado macroscópicamente (hepatomegalia) y microscópicamente (tricromica de Masson). Además el hecho de que hay menos y más pequeños tumores es contundente de una acción protectora de la alimentación restringida. Por lo tanto, nuestra interpretación tentativa en esta primera parte del proyecto es que el grupo HCC + HRA tiene una respuesta de defensa acti-

va ante el daño causado por el DEN, en donde se exagera algunas características de la cirrosis (tal vez por sobre activación de las células estelares), pero se amortigua la pérdida de diferenciación celular y se conserva el control del ciclo celular que evita parcialmente el crecimiento neoplásico.

Perspectivas

Ya que este proyecto es la primera fase de un proyecto que continuará otro par de años, proponemos algunos experimentos que complementen los resultados hasta ahora obtenidos: 1) Constatar que el metabolismo del DEN no se ve afectado por la restricción alimenticia por medio del estudio de los citocromos P-450 que intervienen en su metabolismo, y de la cuantificación de aductos de DNA formados durante la mutagénesis. 2) Caracterizar las variaciones circadianas de proteínas reloj en los hígados de los animales experimentales, para constatar la pérdida de ritmicidad en el grupo HCC + AL, y la conservación de la ritmicidad en el grupo HCC + HRA por la sincronización del acceso al alimento. 3) Después de estudiar el modelo actual de prevención del daño cirrótico-canceroso causado por el DEN, ensayar un modelo de prevención en el que se trataría primero a los animales con el DEN, y ya instalado el HCC, ensayar la alimentación restringida buscando un posible beneficio o recuperación más efectiva. Este protocolo sería más realista y apegado a las condiciones que se presentan en el ambiente clínico.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz, M. (2010). Chronostatic adaptations in the liver to restricted feeding: The FEO as an emergent oscillator. *Sleep and Biological Rhythms*. 8: 9-17.
- Borgs L, Beukelaers P, Vandenbosch R, Belachew S, Nguyen L, Malgrange B. (2009). Cell "circadian" cycle. *Cell Cycle*, 8: 832-837.
- Davis S, Mirick DK, Stevens RG. (2001). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1557-1562.
- García BL, Gálvez GJ, Armendáriz BJ. (2007). Blancos terapéuticos potenciales para revertir la cirrosis hepática. *Revista Médica Chilena*, 135: 783-791.

- Grasl-Kraup B, Bursch W, Ruttkay-Nedecky B, Wagner A, Lauer B, Schulte-Hermann R. (1994). Food restriction eliminates preneoplastics cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91: 9995-9999.
- Hanna FR, Aguirre DA, Kased N, Emery SC, Peterson MR, Sirlin CB. (2008). Cirrhosis-associated hepatocellular nodules: Correlation of hepatologic and MR Imaging features. *Radio Graphics*, 28: 747-769.
- Luna-Moreno D, Aguilar-Roblero R, Díaz-Muñoz M. (2009). Restricted feeding entrains rhythms of inflammation-related factors without promoting an acute-phase response. *Chronobiology International*, 26: 1409-1429.
- Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302: 255-259.
- Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. (2002). The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111: 41-50.
- Filipowski E, Subramanian P, Carrière J, Cuetierr C, Barbason H, Lévi F. (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutation Research*, 680: 95-105.
- Heidelbaugh JJ, Bruderly M. (2006). Cirrhosis and Chronic Liver Failure: Part I and Part II. *American Family Physician*, 74: 756-776.
- Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J, Díaz-Muñoz M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fractions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 632-643.
- Mahmound AM, Saleh AB, Salim SA, Othman AA, Tawfeq AA, Ammar CA, Ayman A A. (2010). Ginger ingredients inhibit the development of diethylnitrosamine induced premalignant phenotype in rat chemical hepatocarcinogenesis model. *Biofactors*, 36: 483-490.
- Molina-Aguilar C, Pérez-Sánchez J, Vázquez-Martínez O, Rivera-Zavala J, Díaz-Muñoz M. (2012). Restricted food access during the daytime modifies the 24-h rhythmicity of apoptosis and cellular duplication in rat liver. *Biological Rhythms Research*, 43: 25-37.
- Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Kioke K, Llovet JM. (2008). Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 48: 858-879.
- Park D, Shin JW, Park SK, Seo JN, Li L, Jang JJ, Lee MJ. (2009). Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-Phase regulatory proteins in rat. *Toxicol. Lett.*, 191: 321-326.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB- α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-260.
- Reppert SM, Weaver DR. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418: 935-941.
- Rafnsson V, Tulinius H, Jónasson JG, Hrafnkelsson J. (2001). Risk of breast cancer in female flight attendants: a population-based study (Iceland). *Cancer Causes Control*, 12: 95-101.
- Rodés J, Benhamou JP, Blei AT, Reichen J, Rizzetto M. (2007). *Textbook of Hepatology*. Third edition, Blackwell Publishing Ltd. Pag. 1440.
- Sanyal JA, Kew YS, Riccardo L. (2010). The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *The Oncologist*, 15: 14-22.
- Savvidis C, Koutsilieris M. (2012). Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Molecular Biology*, Jul 17. doi: 10.2119/molmed.2012.00077.
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Colditz GA. (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1563-1568.
- Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, Clergue F, Poupon R, Barbu V, Rosmorduc O. (2005). Gefitinib, an EGFR Inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*, 41: 307-314.
- Schmutz I, Albrecht U, Ripperger JA. (2012). The role of clock genes and rhythmicity in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349: 38-44.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Chi LC, Van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. (2000). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288: 1013-1019.
- Sobia R, Saqib M. (2010). Circadian rhythm and its role in malignancy. *Journal of Circadian Rhythms*, 8: 1-13.
- Yueh-Min L, Julia HC, Kun-Tu Y, Ming-Yu Y, Ta-Chih L, Sheng-Fung L, Wei-Wen S, Jan-Gowth C. (2008). Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 47: 925-933.
- Xiao-Mei L, Delaunay F, Dulong S, Claustrat B, Zampera B, Fujii Y, Teboul M, Jacques Beau J, Lévi F. (2010). Cancer inhibition through circadian reprogramming of tumor transcriptome with meal timing. *Cancer Research*, 70: 3351-3360.