

BAÚL DE LA CIENCIA

Investigación básica sobre hepatocarcinoma en la Universidad de León

José L. Mauriz Gutiérrez, Sara Carbajo Pescador, Javier Martín Renedo

Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Universidad de León.

La investigación biomédica básica es fundamental para el conocimiento de la fisiopatología y el tratamiento de enfermedades, tanto humanas como animales. Desde el Instituto Universitario de Biomedicina de la Universidad de León se viene trabajando desde hace algún tiempo, intentando aunar los esfuerzos de los científicos básicos y de los clínicos, para que trabajen conjuntamente en diversas áreas de interés biomédico.

Nuestro grupo tiene carácter multidisciplinar (actualmente está formado por biólogos, biotecnólogos, médicos, farmacéuticos y veterinarios) y trabaja desde hace años en temas relacionados con la fisiología y la fisiopatología hepática y digestiva. Un área de interés para nuestro grupo es el estudio de nuevas estrategias quimioterapéuticas en el tratamiento del hepatocarcinoma humano, el principal tipo de tumor hepático y cuyo pronóstico no suele ser favorable en la mayoría de los casos. Nuestros estudios se basan tanto en modelos animales como en modelos celulares, así como en el uso de biopsias provenientes de pacientes. En el presente artículo de divulgación enfocamos el interés de la investigación en este tipo de tumor y mostramos, a modo de ejemplo, algunos de los resultados que hemos alcanzado recientemente, utilizando la hormona melatonina en un modelo *in vitro* de hepatocarcinoma. No obstante, muchas son las líneas abiertas en nuestro horizonte y nos planteamos en un futuro próximo testar otras moléculas con potencial interés en el tratamiento de tumores hepáticos, con el objeto de analizar y comprender sus efectos sobre diversas vías de señalización intracelular implicadas en el cáncer y la apoptosis.

Palabras clave:

Cáncer, hepatocarcinoma, investigación básica, investigación traslacional.

Investigación biomédica básica en enfermedades hepáticas y gastrointestinales en la ULE

A pesar de encontrarnos en una ciudad relativamente pequeña como es León, existe un gran número de investigadores en la Universidad de León (ULE) interesados por múltiples campos relacionados con las ciencias biomédicas, experimentales o la tecnología.

Muchas veces pensamos en el científico como persona aislada; nada más

lejos de la realidad, y más aún en pleno siglo XXI. Nuestro grupo de investigación está incluido en el Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León <http://institutobiomedicina.unileon.es/> (**Fig. 1**). Dicho Instituto nació con el objeto de nuclear los esfuerzos que diferentes grupos llevaban realizando en diversas áreas de la investigación biomédica. Podéis encontrar más información sobre IBIOMED tanto en Wikipedia http://es.wikipedia.org/wiki/Instituto_de_Biomedicina, como en



Facebook <http://www.facebook.com/pages/Instituto-de-Biomedicina-IBIOMED/109035229165089> o en Twitter <http://twitter.com/IBIOMED1/statuses/131773120783728640>

Figura 1. Sede del IBIOMED de la Universidad de León.

En concreto, nuestro grupo se centra en la investigación en enfermedades hepáticas y gastrointestinales, estando formado en la actualidad por biólogos, biotecnólogos, médicos, farmacéuticos, veterinarios, etc. Dentro de dicho grupo existen actualmente diferentes líneas abiertas complementariamente: hepatitis, enfermedades intestinales, estrés oxidativo, enfermedades víricas y tumores hepáticos. Nuestro grupo forma parte del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas del Instituto de Salud Carlos III (CIBERehd) y está reconocido como grupo de Excelencia por la Junta de Castilla y León. Nuestra Universidad, además, forma parte del Cluster de Oncología de Castilla y León (Biotecyl), agrupación de científicos y empresas interesadas en la investigación y en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en diversos tipos de tumores. Igualmente, tenemos relaciones con grupos de diversos grupos internacionales repartidos por Francia, Italia, Suecia, Alemania o Estados Unidos, lo que nos permite trabajar desde León con la puerta abierta al mundo.

¿Cómo podemos contribuir los científicos básicos al tratamiento de enfermedades? La ciencia biomédica crece a base del esfuerzo realizado por investigadores básicos y clínicos. Cada jornada de trabajo en el laboratorio debe contribuir, en mayor o menor medida, a acrecentar de forma directa o indirecta el conocimiento sobre la fisiopatología y/o el tratamiento de la enfermedad. Debemos mantener una continua relación con los clínicos, esto nos permite a nosotros conocer cuáles son los principales retos actuales de la medicina y a

ellos acceder “de primera mano” a los conocimientos que el trabajo en el laboratorio nos va rindiendo. En los últimos años se ha acuñado el término investigación traslacional, que es aquella que busca llevar los conocimientos desde la meseta del laboratorio a la consulta del médico. Está claro que TODOS los que nos dedicamos a la investigación, ya sea básica, traslacional o clínica, tenemos como meta la mejoría en la prevención, el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano (**Fig. 2**).



Figura 2. Interrelación entre ciencia básica, traslacional y clínica.

Muchos son los problemas que afectan en la actualidad a los científicos, no sólo en León sino también en toda Europa y en el mundo. Por un lado, la formación de nuevos científicos es un proceso muy largo y costoso; cualquier estudiante que quiera iniciarse en la investigación debe estar capacitado intelectual y físicamente para ser capaz de aprender durante años a investigar: tras la Licenciatura/Grado vendrá el Máster, a continuación el Doctorado y si todo va bien un periodo post-doctoral en el extranjero. Durante los años de Máster, Doctorado y Post-Doc son muchas las jornadas en el laboratorio y grandes los gastos económicos que ello supone para un grupo de investigación. La financiación de los grupos de investigación proviene de la concesión de proyectos de investigación por parte del gobierno (tanto autonómico como nacional y europeo) y de empresas o fundaciones. La financiación directa para el joven investigador corre a cargo de diversas becas financiadas también por entidades oficiales y/o privadas, mediante sistemas competitivos que dan acceso solo a un pequeño porcentaje de los mejores candidatos. Tanto en el caso de los grupos de investigación como en el de los jóvenes investigadores, la financiación se está viendo recortada de forma importante en los últimos años, y la situación parece que puede prolongarse aún bastante tiempo.

Hepatocarcinoma: el tumor hepático más frecuente

La población general está convencida de que el cáncer es una sola

enfermedad, cuando debemos considerarlo sin embargo como un conjunto de más de 120 enfermedades diferentes (algunos autores hablan de cerca de 200 enfermedades). Si bien la probabilidad de padecer cáncer se incrementa exponencialmente con la edad, este tipo de enfermedades puede afectar a individuos de cualquier edad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, o WHO en inglés) el cáncer será responsable de la muerte de 9 millones de personas en 2015 y de 11,4 millones en 2030. El cáncer constituye la segunda causa de muerte en Europa en el conjunto de la población, y es la primera entre los individuos de 45 a 60 años de edad. En el caso de España produce unos 92000 fallecimientos al año, siendo la primera causa de muerte en los individuos entre 40 y 79 años de edad, y la segunda en los mayores de 80 años (Centro Nacional de Epidemiología de España). Por todo ello, el estudio de la etiología, evaluación y/o tratamiento del cáncer supone un gran reto para un buen número de científicos tanto a nivel nacional como internacional.

En IBIOMED existe una línea de investigación en tumores hepáticos del cual forman parte los autores del presente artículo. En los últimos años se ha centrado en el conocimiento de las bases moleculares del hepatocarcinoma, el tumor hepático más frecuente, y en la búsqueda de nuevas dianas y estrategias quimioterapéuticas.

El hígado es el órgano interno más grande del organismo humano, llegando a pesar en un hombre adulto entre 1,3 y 1,5 kg, localizado inmediatamente por debajo del diafragma en la cavidad abdominal. Es un órgano lobulado, rodeado de una fina capa de tejido conectivo denominado Cápsula de Glisson compuesta de fibras colágenas. Aproximadamente el 70% de la población celular total del hígado está constituida por los hepatocitos que forman el parénquima hepático, siendo el otro 30% constituido por las denominadas células sinusoidales (de los capilares hepáticos) entre las que cabe destacar células endoteliales de los capilares hepáticos, las células de Kupffer (macrófagos, representan hasta un 20%), las células de Ito (lipocitos con capacidad para almacenar lípidos y vitaminas liposolubles) y células de Pit (de aspecto granular, son las natural killer hepáticas). El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (HCC) es el tumor que aparece por la proliferación de hepatocitos malignos.

El HCC es, por incidencia, la quinta neoplasia más frecuente en el mundo, y la tercera causa más común de fallecimiento relacionado con el cáncer, produciéndose la muerte de entre 600.000 y 1.000.000 de personas cada año en el mundo. La incidencia mundial del hepatocarcinoma celular es de 5,5-14,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, diagnosticándose cada año más de 500.000 nuevos casos, siendo su aparición más frecuente en hombres que en mujeres, con una tasa de incidencia de aproximadamente 3:1 (Kew, 2002;

Ferlay et al., 2010). Los datos para España sitúan a esta enfermedad en el quinto lugar por número de muertes relacionadas con el cáncer, existiendo una proporción entre hombres y mujeres, parecida a la mundial, de 2,6:1 (López-Abente et al., 2005).

Los agentes causales más comunes del HCC son el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y la aflatoxina B₁, siendo juntos, responsables de aproximadamente el 80% de los casos de HCC. La causa más común de HCC en países desarrollados es la cirrosis ligada a la infección por virus de la hepatitis C (HCV), mientras que en países en vías de desarrollo está relacionado con la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV) (Bruix et al., 1989; Bosch et al., 1999; Tan, 2011). Además de estas causas se pueden citar otras, como el alcohol o la hemocromatosis, capaces de producir cirrosis, llegando a desencadenar cáncer hepático.

El contexto en el que la neoplasia aparece es en una hepatitis crónica o una cirrosis, situación en la que son destruidos muchos hepatocitos sanos, existiendo una invasión del hígado por células inflamatorias, depositándose tejido conectivo, lo que puede producir alteración de la matriz extracelular y del microambiente hepático. El proceso desencadenante del HCC transcurre durante un periodo largo (aproximadamente de 10-25 años) y como ya hemos indicado puede ser inducido por la infección crónica por HBV o HCV. Parte de los pacientes infectados por dichos virus pueden desarrollar una cirrosis que puede desencadenar el HCC, partiendo éste particularmente desde hepatocitos displásicos (Bruix et al., 1989; Bosch et al., 1999; Tan, 2011).

Los fármacos utilizados en el tratamiento del HCC son citotóxicos y no específicos para el tratamiento de esta enfermedad, presentando un gran número de efectos secundarios. Desafortunadamente, no más del 30% de los pacientes son candidatos para las estrategias terapéuticas actuales, y la mayoría de ellos se enfrentan a un mal pronóstico. A pesar de los esfuerzos en investigación realizados en esta materia, todavía existen controversias en cuanto las aproximaciones terapéuticas más adecuadas para el tratamiento del HCC. Por todo ello, dicha área de investigación tiene un gran interés, que radica tanto en el conocimiento de las vías de señalización implicadas en el desarrollo del HCC, como la utilización de diversas sustancias (tanto endógenas como sintéticas) en el potencial tratamiento de la enfermedad.

Modelos de estudio del hepatocarcinoma en el laboratorio

En la actualidad, los científicos básicos interesados en el HCC humano contamos con varias vías de estudio de la enfermedad: obtención de muestras de pacientes, estudios *in vitro* con hepatocitos tumorales humanos y estudio *in vivo* en modelos animales.

La primera vía consiste en el trabajo con muestras provenientes de pacientes afectados de la enfermedad, existiendo dos alternativas: biopsias recogidas mediante punción/aspiración en el enfermo (técnica invasiva utilizada conjuntamente con técnicas de imagen) y muestras provenientes de hepatectomía (extirpación) parcial o total de pacientes que van a ser posteriormente sometidos a trasplante hepático. A pesar de lo que podría parecer en un primer momento, estas dos alternativas no resultan las más interesantes; en el caso de la biopsia la cantidad de tejido es muy pequeña, mientras que el caso de muestras derivadas de hepatectomías supone estar en contacto con servicios de cirugía que realicen esta técnica quirúrgica frecuentemente (algo difícil en León puesto que el hospital de elección para esta cirugía en nuestra comunidad se encuentra en Salamanca). Además, en ambos casos existe gran dificultad técnica para el estudio de vías moleculares clave en la progresión pero sobretodo en el tratamiento del HCC, puesto que las condiciones en las que obtenemos las muestras nos limitan mucho.

Otra posibilidad es el uso de estudios *in vitro* con tumorales humanos. Se trata de líneas celulares previamente establecidas y que podemos cultivar en el laboratorio pudiendo controlar gran número de aspectos (cantidad de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento, etc.) (**Fig. 3**). En nuestro caso existen tres líneas celulares que nos interesan mucho, se trata de HepG2 (p53 wt), HuH7 (p53 mutado) y Hep3B (p53 nulas) (**Fig. 3**); aunque existen otras múltiples líneas como SK-Hep1, SNU-398 etc. Estas células pueden adquirirse en diferentes bancos celulares como ATCC (American Type Culture Collection), ECACC (European Collection of Cell Cultures), ECCO (European Culture Collections' Organisation), JSCC (Japan Society for Culture Collections), o a partir de otros investigadores. El uso de modelos *in vitro* tiene diversas ventajas pues permite la profundización en mecanismos moleculares: se trata de células de un solo origen (con lo que se favorece la homogeneidad y reproducibilidad) y

la represión de la expresión génica es más sencilla.

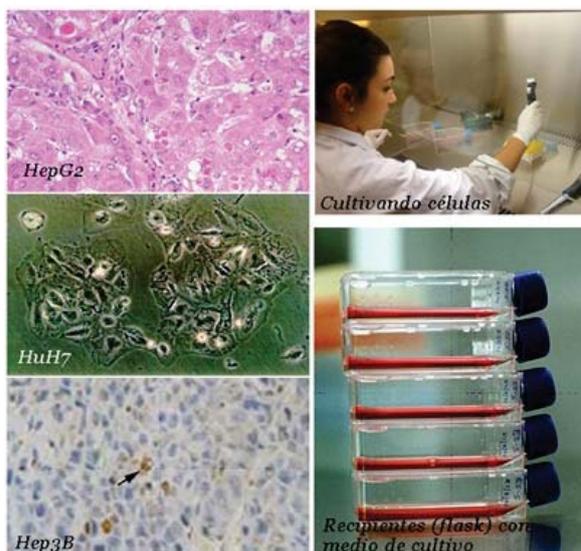


Figura 3. Cultivo de células hepáticas. Algunas de las líneas celulares mencionadas en el texto.

La tercera vía de estudio consiste en la inducción del HCC en modelos animales. Lógicamente para ello debemos contar con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad y con la acreditación para trabajar con animales de experimentación que expide la Junta de Castilla y León. Como investigadores interesados en las Ciencias de la Vida, el uso de animales de experimentación debe estar restringido al mínimo, tratando de provocar el menor sufrimiento posible a los animales. Los animales son una buena alternativa para reproducir enfermedades, conocer su evolución y abordar nuevas terapias. Los animales utilizados deben tener la mayor homogeneidad posible desde diversos puntos de vista: somática (sexo, peso, edad, etc.), genética (igualdad o similitud biológica) y sanitaria (deben ser axénicos -sin gérmenes-, gnotoxénicos -controlados- y sanos). En la Universidad de León tenemos la suerte de contar con un moderno y cuidado Servicio de Animalario, que se encarga de la compra, control y mantenimiento de los animales solicitados por los investigadores. La principal ventaja del uso de animales es que nos permite conocer los mecanismos en un organismo completo, estudiar las interacciones y los efectos secundarios; además podemos trabajar con modelos knockout modificados genéticamente. En el estudio del HCC solemos utilizar ratas y ratones a los que se les induce la enfermedad, bien mediante la administración de sustancias químicas (**Fig. 4**), o bien mediante trasplante ortotópico de células tumorales o su inyección directa en el propio hígado o en el torrente sanguíneo hepático (**Fig. 5**) (Khare et al., 2011). En ambos casos contamos con dificultades: el método químico es muy largo y para el desarrollo del HCC hacen falta unas 16 semanas de evolución. En el caso de trasplante o inyección de células contamos con la dificultad que supone que el sistema inmune de estos animales es muy eficiente eliminando las células tumorales, por lo que en muchas ocasiones es necesario utilizar animales atímicos con el sistema inmune debilitado.

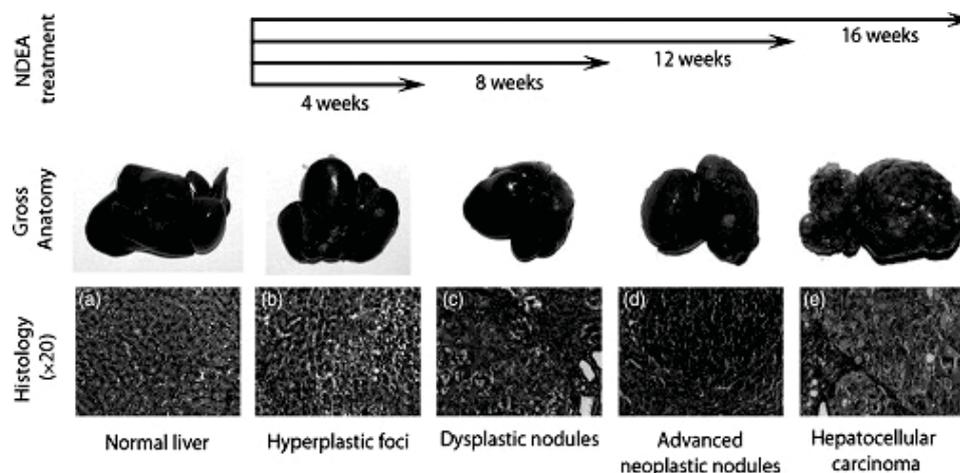


Figura 4. Desarrollo del HCC tras administración de sustancias químicas en modelos animales.

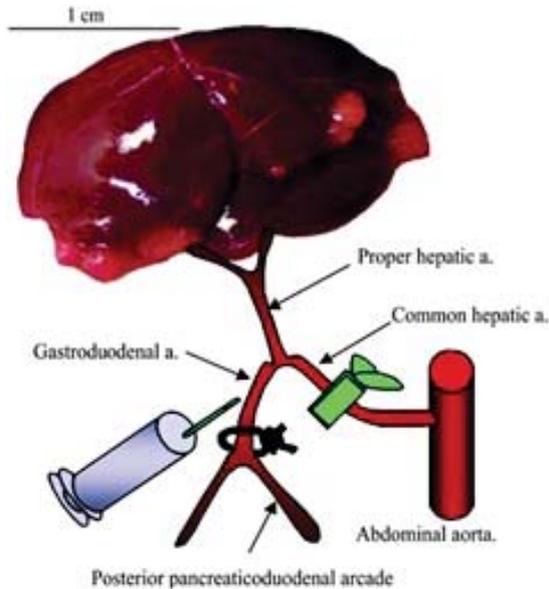


Figura 5. Inyección de células tumores para inducción de HCC.

Características básicas de los tumores: la búsqueda de nuevas dianas quimioterapéuticas

Como ocurre en el resto de tipos de cáncer, el HCC tiene una serie de características interesantes (**Fig. 6**) y cuyo estudio puede tener interés en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas (puntos diferenciadores o débiles donde podemos atacar al tumor) (Hanahan y Weinberg, 2011).

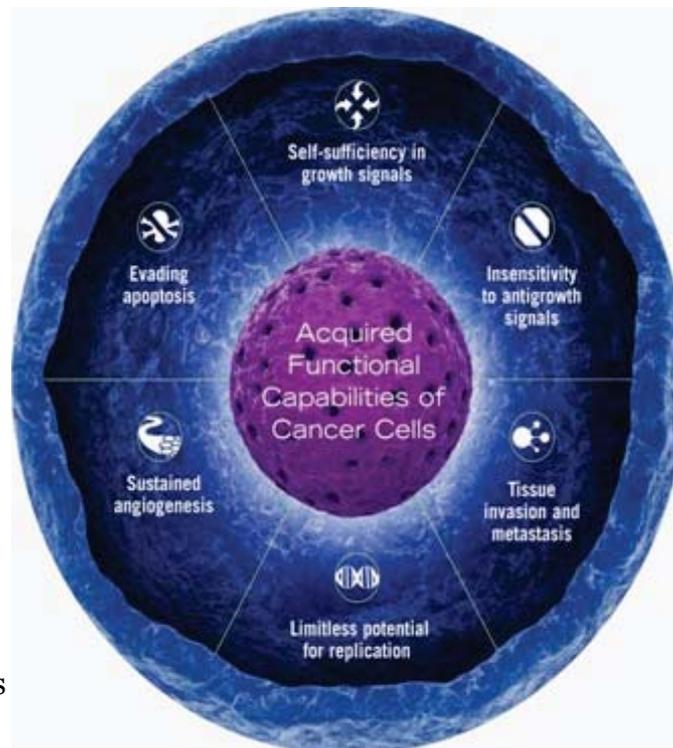


Figura 6. Características de las células tumorales

En primer lugar, los hepatocitos tumorales tienen capacidad para producir señales proliferativas. Además, son relativamente insensibles a las

señales anti-proliferativas. Esto hace que puedan dividirse aparentemente sin límites incrementando su número, lo que da lugar a la aparición de tumores. Estas características están muy relacionadas con la desregulación del ciclo celular.

También, los hepatocitos tumorales son capaces de evadir la muerte celular programada por apoptosis; de forma que se vuelven prácticamente inmortales.

Finalmente, son capaces de producir sustancias pro-angiogénicas (fundamentalmente VEGF –factor de crecimiento del endotelio vascular- o HGF, factor de crecimiento de hepatocitos-). La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, lo que va a favorecer una mejor perfusión sanguínea (mayor llegada de O₂ y nutrientes a las propias células tumorales) y una vía de escape (los hepatocitos tumorales tienen facilidad para separarse de otros, entrar a los vasos sanguíneos y migrar hacia otros tejidos, produciendo las denominadas metástasis).

La melatonina como sustancia antitumoral en el HCC

A lo largo de los últimos 10 años nuestro grupo ha venido trabajando en diferentes modelos de HCC: hemos testado el efecto de alguna sustancia antiangiogénica como el TNP-470 en modelos animales (Mauriz et al., 2003, 2007a, 2007b) o en estudios más moleculares analizando la cooperación entre diversos factores de transcripción (proteínas que entran al núcleo y favorecen la expresión de genes proliferativos) (Toualbi et al., 2007, 2008). Paralelamente, y durante los últimos años, hemos analizado in vitro la capacidad anti-proliferativa y pro-apoptótica de la melatonina en hepatocitos tumorales cuando es administrada a dosis farmacológicas (muy por encima de los niveles fisiológicos normales) (Martín-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011). La melatonina es una sustancia que se ha encontrado en una gran variedad de seres vivos, desde bacterias y protozoos, hasta plantas, hongos e invertebrados (Tan et al., 2010). En cuanto a los vertebrados y en concreto a los mamíferos, la melatonina es una hormona sintetizada principalmente por la glándula pineal, aunque existen otras fuentes secundarias de melatonina como son la retina y la médula ósea. La melatonina, fisiológicamente, se ha relacionado con la regulación de los ritmos biológicos y como antioxidante natural. Se ha demostrado que la melatonina tiene actividad oncostática tanto in vivo como in vitro en principalmente en cáncer de mama (Grant et al., 2009). Los datos sobre el efecto de la melatonina en el HCC no habían sido todavía testados, por lo que nos propusimos analizar su efecto sobre los hepatocitos tumorales. Nuestra curiosidad se acrecentó todavía más cuando estudios previos que nosotros mismos habíamos realizado, comparando ratas ancianas y

ratas jóvenes (en ambos casos sanas), nos habían demostrado los beneficios sobre la fisiología hepática de la melatonina (Molpeceres et al., 2007; Mauriz et al., 2007c).

Para analizar los efectos de la melatonina en el HCC hemos venimos trabajando con la línea de hepatocitos tumorales denominada HepG2, que ha rendido interesantes resultados (Martín-Renedo et al., 2008; Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011). Básicamente, cultivamos dichos hepatocitos tumorales hasta llegar a una fase de proliferación, momento en el que administramos la melatonina disuelta en medio de cultivo (como en otros casos, los medios de cultivo son reemplazados cada 48 horas). Inicialmente hicimos un screening utilizando diversas concentraciones farmacológicas de melatonina y administradas a distintos tiempos para determinar si la hormona era capaz o no de producir la muerte de los hepatocitos tumorales; para ello utilizamos dos ensayos muy simples como son la captación de MTT (un sustrato que es transformado dando color azul solo en las células vivas) y la liberación de LDH al medio de cultivo (la LDH o lactato deshidrogenasa es una enzima citosólica liberada al medio de cultivo cuando las células mueren) (Fig. 7) (Martín-Renedo et al., 2008). Gracias a estos dos sencillos ensayos pudimos determinar cuál era la concentración mínima de melatonina que era capaz de producir la muerte de los hepatocitos tumorales.

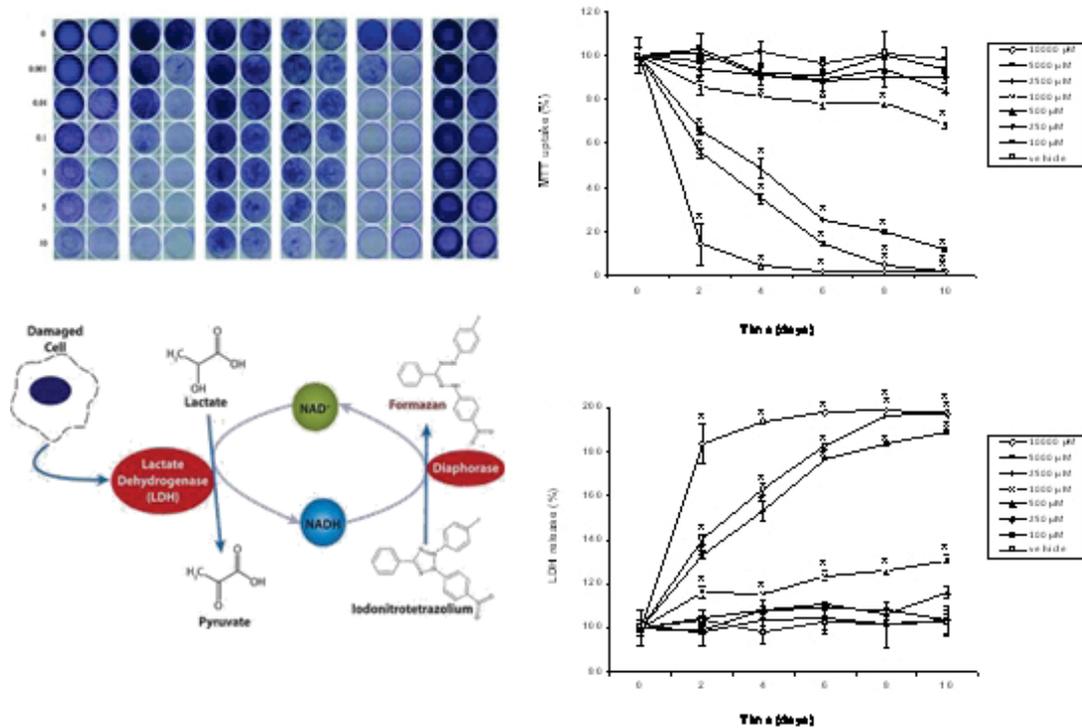


Figura 7. Captación de MTT y liberación de LDH en HepG2 tratadas a diversas dosis de melatonina.

Una de las finalidades del tratamiento antitumoral consiste en la parada del ciclo celular, que como hemos indicado anteriormente está desregulado durante el HCC, favoreciendo su progresión (**Fig. 8**).

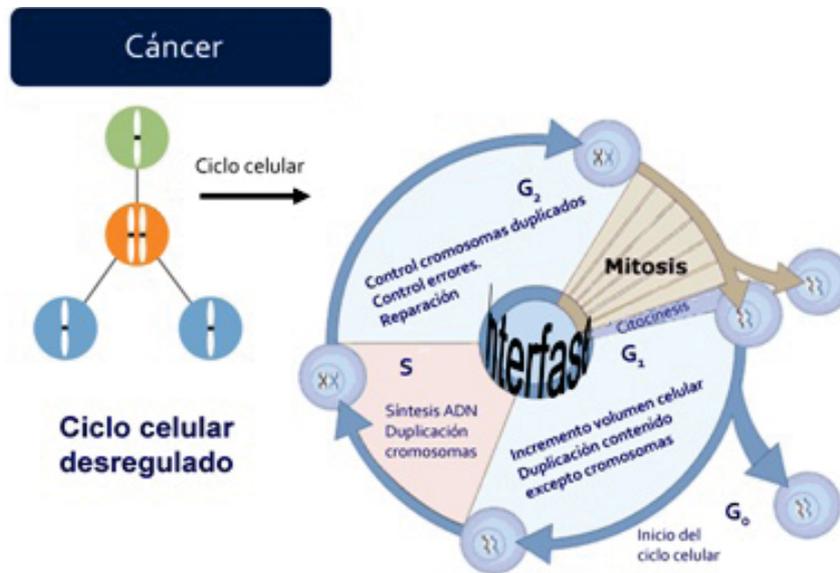


Figura 8. El ciclo celular está desregulado en los procesos tumorales.

Lógicamente, uno de los objetivos de la terapia antitumoral es frenar el ciclo celular en las células tumorales. En nuestros experimentos, pudimos comprobar que la hormona tenía capacidad citostática, era capaz de parar el ciclo celular de los hepatocitos tumorales en la transición de las fases G₂/M cuando el ciclo era analizado mediante citometría de flujo (**Fig. 9**) (Martín-Renedo et al., 2008).

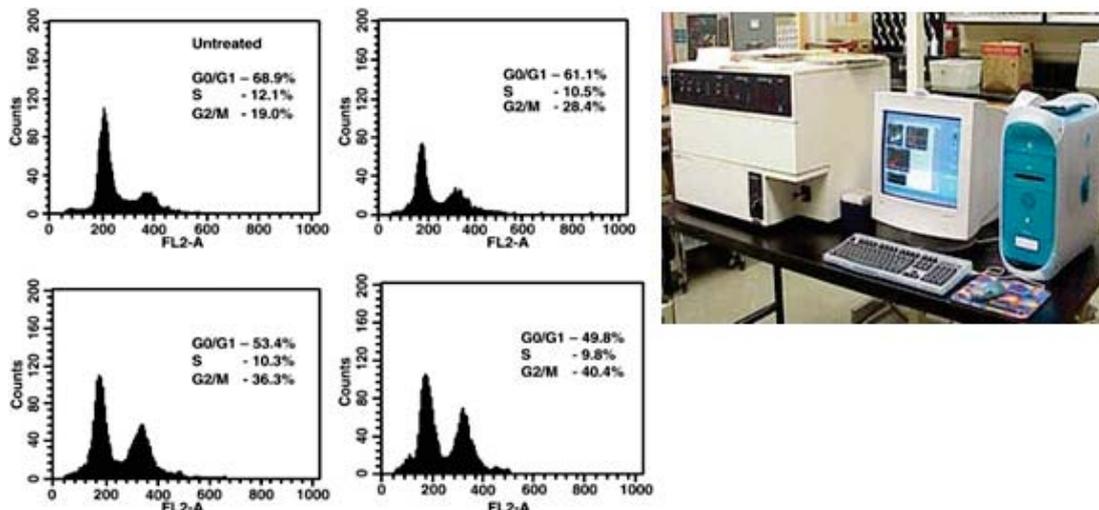


Figura 9. Efecto citostático de 3 concentraciones diferentes de melatonina en células HepG2 y equipo de citometría de flujo.

Este efecto citostático de la melatonina administrada a dosis

farmacológicas parece dependiente de p21, una proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclina, capaz de parar el ciclo celular cuando es sobre-expresada por un mecanismo dependiente del gen supresor de tumores p53 (**Fig. 10**) (Martín-Renedo et al., 2008).

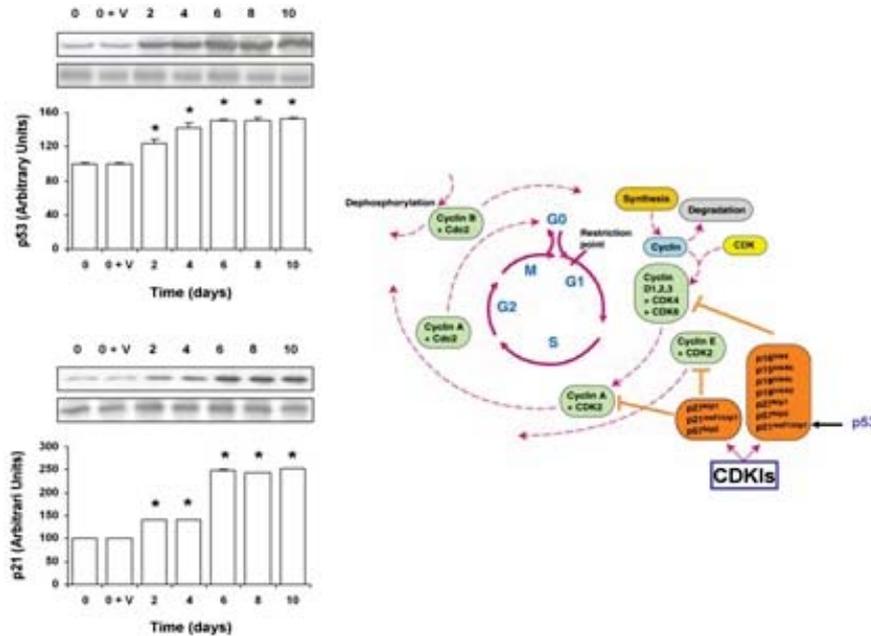


Figura 10. Efecto de la melatonina sobre p21-p53.

Como hemos referido anteriormente otra de las características de muchas células tumorales es su capacidad para evadir la fuerte celular por apoptosis. El organismo humano y de los animales está diseñado de forma que cuando existe un daño importante y significativo es induzca el programa de muerte celular por apoptosis, de esa forma se evita la división de las células dañadas y por ello aparición de nuevas células defectuosas (**Fig. 11**).

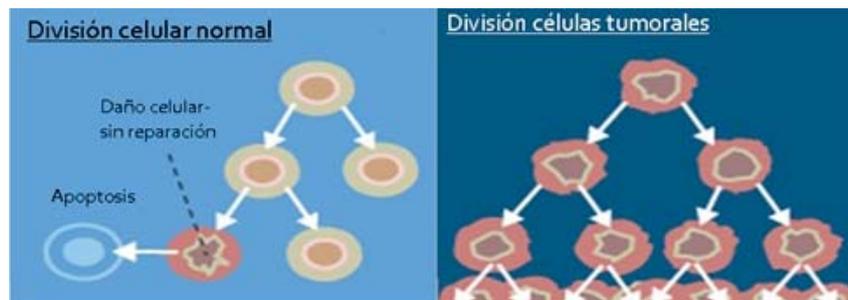
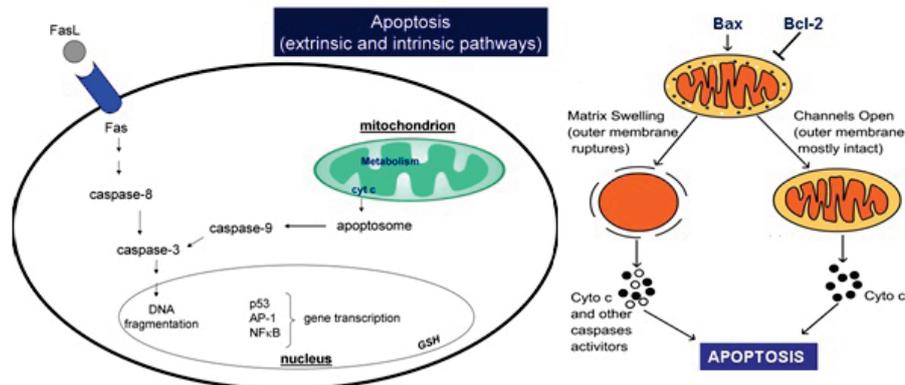


Figura 11. La apoptosis puede estar inhibida en la mayoría de las células tumorales.

Existen diversas vías relacionadas con la apoptosis (**Fig. 12**). En nuestro trabajo nos interesamos por la denominada vía intrínseca (dependiente de la mitocondria) y con la vía extrínseca (relacionada con receptores de muerte como FAS). Hemos podido comprobar que la melatonina es capaz de inducir

apoptosis en células HepG2, observando incremento en la actividad de la caspasa-3 (enzima que produce la proteólisis de diferentes componentes celulares durante la apoptosis), en las caspasas -8 y -9, y en la lisis de la proteína PARP (relacionada con la reparación del DNA, y que sufre degradación cuando existe apoptosis). La apoptosis parecía más relacionada con la inducción de la vía intrínseca (mitocondrial), observándose que la melatonina era capaz de inducir la liberación de citocromo C desde la mitocondria, con inducción de la proteína proapoptótica Bax y represión de la anti-apoptótica Bcl-2 (Martín-Renedo et al., 2008).



Esquema básico de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis

Esquema simplificado de vía intrínseca de la apoptosis

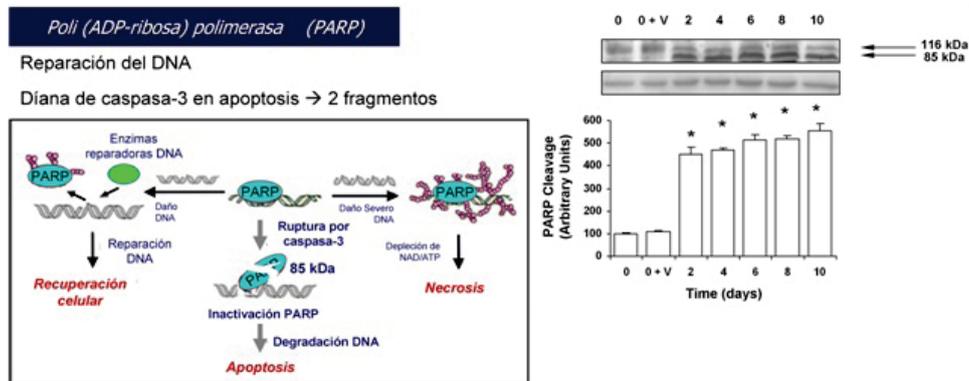


Figura 12. PARP se degrada dando lugar a 2 fragmentos cuando se induce apoptosis al tratar a los hepatocitos tumorales con melatonina

Hemos identificado diversas vías de señalización intracelular relacionadas con los efectos de la melatonina, comprobando que su administración a dosis farmacológicas es capaz de inducir principalmente a JNK1,2,3 y a p38 (Fig. 13).

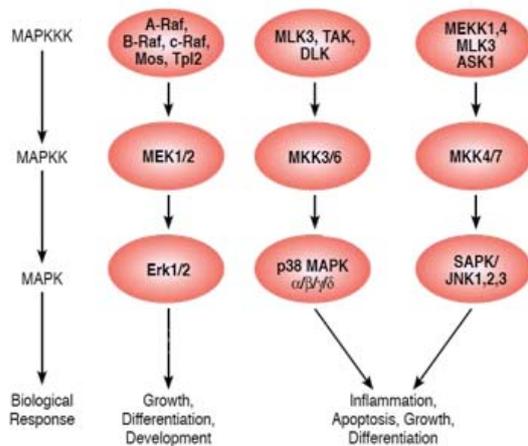


Figura 13. Via MAPK en diversas situaciones fisiopatológicas.

Hemos profundizado también en el análisis de cual es el receptor celular más implicado. Se ha descrito que existen varios receptores celulares de la melatonina, tanto a nivel de membrana como citosólico o nuclear. Los efectos antitumorales de la melatonina parecen relacionados principalmente con el receptor de membrana MT₁, puesto que cuando lo inhibimos químicamente desaparecen dichos efectos (**Fig. 14**) (Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011).

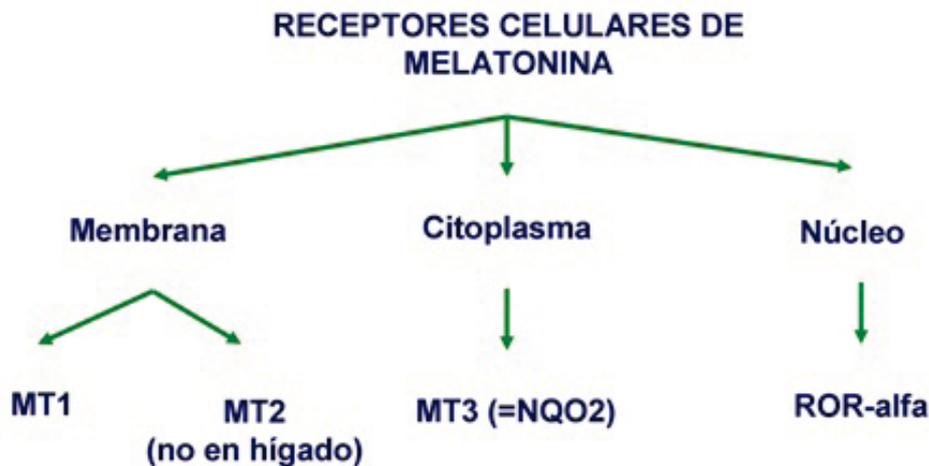


Figura 14. Receptores celulares de la melatonina.

Curiosamente, los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos que la melatonina exhibe sobre los hepatocitos tumorales no se dan cuando la hemos administrado a hepatocitos sanos provenientes de biopsias de pacientes. Lo que parece indicar que esta sustancia, administrada en altas concentraciones, sería solo tóxica para los hepatocitos malignos y no tendría efectos negativos significativos sobre los sanos (Carbajo-Pescador et al., 2009, 2011).

Más recientemente, hemos obtenido prometedores resultados que nos indican que parte del efecto pro-apoptótico de la melatonina podría estar

relacionado con su capacidad para inducir la expresión de la proteína proapoptótica Bim mediante un mecanismo dependiente del factor de transcripción FoxO3A (que hemos sido capaces de bloquear cuando silenciábamos mediante siRNA a dicho factor de transcripción). Estos últimos experimentos, junto con otros relacionados con la angiogénesis en el HCC, todavía no han sido totalmente concluidos ni publicados, por lo que no parece conveniente por el momento su divulgación en detalle.

La importancia de la colaboración de un buen equipo

Como hemos indicado al principio de este pequeño artículo de divulgación, para que la ciencia avance es muy importante la formación de nuevos investigadores y la colaboración de diferentes profesionales. Aunque suene tópico, la investigación consiste en un trabajo muy intenso, que muchas veces no entiende de domingos y festivos, que debe realizarse en grupo y de forma muy comprometida. Nosotros tenemos la suerte de formar un grupo multidisciplinar que trabaja de forma integrada; así los resultados obtenidos por nuestro grupo en esta área de estudio son fruto del trabajo en IBIOMED de varios investigadores básicos (como Sara Carbajo Pescador, Javier Martín Renedo, Maiara Piva, Raquel Ordoñez, Javier González-Gallego o José Luis Mauriz), clínicos (como Andrés García Palomo, Pedro Linares, Francisco Jorquera, José Luis Olcoz o Jesús Culebras) y la colaboración de investigadores de otros centros de prestigio tanto nacionales como internacionales.

Bibliografía

- Bosch, F.X., Ribes, J. y Borrás, J. 1999. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis.* 19:271-285.
- Bruix, J., Calvet, X., Costa, J., Ventura, M., Bruguera, M., Castell, R., Barrera, J.M., Ercilla, G., Sánchez-Tapias, J.M., Vall, M., Bru, C. y Rodés, J. 1989. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet.* 3:1004-1006.
- Carbajo-Pescador, S., García-Palomo, A., Martín-Renedo, J., Piva, M., González-Gallego, J. y Mauriz, J.L. 2011. Melatonin modulation of intracellular signaling pathways in hepatocarcinoma HepG2 cell line: role of the MT1 receptor. *J Pineal Res.* 51:463-467.
- Carbajo-Pescador, S., Martín-Renedo, J., García-Palomo, A., Tuñón, M.J., Mauriz, J.L. y González-Gallego J. 2009. Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *J Pineal Res.* 47:330-338.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. y Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int*

- J Cancer. 127:2893-917.
- Grant, S.G., Melan, M.A., Latimer, J.J., Witt-Enderby, P.A. 2009. Melatonin and breast cancer: cellular mechanisms, clinical studies and future perspectives. *Expert Rev Mol Med*. 11:e5.
- Hanahan, D. y Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- Khare, S.P., Sharma, A., Deodhar, K.K., y Gupta, S. 2011. Overexpression of histone variant H2A.1 and cellular transformation are related in N-nitrosodiethylamine-induced sequential hepatocarcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*. 236:30-5.
- Kew, MC. 2002. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*. 181-182:35-38.
- López-Abente Ortega, G., Pollán Santamaría, M., Aragonés Sanz, N. y Pérez Gómez, B. 2005. La Situación del Cáncer en España. Centro de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid.
- Martín-Renedo, J., Mauriz, J.L., Jorquera, F., Ruiz-Andrés, O., González, P. y González-Gallego, J. 2008. Melatonin induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cell line. *J Pineal Res*. 45:532-540.
- Mauriz, J.L., Durán, M.C., Molpeceres, V., Barrio, J.P., Martín-Renedo, J., Culebras, J.M., González-Gallego, J. y González P. 2007a. Changes in the antioxidant system by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma. *Transl Res*. 150:189-196.
- Mauriz, J.L., Gonzalez, P., Duran, M.C., Molpeceres, V., Culebras, J.M. y Gonzalez-Gallego, J. 2007b. Cell-cycle inhibition by TNP-470 in an in vivo model of hepatocarcinoma is mediated by a p53 and p21WAF1/CIP1 mechanism. *Transl Res*. 149:46-53.
- Mauriz, J.L., Linares, P., Macias, R.I., Jorquera, F., Honrado, E., Olcoz, J.L., González, P. y González-Gallego, J. 2003. TNP-470 inhibits oxidative stress, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Free Radic Res*. 37:841-848.
- Mauriz, J.L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P. y González-Gallego, J. 2007c. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res*. 42:222-230.
- Molpeceres, V., Mauriz, J.L., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P. y González-Gallego, J. 2007. Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 62:687-695.
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L. y Reiter, R.J. 2010. The changing

biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 85:607-623.

Tan, Y.J. 2011. Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 17:4853-4857.

Toualbi, K., Güller, M.C., Mauriz, J.L., Labalette, C., Buendia, M.A., Mauviel, A. y Bernuau, D. 2007. Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene.* 26:3492-3502.

Toualbi-Abed, K., Daniel, F., Güller, M.C., Legrand, A., Mauriz, J.L., Mauviel, A., Bernuau, D. 2008. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis.* 29:536-543.



José Luis Mauriz Gutiérrez es profesor titular de Universidad en el Departamento de Ciencias Biomédicas. Docente en los Grados de Biología, Biotecnología y Veterinaria y en diversos Másteres oficiales. Es coordinador del Máster Universitario de Investigación en Medicina y Coordinador suplente del Programa de Doctorado de Biomedicina de la Universidad de León. Investigador del Instituto Universitario de Biomedicina (IBIOMED) de la Universidad de León y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) del Instituto de Salud Carlos III. Doctor en Biología por la Universidad de León (1999). Ha sido investigador del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) en el Hospital Bichat de París, realizando además estancias en otros laboratorios nacionales e internacionales. Su investigación se centra en la fisiopatología de tumores hepáticos y digestivos, con especial énfasis en el estudio del hepatocarcinoma tanto en modelos in vivo como in vitro. Ha publicado más de una treintena de artículos en revistas biomédicas de prestigio internacional, dirigiendo y participando en diversos Proyectos de Investigación financiados por entidades tanto públicas como privadas, y colaborando con diversos grupos de investigación nacionales e internacionales. Sus actuales trabajos sobre los efectos antitumorales de la melatonina están siendo financiados por la Junta de Castilla y León (Ref LE117A11-2).



Sara Carbajo Pescador, licenciada en Biología, doctoranda en el Programa de Biomedicina de la Universidad de León, realiza su trabajo en IBIOMED como Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria (Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y Fondo Social Europeo). Sus investigaciones, dirigidas por los Dres. Mauriz y González-Gallego, se centran en el estudio de la melatonina en modelos in vitro de hepatocarcinoma, habiendo publicado artículos en revistas internacionales de prestigio y participando en diversos Proyectos de Investigación. Colabora estrechamente con el Departamento de Medicina Interna de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz (Alemania) y con el Departamento de Química de la Universidad Federal de Santa María (Brasil).



Javier Martín Renedo, Doctor en Biología, con Mención Europea, por la Universidad de León (2011), es actualmente Investigador Post-Doc en el Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia), financiado por la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH). Su tesis doctoral se centró en el estudio de moléculas anti-angiogénicas en modelos in vitro de hepatocarcinoma, realizándose en el IBIOMED bajo la dirección de los Dres. Mauriz y González-Gallego. Durante su tesis doctoral recibió financiación del Programa de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación. Ha publicado artículos en revistas de prestigio en su área de investigación y participado en diversos Proyectos de Investigación con financiación competitiva.