



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA**

**RESPUESTA DE LA NUCLEORREDOXINA, UNA ENZIMA  
REDOX SENSIBLE, A ESTÍMULOS OXIDANTES  
PATOLÓGICOS Y NO PATOLÓGICOS EN EL HÍGADO  
DEL RATÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**BRISA RODOPE ALARCÓN SÁNCHEZ**

Asesores:

M. en C., Dr. en C. Jaime Arellanes Robledo

M. en C., Dr. h. c. Eduardo Ramón Téllez Reyes Retana



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## DEDICATORIA

A mi padre Tomás Alarcón por ser mi fortaleza, mi orgullo, mi ejemplo a seguir de lucha y esfuerzo, por creer siempre en mí y darme la seguridad y las alas para sobrevolar este mundo, por enseñarme a continuar a pesar de que todo sugiera que hay que parar.

A mi madre Irene Sánchez por darme el regalo de la vida, cuidarme siempre y brindarme ese amor que no conoce límites ni fronteras, por acompañar mis pasos y ser mi ejemplo a seguir de dignidad, entrega, paciencia y amor.

A mi hermana Lluvia por su protección y amor incondicional, por apoyarme cuando lo he necesitado y enseñarme a perdonar y a ser feliz.

A mi hermana Balkis por ser mi cómplice y apoyarme siempre en mis locuras, por comprenderme y brindarme un poco de esa serenidad que a ella le sobra.

A mi tío Jacinto por ser mi segundo padre y mi protector, por darme tanto amor sin pedir nada a cambio.

A mis abuelos, en especial a mi abuelita Neno que ilumina mi camino desde el cielo.

Dicen que el valor de una vida se mide por las vidas que toca. Al Doctor Max por sus palabras: “Sé que te has caído y sientes que nunca te vas a levantar, pero te lo debes a ti, se lo debes a ellos”. Me han ayudado tanto.

A Paleta y a Pompeya por hacer mi vida más dulce y enseñarme a cuidar mejor los libros, en especial los de embriología por los que tienen un particular gusto.

A ti, por tu paciencia y comprensión, por hacerme feliz, por tanto y tanto amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo por creer en mí, guiarme y darme la oportunidad de desarrollarme, por ponerme retos cada vez más grandes, confiando siempre en que puedo con muchos más, por compartirme sus conocimientos y experiencias.

Al Dr. Eduardo Téllez por brindarme su apoyo tanto en el ámbito profesional como en el personal, por impulsarme en mis proyectos y confiar en mi capacidad.

A mis amigas Valeria, Desiré y Ximena por sus consejos y compañía, por estar conmigo en los momentos felices y en los no tan felices, por estar siempre ahí.

A mis amigos de la facultad, por todo su apoyo.

## CONTENIDO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | RESUMEN .....  | 9  |
| 2.     | INTRODUCCIÓN.....  | 11 |
| 2.1    | Estrés oxidativo.....  | 11 |
| 2.2    | Impacto del estrés oxidativo en la proliferación celular.....        | 14 |
| 2.3    | Biomarcadores de proliferación celular .....                         | 15 |
| 2.4    | Cáncer .....   | 20 |
| 2.5    | Impacto del estrés oxidativo en la carcinogénesis.....               | 28 |
| 2.6    | Carcinogénesis hepática .....  | 30 |
| 2.7    | Epidemiología y factores de riesgo del carcinoma hepatocelular ..... | 35 |
| 2.8    | Biomarcadores en hepatocarcinogénesis.....                           | 40 |
| 2.9    | Conformación histológica y anatómica del hígado.....                 | 42 |
| 2.10   | Regeneración hepática .....  | 47 |
| 2.11   | Modelos de inducción de estrés oxidativo .....                       | 49 |
| 2.11.1 | Modelo de inducción de regeneración hepática .....                   | 50 |
| 2.11.2 | Modelo de inducción de hepatocarcinogénesis.....                     | 52 |
| 2.11.3 | Mecanismo de acción de dietilnitrosamina (DEN) .....                 | 54 |
| 2.12   | Nucleorredoxina (Nxn) .....  | 55 |
| 3.     | HIPÓTESIS .....  | 60 |
| 4.     | OBJETIVOS .....  | 61 |
| 4.1    | Objetivo general:.....   | 61 |
| 4.2    | Objetivos específicos: .....   | 61 |
| 5.     | MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 62 |
| 5.1    | Modelos de inducción de estrés oxidativo .....                       | 63 |
| 5.1.1  | Modelo de inducción de hepatocarcinogénesis.....                     | 63 |
| 5.1.2  | Modelo de inducción de regeneración hepática .....                   | 66 |
| 5.1.3  | Manejo analgésico .....  | 67 |
| 5.1.4  | Metodología para la eutanasia .....                                  | 68 |
| 5.1.5  | Obtención de las muestras.....                                       | 69 |
| 5.1.6  | Procesamiento de las muestras .....                                  | 69 |
| 5.2    | Determinación de proteína total por Western Blot .....               | 70 |
| 5.2.1  | Extracción de proteína .....   | 70 |
| 5.2.2  | Cuantificación de proteína.....                                      | 70 |
| 5.2.3  | Análisis por Western blot desnaturalizante (SDS page) .....          | 72 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 5.2.4 | Electroforesis en gel de poliacrilamida .....   | 72  |
| 5.2.5 | Transferencia de proteínas a membrana.....  | 73  |
| 5.2.6 | Inmunodetección en membrana de las proteínas de interés .....   | 74  |
| 5.2.7 | Análisis densitométrico .....   | 76  |
| 5.2.8 | Análisis estadístico .....  | 76  |
| 5.3   | Determinación de la localización estructural de las proteínas por análisis de inmunohistoquímica.....                   | 77  |
| 6.    | RESULTADOS .....  | 79  |
| 6.1   | Efecto de la dietilnitrosamina en el parénquima hepático del ratón .....  | 79  |
| 6.2   | Arquitectura del parénquima hepático durante la regeneración post hepatectomía parcial .....                            | 82  |
| 6.3   | Respuesta de las proteínas implicadas en la proliferación celular a los efectos del modelo de hepatocarcinogénesis..... | 84  |
| 6.4   | Efectos del modelo de regeneración hepática sobre proteínas implicadas en la proliferación celular.....                 | 93  |
| 6.5   | Incremento de los niveles de expresión de la Nxn bajo el efecto de DEN ...  | 103 |
| 6.6   | Efecto de la dietilnitrosamina sobre los niveles de expresión de proteínas que interaccionan con la Nxn.....            | 107 |
| 6.7   | Expresión proteica de la Nxn durante la regeneración hepática .....   | 111 |
| 6.8   | Efecto de la regeneración hepática sobre los niveles de expresión de proteínas que interaccionan con Nxn.....           | 115 |
| 6.9   | Expresión proteica de marcadores de daño hepático en el modelo de hepatocarcinogénesis.....                             | 119 |
| 6.10  | Efecto de la regeneración hepática sobre la expresión de marcadores de daño hepático .....                              | 124 |
| 7.    | DISCUSIÓN .....   | 129 |
| 8.    | PERSPECTIVAS .....  | 142 |
| 9.    | REFERENCIAS .....   | 143 |
| 10.   | ANEXOS .....  | 149 |

## ABREVIATURAS

- ABC:** Ácido bicinconínico
- Akt:** Proteína quinasa B
- ADN:** Ácido desoxiribonucleico
- ADNmt:** ADN mitocondrial
- APS:** Persulfato de amonio
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ASB:** Albúmina de suero bovino
- BC:** Buffer de corrida
- BT:** Buffer de transferencia
- C:** Control no tratado
- CAT:** Catalasa
- CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- CHC:** Carcinoma hepatocelular
- CK1 $\alpha$ :** Caseína cinasa 1 $\alpha$
- CO:** Células ovales
- CTL:** Linfocitos T citotóxicos
- CSC:** Células madre del cáncer
- Cyp2e1:** Citocromo p450-2e1
- DEN:** Dietilnitrosamina
- D2.5:** DEN dosis 2.5 mg/kg
- D5:** DEN dosis 5 mg/kg
- D10:** DEN dosis 10 mg/kg
- D20:** DEN dosis 20 mg/kg
- Dvl:** Dishevelled
- EE:** Error Estándar
- Flii:** Flightless-I
- Fzd:** Frizzled
- Gapdh:** Glutaraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
- GPx:** Glutación peroxidasa
- GSH:** Glutación
- GSK3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$

**Gstp1:** Glutathion s transferasa pi 1  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno  
**HO<sub>2</sub>·:** Radical perhidroxilo  
**HP:** Hepatectomía parcial  
**HP6H:** HP a las 6 horas  
**HP1:** HP a 1 día  
**HP2:** HP a los 2 días  
**HP3:** HP a los 3 días  
**HP5:** HP a los 5 días  
**HP6:** HP a los 6 días  
**HP7:** HP a los 7 días  
**HP10:** HP a los 10 días  
**HRP:** Peroxidasa de rábano  
**H&E:** Hematoxilina y eosina  
**IHQ:** Inmunohistoquímica  
**IP:** Inmunoprecipitación  
**i.p.:** Intraperitoneal  
**MAPK:** Proteínas quinasas activadas por mitógenos  
**MDSCs:** Células supresoras de origen mielóide  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NF-κβ:** Factor nuclear κβ  
**NK:** Células asesinas naturales  
**NOX:** NADPH oxidasa  
**Nrf2:** Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2  
**Myd88:** Gen primario de diferenciación mielóide-88  
**Nxn:** Nucleorreductasa  
**O<sub>2</sub>:** Oxígeno molecular  
**O<sup>2·-</sup>:** Anión superóxido  
**OH·:** Radical hidroxilo  
**Pcna:** Antígeno nuclear de células en proliferación  
**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PFK-1:** Fosfofructoquinasa-1

**PI3K:** Enzima fosfatidilinositol 3-quinasa  
**PP2A:** Proteína fosfatasa-2A  
**pRB:** proteína del gen del retinoblastoma  
**Prx:** Peroxirredoxinas  
**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno  
**RB:** Retinoblastoma  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$   
**TLR4:** Receptores tipo Toll 4  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**Tregs:** Células T reguladoras  
**VHB:** Virus de la hepatitis tipo B  
**VHC:** Virus de la hepatitis tipo C  
**WB:** Western blot  
**Wnt:** Wingless

## 1. RESUMEN

ALARCÓN SÁNCHEZ BRISA RODOPE. Respuesta de la nucleorredoxina, una enzima redox sensible, a estímulos oxidantes patológicos y no patológicos en el hígado del ratón (bajo la dirección de: M. en C., Dr. en C. Jaime Arellanes Robledo y M. en C., Dr. h. c. Eduardo Ramón Téllez Reyes Retana)

Los mecanismos moleculares regulados a través de interacciones óxido-reducción (redox) sensibles tiene un papel central tanto en procesos normales como en la progresión de las enfermedades promovidas por el estrés oxidativo o producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo es regulado, entre otros, por enzimas redox sensibles como la nucleorredoxina (Nxn). Esta enzima censa las ROS para detectar el estatus redox del microambiente celular y ejercer su función reguladora sobre vías de señalización que participan en procesos como la proliferación celular. Por lo tanto, caracterizar el comportamiento de moléculas redox sensibles y de sus componentes de señalización ofrece la oportunidad de entender su papel en procesos tanto normales como patológicos. En este proyecto utilizamos un modelo de regeneración hepática y uno de hepatocarcinogénesis química crónica para inducir el estrés oxidativo en un contexto normal y patológico, respectivamente y así, determinar la respuesta de la Nxn y de algunos de sus componentes de señalización en el hígado de ratones de la cepa C57BL6/J. Con el uso de metodologías de biología molecular encontramos que la expresión de la Nxn es modulada en el proceso de proliferación celular durante la regeneración hepática y es estimulada durante el proceso de

hepatocarcinogénesis química crónica. Estos resultados indican que los cambios en la expresión de la Nxn dependen del estímulo aplicado y sugieren que la cantidad de estrés oxidativo generado juega un papel central en la respuesta de esta enzima.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se puede definir como el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son productos altamente reactivos derivados del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Estos compuestos se originan por mecanismos endógenos como el metabolismo celular; y por mecanismos exógenos como la exposición a xenobióticos y a agentes ambientales. Entre las ROS se encuentran el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ) (Ding *et al.*, 2015).

Niveles basales de ROS pueden activar diferentes vías de señalización celular y factores transcripcionales relacionados con el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la motilidad y la apoptosis (Zhang *et al.*, 2011), tal es el caso de la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía Wingless (Wnt)/ $\beta$ -catenina, la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt), el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), el factor nuclear (derivado de eritroides 2) similar al 2 (Nrf2) y el gen supresor de tumores *p53* (Ha *et al.*, 2010). Por el contrario, su producción excesiva puede causar toxicidad celular, modificar componentes moleculares, generar daños graves, lesiones senescentes, degenerativas y muerte celular; como resultado, las células activan tanto las vías de señalización de estrés, como los sistemas antioxidantes que reconocen y eliminan las células y/o alteraciones moleculares originadas por las ROS (Zhang *et al.*, 2011).

En la célula, el sitio principal de producción de ROS durante procesos de oxidación normal es la mitocondria. Esto se lleva a cabo a través de reacciones

óxido-reducción, donde el oxígeno es el último aceptor de electrones, en los complejos de transferencia de electrones I y III principalmente, localizados en la membrana interna de la mitocondria (Macedo-Márquez, 2012). Durante la respiración oxidativa, un estimado de 1-2% de  $O_2$  gana un electrón y se reduce a  $O_2^{\cdot-}$ , que puede convertirse en  $H_2O_2$  y en  $OH^{\cdot}$  altamente reactivo (Zhang *et al.*, 2011).

Los altos niveles de ROS pueden iniciar la apoptosis de manera intrínseca en la mitocondria. Esto se lleva a cabo a través de la liberación de factores proapoptóticos como el Citocromo P450 o la oxidación del glutatión (GSH); a su vez, causa la pérdida de la homeostasis redox intramitocondrial y genera modificaciones oxidativas irreversibles sobre diversas macromoléculas entre las que se encuentra el ADN mitocondrial (ADNmt). La apoptosis también puede iniciarse de manera extrínseca en la membrana plasmática (apoptosis mediada por receptor) (El-Osta y Circu, 2016).

La producción de ROS se puede llevar a cabo en otras vías diferentes a la mitocondria, por ejemplo, durante el metabolismo de compuestos tóxicos, en el que participan las enzimas de familia del Citocromo P450; y por la exposición a radiaciones ionizantes, ultravioleta o por la interacción con metales pesados (Zhang *et al.*, 2011).

El principal órgano del cuerpo implicado en el metabolismo de xenobióticos (drogas y toxinas, entre otras) es el hígado (Nantasanti *et al.*, 2016). La exposición constante de forma aguda o crónica genera una respuesta inflamatoria, que induce tanto la movilización y el reclutamiento de células del sistema inmune; como la activación de mecanismos de proliferación celular con el fin de reparar el daño. De los procesos de inflamación-reparación resulta la

producción de ROS, que indiscriminadamente pueden interactuar con las biomoléculas del microambiente celular, siendo sus principales blancos los dobles enlaces en los lípidos, los residuos de cisteína y metionina en las proteínas, y la posición C8 en la desoxiguanosina (Macedo-Márquez, 2012); en conjunto, la oxidación puede alterar los procesos de proliferación celular y de apoptosis. La suma de alteraciones oxidativas en diferentes vías de señalización puede modular la expresión génica, la adhesión, el metabolismo, el ciclo y la muerte celular. Esto ha revelado que las ROS pueden actuar como potenciales carcinógenos debido a que promueven la mutagénesis, la promoción y progresión de tumores (Ha *et al.*, 2010).

Bajo condiciones fisiológicas normales, la acumulación de ROS está limitada por numerosos sistemas antioxidantes endógenos que incluyen mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos, estos pueden o bien eliminar ROS o prevenir su formación. El incremento de los niveles de ROS puede resultar de una respuesta antioxidante ineficiente (El-Osta y Circu, 2016). Entre las enzimas antioxidantes de mayor importancia se encuentra la familia de enzimas superóxido dismutasa (SOD), las catalasas (CAT), las glutatión peroxidasas (GPx) y las peroxirredoxinas (Prx) las cuales se pueden localizar en diferentes sitios de la célula. Las SOD son una familia de enzimas que catalizan la dismutación de  $O_2^{\cdot-}$ , una de sus características es que poseen un centro catalítico formado por un metal. Las CATs están implicadas en el metabolismo del  $H_2O_2$  y las GPxs catalizan la reducción de  $H_2O_2$  y lipoperóxido (L-OOH), utilizando al GSH como agente reductor (Sid *et al.*, 2013). El antioxidante no proteico más abundante en las células es el GSH, el cual se sintetiza por la glutamato cisteína ligasa (GCL), un heterodímero constituido por

una subunidad catalítica (GCLC) y una modificadora (GCLM) (Harris *et al.*, 2015). Esta molécula previene la oxidación de los grupos *tiol* proteicos ya sea de manera directa o indirecta por reacción con las ROS o a través de GPxs, respectivamente (Zhang *et al.*, 2011).

Además del GSH, enzimas de la familia de las tiorredoxinas, como la nucleorredoxina (Nxn), están involucradas en la eliminación de ROS y en la regulación de los procesos redox (El-Osta y Circu, 2016). Otros antioxidantes no enzimáticos como NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), ácido úrico y bilirrubina desempeñan un papel importante en la depuración de ROS. La vitamina C (ácido ascórbico), protege las células contra el daño oxidativo en el citoplasma, mientras que la vitamina E (tocoferol), un antioxidante hidrófobo soluble, previene las reacciones de peroxidación de la membrana lipídica al reaccionar con los radicales libres.

## **2.2 Impacto del estrés oxidativo en la proliferación celular**

La proliferación celular es el aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular. Es fundamental para los organismos en desarrollo y durante la renovación o reparación de tejidos. Se lleva a cabo a través de la mitosis, fenómeno en el cual la célula se divide y dan lugar a dos células hijas idénticas. Sin embargo, la proliferación celular de forma incontrolada puede conducir a desórdenes graves, dando lugar a la formación de neoplasias que pueden progresar a cáncer.

Se ha descrito que las moléculas que conforman al estrés oxidativo participan como transductoras de señales para regular la proliferación celular. Así, la presencia de bajos niveles de ROS promueve la proliferación celular por la

estimulación transitoria de diferentes vías de señalización, mientras que un ligero incremento del estrés oxidativo puede causar la detención del crecimiento celular como respuesta adaptativa, incluyendo activación de la respuesta antioxidante, así como la expresión de genes de reparación del ADN (Zhang *et al.*, 2011).

### **2.3 Biomarcadores de proliferación celular**

La proliferación celular implica la activación de diferentes vías de señalización, una de las más importantes es la vía Wntless (Wnt)/ $\beta$ -catenina, la cual está relacionada con la morfogénesis primaria, el mantenimiento de las células madre, la autorenovación de tejidos, el control del desarrollo temprano, la proliferación y el destino celular y cuya activación, en parte, depende de la presencia de ROS. Aunque en la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina participan diferentes moléculas, un incremento de ROS intracelular propicia su translocación al núcleo, dando como resultado un estímulo proliferativo (Ochoa *et al.*, 2012). Recientes investigaciones han descrito que la inhibición de su actividad se lleva a cabo por enzimas redox sensibles pertenecientes a la familia de las tiorredoxinas.

En órganos como el hígado adulto,  $\beta$ -catenina se localiza principalmente en la membrana de los hepatocitos; además, durante el desarrollo se encuentra en el citoplasma de las células epiteliales y endoteliales biliares, donde participa en la diferenciación biliar y en la proliferación de las células endoteliales sinusoidales (Nejak-Bowen y Monga, 2011). Su actividad también ha sido identificada en el mantenimiento de la quiescencia y activación de las células estrelladas hepáticas (Kordes *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado

que la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina representa una ventaja en la regeneración, y en la activación y diferenciación de las células ovas hepáticas. Su activación aberrante y sostenida se ha reportado en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (CHC). Aunque se han descrito muchos mecanismos para su activación, el más frecuente es la mutación del gen que codifica para  $\beta$ -catenina, *CTNNB1*, o mutaciones en los genes que participan en su activación como *WNT*, o en su degradación como *AXIN1* o *AXIN2*. Sin embargo, en algunas investigaciones se ha observado que la sobreexpresión hepática de  $\beta$ -catenina no es suficiente para promover la tumorigénesis y que requiere de la participación de mecanismos alternativos (Nejak-Bowen y Monga, 2011).

Otra función en la que participa esta molécula es en la regulación de la expresión de genes que codifican para enzimas críticas en el metabolismo de xenobióticos, por ejemplo, la enzima Citocromo P450 (Benhamouche *et al.*, 2006).  $\beta$ -catenina también está implicada en la adhesión célula-célula de las células epiteliales, debido a que forma un puente entre el citoesqueleto de actina y E-cadherina; la perturbación de esta unión genera deterioro en el tráfico apical de proteínas específicas, además de contribuir en la metástasis (Nejak-Bowen y Monga, 2011).

Recientes estudios han reportado que la activación de  $\beta$ -catenina en procesos neoplásicos regula negativamente vías mitogénicas con la finalidad de impedir el desarrollo del CHC. Esto se debe a que  $\beta$ -catenina puede activar la expresión de represores de la vía o suprimir componentes positivos, lo que indica que existe un proceso de retroalimentación negativa para amortiguar o suprimir la señalización de su propia vía. En este sentido, en la inducción de la carcinogénesis química por dietilnitrosamina (DEN), las mutaciones de  $\beta$ -

catenina contribuyen a la adquisición del fenotipo oncogénico, por ejemplo, la selección de hepatocitos mutados del gen *Ha-Ras* (Nejak-Bowen y Monga, 2011). Diversos estudios señalan que  $\beta$ -catenina parece también proteger contra lesiones genotóxicas generadas por la administración de DEN (Zhang *et al.*, 2010; Rignall *et al.*, 2011).

Existen otras moléculas implicadas en la progresión del ciclo celular, entre las principales se encuentran Ciclina D1, el antígeno nuclear de proliferación celular (Pcna) y Ki67, y su correspondiente interacción con otras proteínas, que a su vez participan en la proliferación celular, en la regulación de la apoptosis, y cuya modificación en su expresión puede dar como resultado la alteración de dichos procesos.

Por su parte, la Ciclina D1 pertenece a la familia de las ciclinas, codificada por el gen *CCND1*. Ciclina D1 participa activamente en el ciclo celular como regulador alostérico de la quinasa dependiente de Ciclina 4 (CDK4) y CDK6, de esta forma, regular la transición del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. Promueve también la progresión del ciclo celular inactivando a la proteína del gen del retinoblastoma (*pRB*), por fosforilación directa del sustrato, la cual en estado desfosforilado inactiva moléculas que funcionan como factores transcripcionales implicados en el crecimiento y la proliferación celular. La expresión, acumulación y degradación de Ciclina D1, así como el montaje y la activación de CDK4/CDK6, se rigen por la estimulación de factores de crecimiento (Qie y Diehl, 2016). Su sobreexpresión también podría deberse a la amplificación o reordenamiento del gen *CCND1*, asociado a diversos estímulos (Khabaz *et al.*, 2016). Las alteración en su expresión conduce al crecimiento rápido de las células en condiciones de señalización mitogénica restringida, a

la eliminación de puntos de control celulares, y en última instancia, al crecimiento neoplásico (Qie y Diehl, 2016). Por lo tanto, Ciclina D1 es un oncogén que altera la estabilidad genómica, la supervivencia, el crecimiento, la adhesión, la migración y como consecuencia el potencial metastásico, los cuales son potencialmente controlados por la producción de ROS. Recientemente se han descrito algunas otras funciones de Ciclina D1, entre las que se encuentran su participación en el control del estado redox y cómo esto afecta a la adhesión celular, la migración, y la respuesta a los fármacos. También se relaciona con el aumento de la síntesis de moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM1), de quimiocinas inflamatorias como interleucina 8 (IL-8), de proteína inducible por interferón 10 (IP-10) y de quimiocinas de regulación por activación expresadas y secretadas por linfocitos T (RANTES), entre otras (Bustany *et al.*, 2016).

Pcna es una proteína nuclear altamente conservada, que pertenece a la familia de abrazaderas deslizantes. Su expresión aumenta al final del período G1, alcanza su pico en la fase S, decae durante la fase G2 y desaparece durante la fase mitótica y en las células quiescentes, por lo que se le considera un marcador de proliferación celular. Pcna se localiza en el núcleo y favorece la replicación y reparación del ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa  $\gamma$ ; participa también en el mantenimiento estructural de la cromatina, la segregación cromosómica y la progresión del ciclo celular (Fan *et al.*, 2016). Su estructura consta de 3 anillos que rodean la cadena de ADN y se deslizan a lo largo de la hebra, a través de un mecanismo de “rueda dentada” basada en interacciones polares de vida corta que mantienen la abrazadera invariante con respecto al ADN. La mutación de residuos en la interface Pcna-ADN, pone en

peligro el inicio de la síntesis por la ADN polimerasa debido a que bloquea la progresión de la horquilla de replicación (De March *et al.*, 2017). La respuesta celular a menudo resulta en el cambio de la función de Pcná; así como también, en cambios en la interacción con otras moléculas implicadas en la replicación del ADN y el ciclo celular, por ejemplo, las CDKs, las ciclinas, los inhibidores del ciclo celular p21 y p27, que a su vez son componentes cruciales del sistema de puntos de control. Estimula también a la familia de genes *GADD45/MYD118/CR6* que codifican genes relacionados con la supresión del crecimiento y la muerte celular por apoptosis (Stoimenov y Thomas, 2009). Se sabe que la inhibición de los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis, entre otros procesos, dan como resultado el establecimiento de alteraciones en la proliferación celular, que funge como antesala del establecimiento del cáncer, lo cual coincide con la sobreexpresión de Pcná en tumores malignos, incluyendo cáncer de mama, cáncer rectal, CHC y carcinoma de células renales (Fan *et al.*, 2016).

El antígeno Ki67 es una proteína de unión a ADN, localizada en el núcleo, que participa en el ciclo celular, con una expresión máxima en la fase G2 y la mitosis; y se encuentra ausente en las células en reposo durante la fase G0. Contrario a otras proteínas asociadas al ciclo celular, Ki67 no está presente en células latentes ni durante los procesos de reparación del ADN. Por ello, la presencia del antígeno Ki67 se asocia estrictamente con el ciclo celular y se confina al núcleo, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento o regulación de la división celular (Sobecki *et al.*, 2016). Varios estudios indican que Ki67 lejos de promover la proliferación celular, es un mediador esencial de la organización de la heterocromatina y de las interacciones de largo alcance

de la cromatina. Dichos estudios han comprobado que la inhibición de Ki67, genera la reorganización de la heterocromatina, sin interferir con la progresión del ciclo celular, pero sí contribuye con la remodelación de la expresión génica (Cidado *et al.*, 2016). La organización de la heterocromatina, inducida por Ki67, se ve comprometida a menudo en las células cancerosas. Por otro lado, la sobreexpresión de Ki67 genera condensación de la cromatina que detiene la fase G1 del ciclo celular, lo que sugiere la necesidad de una degradación controlada. La localización dinámica de Ki67 ha llevado a sugerir que podría coordinar el montaje y desmontaje nucleolar durante la mitosis, esto coincide con el hecho de que los inhibidores de la función nucleolar han demostrado tener un efecto selectivo para eliminar solo células cancerosas y dejar intactas a aquellas no cancerosas, por lo cual está considerado como un biomarcador de cáncer (Sobecki *et al.*, 2016).

## **2.4 Cáncer**

La palabra cáncer fue acuñada por Galenos en el siglo II d.c., deriva del griego *Karkinos* que significa cangrejo, y se utilizó para describir un tipo de lesión ulcerosa crónica, endurecida en ocasiones, que se desarrolla progresivamente, expandiéndose por los tejidos y cuyos vasos sanguíneos adoptan una disposición similar a las patas de un cangrejo. Sin embargo, ya para el siglo IV a.c., Hipócrates hizo la primera diferenciación entre cáncer y adenoma, basándose en los criterios de malignidad y benignidad de acuerdo al tipo de crecimiento celular (Salaverry, 2013). La organización mundial de la salud (OMS) define al cáncer como un “término genérico aplicable a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo y cuya

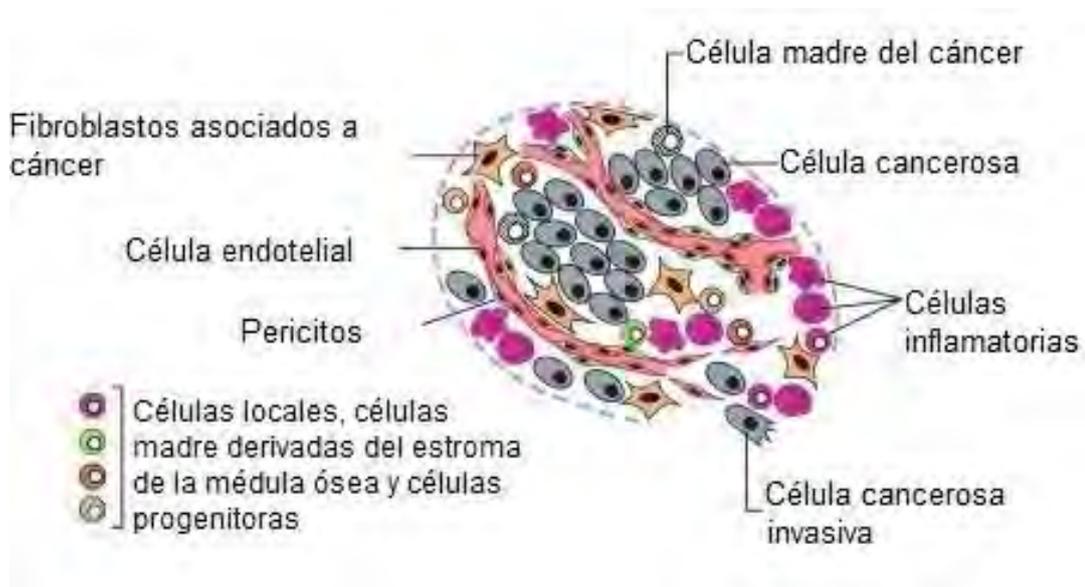
característica distintiva es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos” (OMS, 2017).

De acuerdo con la OMS, el cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, tan solo en 2015 ocurrieron 8.8 millones de defunciones atribuibles a este padecimiento. Los cinco tipos de cáncer más comunes son: el cáncer pulmonar, el hepático, el colorrectal, el gástrico y el de mama, en orden decreciente (OMS, 2017).

Según la Clasificación Internacional de Cánceres para Oncología (3a ed.), el cáncer se clasifica en cinco categorías de acuerdo al tipo de tejido en el que se desarrolla: 1) carcinoma, se usa para definir a los tumores malignos que se originan en el tejido epitelial que cubre a los órganos y representa el 80% de todos los tipos de cáncer; 2) sarcoma, es la neoplasia que se desarrolla a partir de tejido mesenquimatoso; 3) mieloma y leucemia, corresponden a los cánceres de sangre que se genera a partir de células del plasma de la médula ósea; 4) linfoma, es el cáncer que afecta al sistema linfático y 5) neuroendocrino, es el cáncer que afecta al sistema nervioso y endocrino. Existen otras clasificaciones que hacen referencia a su magnitud y se describen en una escala de I a IV según el tiempo de evolución; y que a su vez permite establecer otra clasificación según su benignidad o malignidad (OMS, 2017).

El cáncer es el resultado de la evolución de células normales que progresan a un estado neoplásico donde adquieren capacidades biológicas en la medida que el cáncer progresa. Dichas capacidades les confieren a las células rasgos que les permiten convertirse en tumorigénicas y por último en malignas. La

adquisición de estas capacidades se ve favorecida por la inestabilidad genómica que incluye el reordenamiento cromosómico y la respuesta inflamatoria que monta un escenario favorable para la progresión tumoral. Es así, que los tumores se definen como tejidos complejos compuestos de múltiples tipos de células, que interactúan con células del estroma y componentes de la matriz extracelular, lo que se define como microambiente tumoral (Figura 1). Dichas interacciones contribuyen a la adquisición y desarrollo de estas capacidades.



**Figura 1. Representación esquemática del microambiente tumoral.** El parénquima y el estroma de los tumores están conformados por distintos tipos y subtipos de células que en conjunto permiten el crecimiento y la progresión del tumor. Modificado de: Hanahan y Weinberg, 2011.

Al respecto, se han propuesto seis características del cáncer que comprenden las capacidades biológicas adquiridas por el tumor. En la última década, se propuso añadir dos características más, esto debido a su notable impacto en la progresión tumoral (Figura 2).



**Figura 2. Características distintivas del cáncer.** Representación esquemática de las características adquiridas por el cáncer, durante su desarrollo. Modificado de: Hanahan y Weinberg, 2011.

A continuación se describen brevemente las características distintivas del cáncer:

1. El **mantenimiento de la señalización proliferativa** resulta de la alteración en la regulación de las señales promotoras del crecimiento, que alteran el ciclo de crecimiento y división celular, modificando el número de células y, por lo tanto, la función y arquitectura del tejido normal. Además, las células neoplásicas presentan una reducción a la dependencia de la estimulación exógena, lo cual se asocia con su

capacidad para sintetizar sus propios factores de crecimiento; por ejemplo, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

2. La **evasión de los supresores del crecimiento** propicia alteraciones en la regulación del ciclo celular y le permite al tumor sobrevivir a los estímulos inhibitorios. En condiciones normales, los supresores del crecimiento regulan negativamente el crecimiento, la proliferación y activan la senescencia y la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011). Brevemente, la senescencia replicativa es un fenómeno que implica la suspensión del ciclo celular de manera permanente, debido a esto las células pierden la capacidad de responder a estímulos mitógenicos y apoptóticos, sin embargo permanecen vivas, aunque metabólicamente alteradas (Muñoz y Serrano, 2014).
3. La **resistencia a la muerte celular** que desarrollan las células tumorales para limitar o evitar la apoptosis, puede estar mediada por procesos intrínsecos de la célula como la eliminación de los sensores de daño crítico, el aumento de la expresión de las señales anti-apoptóticas, el aumento de señales de supervivencia celular; también puede deberse a un cortocircuito de la vía extrínseca de apoptosis inducida por ligando o a evasión de la autofagia (Hanahan y Weinberg, 2011).
4. La **inmortalidad replicativa** es una capacidad alcanzada por las células que han logrado rebasar dos barreras de la proliferación: la senescencia celular y la crisis que implica la muerte celular. Por consiguiente, estas células adquieren la capacidad de realizar un número ilimitado de ciclos de crecimiento y divisiones sucesivas. Dichas barreras se activan de forma normal para impedir la derivación de clones de células

preneoplásicas o neoplásicas. Las células que poseen mutaciones o fusión de cromosomas son capaces de evadir estas barreras. Actualmente, se ha vinculado la falta del acortamiento normal de los telómeros, que está relacionado con la no activación de una u otra de estas barreras proliferativas (Carr, 2016).

5. La **inducción de angiogénesis** se origina por la necesidad de los tumores de adquirir nutrientes y oxígeno y evacuar desechos metabólicos y CO<sub>2</sub>, demandas que se satisfacen por la neovascularización aberrante, que permite así la expansión del crecimiento neoplásico. Este proceso se ve favorecido por la activación de vías de señalización proangiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF).
6. La **activación de la invasión y la metástasis** ocurre como resultado de la pérdida de adhesión celular, del tránsito de células cancerosas a través de los vasos sanguíneos (intravasación) y vías linfáticas, seguido por la salida de las células cancerosas del lumen de los vasos con dirección al parénquima de tejidos distantes (extravasación), para formar pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y por último, la transición de nódulos a tumores macroscópicos (colonización). Al proceso por el cual las células epiteliales adquieren las habilidades de invadir, resistir la apoptosis y difundir, se le conoce como transición epitelio-mesenquimal (Hanahan y Weinberg, 2011).

Las últimas dos características añadidas son:

7. La **reprogramación del metabolismo energético** se desarrolla para sustituir el metabolismo que impera en las células normales con la

finalidad de sustentar la abundante proliferación y crecimiento celular en los procesos tumorales. En condiciones aeróbicas, las células normales generan piruvato a partir de glucosa mediante la glucólisis en el citosol, que posteriormente se convierte en  $\text{CO}_2$  en la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa. En condiciones anaeróbicas, la glucólisis envía menor cantidad de piruvato a la mitocondria, por lo que las células cancerosas deben compensar la deficiencia en la producción de ATP otorgada por la glucólisis. En las hipóxicas, que es un estado predominante en las células tumorales, se aumentan los niveles de la transcripción de Factor Inductor de Hipoxia 1 (HIF1), que a su vez regulan positivamente la glucólisis.

8. La **evasión de la respuesta inmune** que logran las células neoplásicas para permitir la formación y progresión del tumor, se ha observado en algunos tipos de cáncer. Las células cancerosas altamente inmunogénicas pueden evadir la destrucción inmune mediante la desactivación de elementos del sistema inmunitario, por ejemplo, pueden secretar factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que detiene la infiltración de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células asesinas naturales (NK); o el reclutamiento de células T reguladoras (Tregs) y células supresoras de origen mieloide (MDSCs), ambas inhibidoras de CTL (Hanahan y Weinberg, 2011).

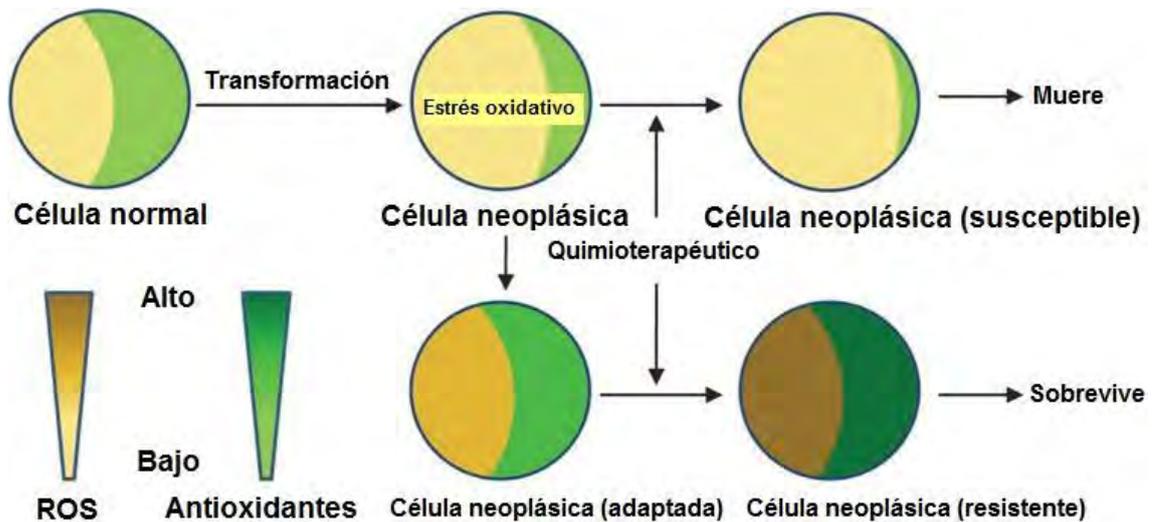
La adquisición de las características antes mencionadas requiere de la aparición de alteraciones y mutaciones en el genoma de las células neoplásicas, que les confieren ventajas selectivas. Además de la adquisición del genotipo mutante, la inactivación de diferentes genes se puede adquirir por

alteraciones en mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y la modificación de las histonas, esto aunado a los defectos en los sistemas de mantenimiento o vigilancia del genoma. De suma importancia en la integridad genómica es el gen *p53*, llamado también “guardián del genoma”, que junto con otros genes se encarga de la detección del daño, activación de la maquinaria de reparación y la inactivación o intercepción de moléculas mutagénicas. Otras formas de generar inestabilidad genómica son la pérdida del ADN telomérico y la respuesta inmune que proporciona estímulos como la generación de ROS, moléculas que son altamente mutagénicas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Otro componente importante del cáncer son las células madres del cáncer (CSC), que forman parte de la heterogeneidad celular de los tumores avanzados, compuestos por subpoblaciones clonales distintas, por lo que los tumores poseen diferentes grados de diferenciación, vascularidad, inflamación e invasividad. Las CSC poseen la capacidad de iniciar tumores, auto-renovarse y dar origen a estirpes celulares con diferentes características. De la elevada tasa metabólica de las células tumorales, resulta una elevada producción de ROS, que si no es controlada por ellas podría conducir las a muerte celular, debido a esto las CSC activan una serie de mecanismos antioxidantes para contrarrestar y eliminar las ROS. La eficiente respuesta antioxidante que se observa en las CSC, favorece la supervivencia celular, perjudica la respuesta a los quimioterapéuticos y protege las células neoplásicas de la muerte celular inducida por los ROS. De esta forma, las CSC son la subpoblación a la que se le atribuye la capacidad de resistencia a los quimioterapéuticos o a la radiación, característica que les permite sobrevivir y generar nuevos tumores (Ding *et al.*, 2015).

## 2.5 Impacto del estrés oxidativo en la carcinogénesis

Como se describió previamente, una de las características del cáncer es la proliferación celular masiva, dicha proliferación descontrolada conduce a la producción de ROS en grandes cantidades, como subproductos de las actividades metabólicas celulares. Las ROS pueden ejercer importantes modificaciones en biomoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos, generan mutaciones, convierten protooncogenes en oncogenes, inactivan genes supresores de tumores o modifican vías de señalización, que en conjunto pueden propiciar el establecimiento del cáncer. El estrés oxidativo inducido por el aumento en los niveles de ROS, que en células normales activa los sistemas antioxidantes, es regulado por las células cancerosas de forma que impide la muerte celular y permite la progresión tumoral (Harris *et al.*, 2015). Esto es posible gracias a que los altos niveles de ROS pueden activar tanto vías de supervivencia celular, como factores de transcripción asociados a la proliferación celular, adhesión, migración, invasión y metástasis, así como el reordenamiento del citoesqueleto, procesos importantes en la tumorigénesis. La producción de ROS también ha sido relacionada con la resistencia de las células neoplásicas a la quimioterapia (Figura 3). La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos inducen la producción de ROS para promover la muerte de las células neoplásicas; esto a su vez, fomenta el desequilibrio entre los sistemas antioxidantes activados de forma normal y el estrés oxidativo estimulado por la excesiva proliferación celular; las células neoplásicas que sean capaces de mantener el equilibrio serán resistentes al agente quimioterapéutico y podrán progresar al establecimiento del tumor.



**Figura 3. Esquematización de la resistencia de las células neoplásicas a los quimioterapéuticos.** Tal resistencia resulta de la adaptación de las células neoplásicas al estrés oxidativo inducido por los quimioterapéuticos. Modificado de: Zhang *et al.*, 2011.

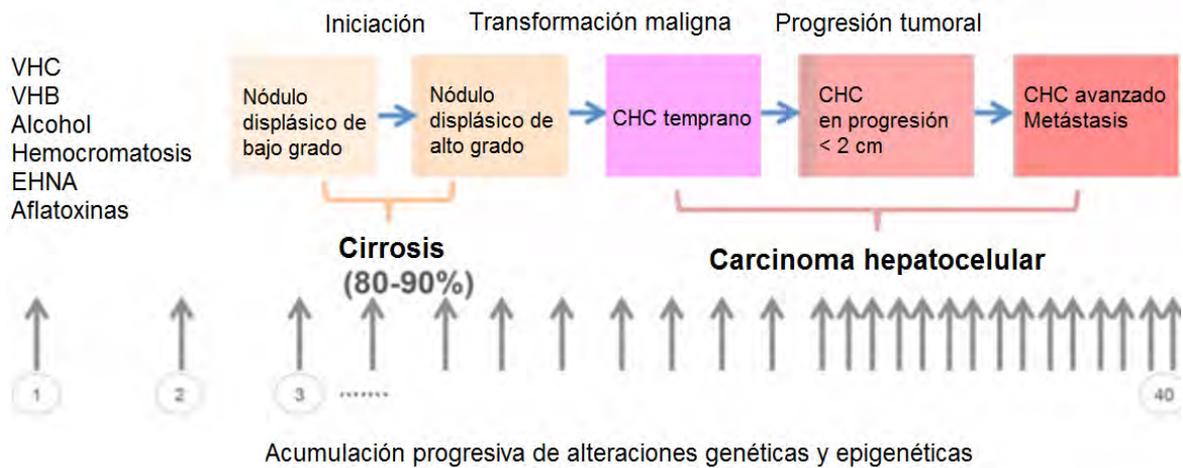
Actualmente, se sabe que las ROS se producen en menor cantidad en las CSC, en comparación con las células madre normales, en las que el bajo nivel de ROS es importante para mantener las características de las células madre. Las CSC se aprecian como una subpoblación que persiste en los tumores, causando recaídas y metástasis (Zhang *et al.*, 2011). En resumen, la información anterior nos permite apreciar claramente el papel clave que el estrés oxidativo tiene sobre la progresión tumoral, la adquisición de la malignidad, la invasión y la metástasis.

## 2.6 Carcinogénesis hepática

El hígado es el principal órgano del metabolismo y detoxificación de agentes dañinos. Posee también una elevada capacidad de regeneración, cualidad que le permite recuperarse de los daños ocasionados por dichos agentes y que a su vez lo convierte en un blanco fácil de la mutagénesis. La frecuente exposición a estos agentes conduce a procesos de inflamación y reparación de los hepatocitos. Si el daño persiste ya sea de forma aguda o crónica, los procesos de reparación son ineficientes y pueden desencadenar la enfermedad crónica hepática (Pascual *et al.*, 2016).

El cáncer primario de hígado engloba a tres patologías entre las que se encuentran el CHC, el angiosarcoma hepático y el colangiosarcoma. De éstos, el CHC es el que se encuentra con mayor frecuencia y representa el 90% de todo los cánceres primarios de hígado (Sia *et al.*, 2017).

Las alteraciones genómicas observadas en el CHC, se generan principalmente por la exposición a factores de riesgo. Entre los principales se encuentran: la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), la exposición a aflatoxinas producidas por los hongos del género *Aspergillus* y el consumo elevado de alcohol (Figura 4). Sin embargo, este padecimiento puede presentarse en personas sin exposición a algún factor de riesgo conocido (Pascual *et al.*, 2016). La mayoría de los factores de riesgo propician el CHC debido a que cursan por un proceso de inflamación crónica que conduce a fibrosis y a cirrosis hepática, presente entre el 80 y 90% de los pacientes con CHC (Dhanasekaran *et al.*, 2016).

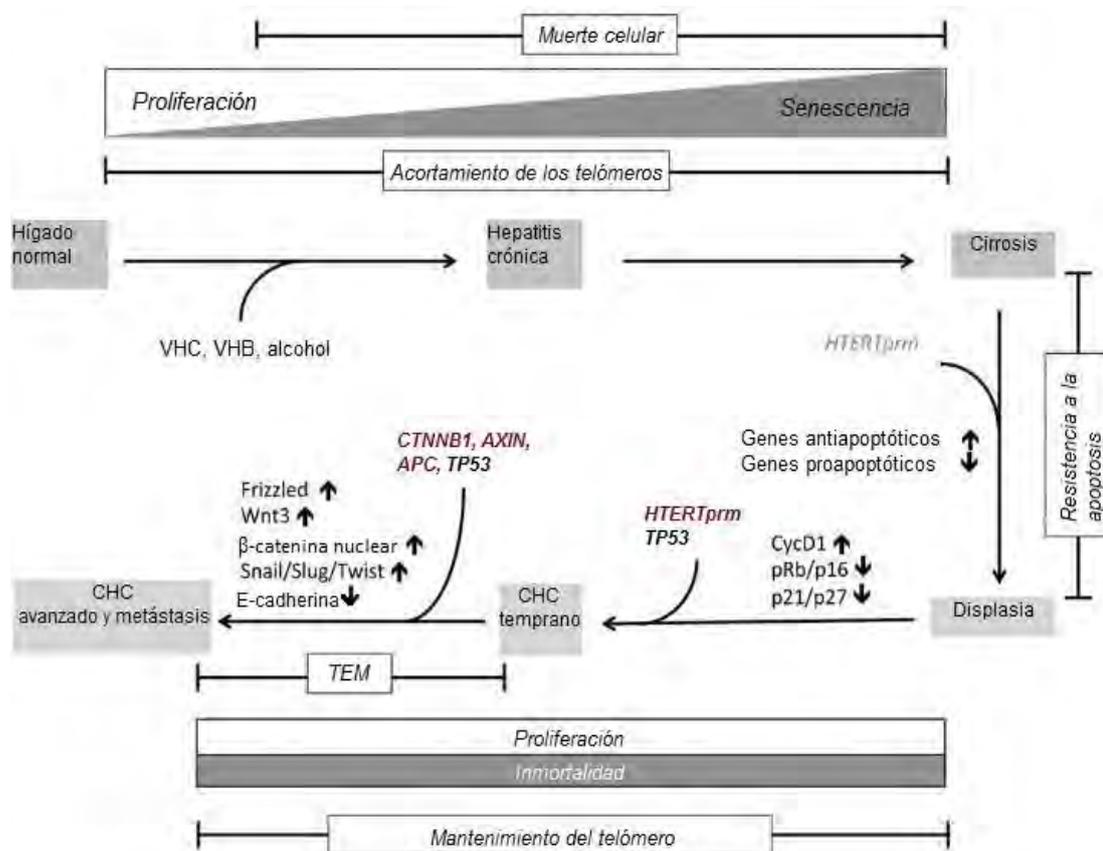


**Figura 4. Representación esquemática las etapas presentes en el CHC.** La hepatocarcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que presenta una acumulación progresiva de alteraciones genómicas en los hepatocitos. En el CHC se acumulan 40 mutaciones funcionales aproximadamente. Modificado de: Carr, 2016.

Algunas de las teorías sobre el origen del CHC postulan que las células madre del cáncer o células ovas (CO) encargadas de la regeneración, pueden ser estimuladas a proliferar en situaciones donde un gran porcentaje del hígado está dañado. Las CO se diferencian en hepatocitos o colangiocitos dependiendo del grado y duración del daño, si el daño es muy extenso pueden dar lugar a cambios neoplásicos. Una segunda hipótesis propone que los hepatocitos maduros son la población celular en riesgo, ya que cuando forman áreas de proliferación pueden convertirse en áreas nodulares de hiperplasia (Carr, 2016). Actualmente, se cuestiona también que la participación de las células estrelladas en la regeneración hepática pueda ser de importancia en el CHC (Mu *et al.*, 2015).

Los mecanismos moleculares implicados en el CHC indican que estos tumores se caracterizan por una falta en la regulación de los mecanismos que controlan el número y el fenotipo de los hepatocitos y/o de sus progenitores (Figura 5). La pérdida de control del ciclo celular, la evasión de la senescencia, así como la

resistencia a la muerte celular promueven la proliferación celular a nivel global. Algunos de estos cambios se relacionan con las mutaciones adquiridas en los genes p53 y p16, y en el promotor telomerasa transcriptasa inversa (TERT), de igual forma existen otras aberraciones no ligadas a ninguna mutación conocida. Otro factor que conduce al establecimiento del CHC es la pérdida de estabilidad fenotípica que se observa en los hepatocitos maduros. La mayoría de células que se aprecian en el CHC poseen plasticidad fenotípica que les permite ganar morfología epitelial o mesenquimal y mayor motilidad, piezas claves en los procesos de migración, invasión y metástasis. Estas facultades les confieren a la vez ventajas selectivas, de supervivencia y progresión (Carr, 2016).



**Figura 5. Mecanismos moleculares del carcinoma hepatocelular.** Descripción general de los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento del carcinoma hepatocelular. Modificado de: Carr, 2016.

Al analizar por microscopía electrónica tejido hepático de pacientes con cirrosis, pueden observarse lesiones preneoplásicas compuestas por focos de hepatocitos alterados o nódulos displásicos (Dhanasekaran *et al.*, 2016). Estas lesiones se forman a partir de células pequeñas, poco diferenciadas (principalmente diploides) y de células grandes, altamente diferenciadas (tetraploides o ploidías superiores), que sufren alguna alteración de forma individual, esta alteración conduce al desarrollo focal de las lesiones preneoplásicas, que progresan hacia la hiperplasia nodular, forman nódulos patológicos y áreas de verdadera malignidad. Sin embargo, la formación de nódulos displásicos no es necesaria para el desarrollo de CHC (Carr, 2016). Además, la activación de las vías mitogénicas durante el periodo preneoplásico permite la selección de clonas celulares displásicas que poseen inestabilidad genómica y fenotipo maligno (Uribe *et al.*, 2010).

El mecanismo de inducción de CHC depende de los factores de riesgo, la dosis y la duración de la exposición al agente. Por ejemplo, el VHB es considerado genotóxico debido a que puede modificar el genoma de las células huésped. La integración del ADN del VHB al genoma huésped se le conoce como mutagénesis inherente, y es un mecanismo oncogénico temprano que promueve la proliferación clonal de hepatocitos tumorales (Levrero y Zucman-Rossi, 2016). El VHC es un virus de ARN con poco potencial para integrar su material genético en el genoma del huésped. Se asume que contribuye al desarrollo del CHC de forma indirecta, a través de la inducción de inflamación crónica persistente, fibrosis y cirrosis; y directamente, por medio de factores virales que promueven la proliferación y supervivencia celular, inducen inflamación, alteración de vías metabólicas, estrés oxidativo, daño al ADN e

inestabilidad genómica, expansión clonal de células tumorales, fibrogénesis y atenúan la respuesta inmune celular, lo que conlleva a la evasión del sistema inmune (Hoshida *et al.*, 2014). El abuso de alcohol se ha asociado con el desarrollo del CHC en un contexto de hepatitis y cirrosis. Del metabolismo del alcohol resulta el acetaldehído, un metabolito altamente mutagénico que genera aductos cíclicos en el ADN, además de estar vinculado con la producción de ROS. El daño oxidativo del hígado que conduce a la cirrosis resultante del consumo elevado de alcohol y la consiguiente peroxidación lipídica puede conducir a hepatitis crónica. También se ha demostrado que el consumo crónico de alcohol puede actuar sinérgicamente con la hepatitis viral y así contribuir con el aumento del riesgo de desarrollar CHC (Carr, 2016). Por su parte, el metabolismo de la Aflatoxina B1 se lleva a cabo en el hígado por la enzima Citocromo P450 (Cyp450), durante su metabolismo se forma un intermediario muy reactivo, el AFB1 exo-8,9-epóxido que posee la capacidad de unirse a la posición N7 de la guanina, forma aductos en el ADN e induce transversiones de nucleótidos con una mutación específica recurrente identificada en el gen *p53*. La formación de aductos voluminosos en el ADN puede resultar en la no codificación. Puede también inducir la producción de ROS, que es un agente potencialmente mutagénico (Zhang *et al.*, 2016).

La mayoría de los factores desencadenantes del CHC actúan en un contexto de inflamación crónica persistente, fibrosis y cirrosis. La fibrosis se genera como respuesta a una lesión hepática o como una característica de algunas enfermedades; si progresa a cirrosis, independientemente de su etiología puede desencadenar el CHC.

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento del CHC, menos del 40% de los pacientes son elegibles para tratamiento al momento del diagnóstico, y los tratamientos sistémicos como la quimioterapia estándar no han demostrado gran eficacia (Carr, 2016). La información anterior resalta los mecanismos moleculares ya descritos que participan en la progresión del CHC; sin embargo, también dejan clara la importancia y necesidad de generar nuevos conocimientos que describan de una manera más detallada la participación de vías de señalización y sus componentes, en el desarrollo de esta neoplasia, con el objetivo de contribuir en la comprensión del comportamiento del CHC que en un futuro cercano pueda impactar en el diseño de estrategias terapéuticas con mayor eficacia.

## **2.7 Epidemiología y factores de riesgo del carcinoma hepatocelular**

El CHC representa el 85-90% de todos los cánceres primarios de hígado (Schütte *et al.*, 2009) y es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Estudios realizados en el año 2012 señalan una incidencia de 782,000 nuevos casos de cáncer de hígado, de los cuales 746,000 murieron por esta causa (Park *et al.*, 2015). El CHC representa la quinta causa más común de cáncer y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer en todo el mundo, solo superada por el cáncer de estómago (Balas *et al.*, 2016).

Su epidemiología es compleja debido a que presenta variaciones entre regiones geográficas; grupos raciales, étnicos, géneros, edades; y a la presencia de múltiples factores de riesgo predisponentes que a su vez

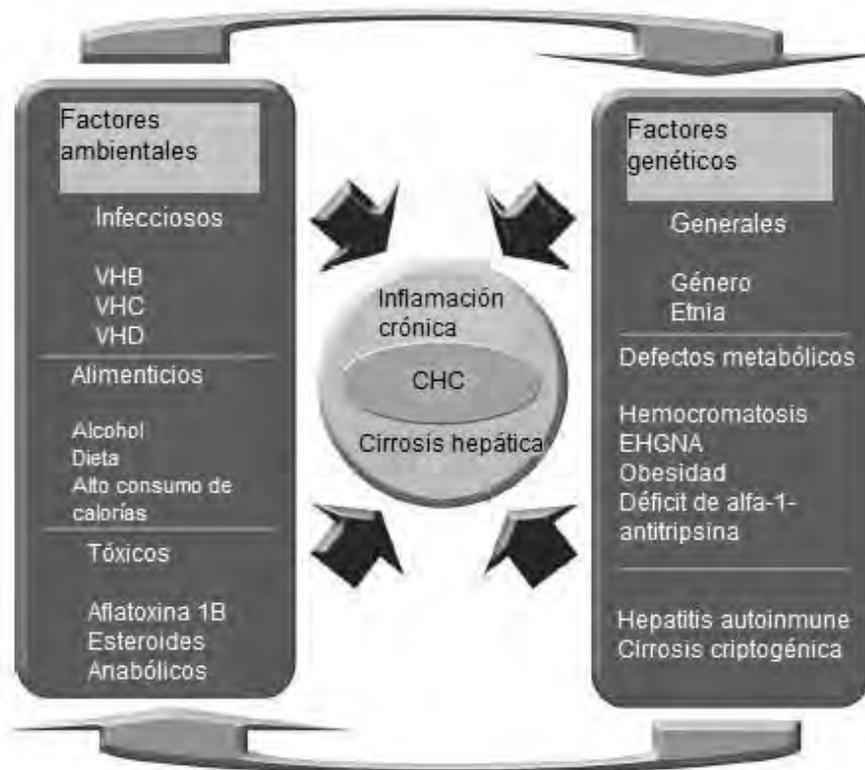
interactúan entre sí. Las tasas de prevalencia más elevadas se encuentran por lo general en países como África subsahariana, Asia sudoriental y China (Figura 6) (Pascual *et al.*, 2016).



**Figura 6. Incidencia del CHC.** Variaciones regionales de la incidencia de CHC, rangos ajustados por edad. Modificado de: GLOBOCAN, 2012.

Según múltiples estudios, las tasas de incidencia y mortalidad son más altas en hombres que en mujeres, con una proporción 2-4:1 respectivamente, y representa la quinta causa principal de cáncer diagnosticado en hombres y la séptima en mujeres (Pascual *et al.*, 2016). El mayor riesgo para la población masculina se debe probablemente a una mayor exposición a los factores de riesgo y a cierta influencia de hormonas sexuales específicas (Schütte *et al.*, 2009). También se asume una influencia del origen étnico, en países como Estados Unidos, donde la incidencia en los hispanos ha aumentado en la última década. Los grupos de edad más afectados se encuentran entre los 70 años en regiones de baja prevalencia y a partir de los 60 años en regiones de alta prevalencia (González y Sánchez, 2014).

El principal factor de riesgo vinculado con el desarrollo del CHC es la enfermedad hepática crónica y la cirrosis, presentes entre el 70 y el 90% de los pacientes con CHC. Generalmente estos casos están relacionados con la infección por el VHB en un 54%, VHC en un 31% y con otras causas en un 15% (Figura 7) (Pascual *et al.*, 2016). Sin embargo, aunque la infección por VHB sigue representando el principal factor de riesgo, su relevancia ha disminuido desde que se introdujo la vacunación profiláctica. En contraste, ha habido un aumento del CHC asociado a infección por el VHC debido principalmente al incremento en el consumo de drogas intravenosas y a contaminación de los suministros de sangre. En los países desarrollados, también se ha descrito la influencia del consumo elevado de alcohol (50-70 g/día), el consumo de aflatoxinas y la enfermedad hepática grasa no alcohólica a menudo en el contexto del síndrome metabólico (que implica obesidad y diabetes mellitus), entre otros factores menos estudiados (Schütte *et al.*, 2009).



**Figura 7. Factores de riesgo relacionados con el CHC.** La imagen muestra los factores tanto ambientales como propios del individuo que se relacionan con el desarrollo del CHC. Modificado de: Schütte *et al.*, 2009.

América latina en particular se considera en riesgo moderado debido a una incidencia de aproximadamente 11 a 20 casos por cada 100,000 habitantes (Uribe *et al.*, 2010).

En México se ha observado un incremento en la incidencia de esta patología en las últimas décadas. De acuerdo con los datos recabados por la Dirección General de Información en Salud en el 2008, se observó un incremento en la mortalidad por esta enfermedad del 0.4% en la década de los ochenta al 1.3% para el 2008 (Tabla 1). Según este registro, las enfermedades crónicas del hígado ocupan la cuarta causa de muerte a nivel nacional donde el tumor hepático se posiciona en el lugar 17 de mortalidad por cáncer, precedido por

otros tumores malignos como el tumor de vías respiratorias, estómago y próstata.

**Tabla 1. Principales causas de mortalidad general a nivel nacional, año 2008.**

| Orden | Clave CIE 10a. Rev.       | Descripción  | Defunciones   | Tasa <sup>1/</sup> | %          |
|-------|---------------------------|--|---------------|--------------------|------------|
|       | A00-Y98                   | Total  | 538 288       | 504.6              | 100.0      |
| 1     | E10-E14                   | Diabetes mellitus  | 75 572        | 70.8               | 14.0       |
| 2     | I20-I25                   | Enfermedades isquémicas del corazón                      | 59 579        | 55.8               | 11.1       |
| 3     | I60-I69                   | Enfermedad cerebrovascular                               | 30 212        | 28.3               | 5.6        |
| 4     | K70, K72.1, K73, K74, K76 | <b>Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado</b> | <b>28 422</b> | <b>26.6</b>        | <b>5.3</b> |
| 5     | J40-J44, J67              | Enfermedad pulmonar obstructiva crónica                  | 20 565        | 19.3               | 3.8        |
| 6     | <sup>2/</sup>             | Accidentes de vehículo de motor                          | 16 882        | 15.8               | 3.1        |
| 7     | I10-I15                   | Enfermedades hipertensivas                               | 15 694        | 14.7               | 2.9        |
| 8     | J10-J18, J20-J22          | Infecciones respiratorias agudas bajas                   | 15 096        | 14.2               | 2.8        |
| 9     | P00-P96                   | Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal    | 14 767        | 13.8               | 2.7        |
| 10    | X85-Y09, Y87.1            | Agresiones (homicidios)                                  | 13 900        | 13.0               | 2.6        |
| 11    | N00-N19                   | Nefritis y nefrosis                                      | 12 592        | 11.8               | 2.3        |
| 12    | E40-E46                   | Desnutrición calórico protéica                           | 8 310         | 7.8                | 1.5        |
| 13    | C33-C34                   | Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón             | 6 697         | 6.3                | 1.2        |
| 14    | C16                       | Tumor maligno del estómago                               | 5 509         | 5.2                | 1.0        |
| 15    | B20-B24                   | VIH/SIDA   | 5 183         | 4.9                | 1.0        |
| 16    | C61                       | Tumor maligno de la próstata                             | 5 148         | 4.8                | 1.0        |
| 17    | C22                       | <b>Tumor maligno del hígado</b>                          | <b>5 037</b>  | <b>4.7</b>         | <b>0.9</b> |
| 18    | C50                       | Tumor maligno de la mama                                 | 4 840         | 4.5                | 0.9        |
| 19    | X60-X84, Y87.0            | Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)     | 4 668         | 4.4                | 0.9        |
| 20    | C53                       | Tumor maligno del cuello del útero                       | 4 031         | 3.8                | 0.7        |
|       | R00-R99                   | Causas mal definidas                                     | 10 514        | 9.9                | 2.0        |
|       |                           | Las demás  | 175 070       | 164.1              | 32.5       |

<sup>1/</sup> Tasa por 100,000 habitantes

Los totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

<sup>2/</sup> V02-V04 (.1, .9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3-.9), V29-V79 (.4-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86 (.0-

Las principales causas de mortalidad están basadas en la lista GBD de 165

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

La información disponible en el país refiere que el CHC se presenta con mayor frecuencia entre los 60 y 70 años, con una incidencia similar entre hombres y mujeres. La mayoría de los casos de CHC (70 al 90%) se relacionan con cirrosis subyacente y sus principales causas son la enfermedad hepática alcohólica (39.5%) y la infección por el VHC (36.6%) (González y Sánchez, 2014).

## 2.8 Biomarcadores en hepatocarcinogénesis

El análisis molecular de los perfiles de expresión de proteínas asociadas a la inducción y progresión del cáncer de hígado ha sido ampliamente examinado en distintos modelos animales y ha arrojado una variedad de biomarcadores de utilidad para detectar y clasificar su desarrollo. Uno de los más importantes es la enzima glutatión S transferasa Pi 1 (Gstp1) que pertenece a la familia glutatión S transferasa (GST), un grupo de enzimas con actividad antioxidante que participan en la desintoxicación de sustancias endógenas, en la inactivación de carcinógenos electrofílicos por conjugación con GSH, y en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis. Las alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética, cómo la hipermetilación del promotor, a menudo están involucrados en el desarrollo, progresión y recurrencia de diferentes tumores entre los que se encuentra el CHC (Martignano *et al.*, 2016). El estrés oxidativo que resulta del desequilibrio oxidante/antioxidante induce, entre otros eventos, el agotamiento de moléculas antioxidantes como Gstp1; así, esta molécula es considerada uno de los elementos que propician el desarrollo del cáncer. Estudios recientes han indicado que el polimorfismo de Gstp1, el gen *11e105Val*, está relacionado con el aumento de la susceptibilidad al CHC debido a afecciones en la expresión del RNAm de Gstp1 (Li *et al.*, 2013). En roedores, se pueden observar hepatocitos que expresan aberrantemente Gstp1 posterior a la exposición a carcinógenos genotóxicos, por ejemplo, DEN y Aflatoxina B1. Se ha sugerido que la localización tisular de dicha sobreexpresión representa una población de hepatocitos alterados, que responden a la acción del carcinógeno. Algunos de los subconjuntos de hepatocitos que expresan Gstp1 se desarrollan en colonias de hepatocitos que

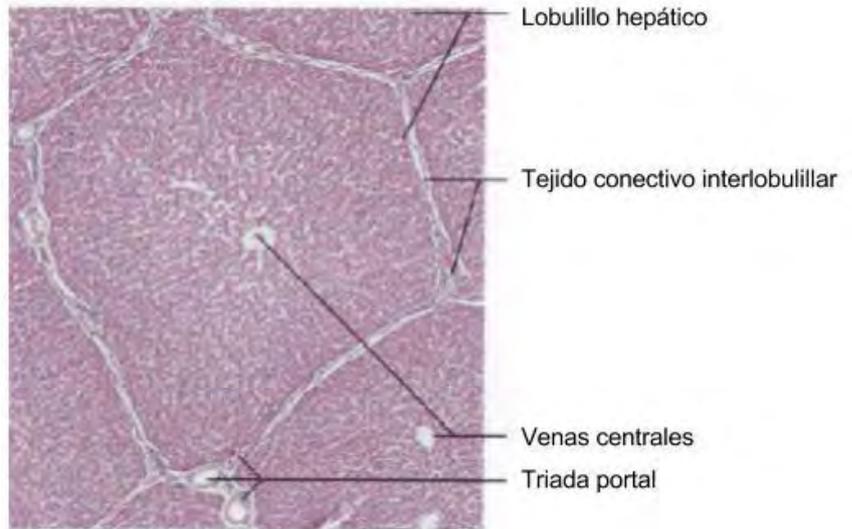
también expresan la enzima y pueden progresar a nódulos neoplásicos y posteriormente a CHC, por lo cual Gstp1 se utiliza como un biomarcador de lesiones preneoplásicas (Carr, 2016).

Otro biomarcador ampliamente conocido es la familia de proteínas Citocromo P450, a la cual pertenece la enzima Citocromo p450-2e1 (Cyp2e1). Esta enzima se expresa constitutivamente en el hígado, principalmente a nivel de mitocondrias y retículo endoplásmico, y participa en el metabolismo de varias aminas y alcoholes biogénicos de bajo peso molecular (Kaledin *et al.*, 2015). Posee una alta actividad oxidante NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), lo que resulta en su capacidad para producir grandes cantidades de ROS, que a su vez interaccionan con el óxido nítrico para generar peroxinitritos y peroxidación de lípidos, mecanismos que pueden conducir al desarrollo de diversas patologías hepáticas. Actualmente, se ha descrito su papel en el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica y la enfermedad hepática grasa no alcohólica, debido a que bajo estas condiciones propicia el aumento de la producción de ROS (Abdelmegeed *et al.*, 2015). Además, agentes como el etanol pueden inducir la expresión y activación de esta enzima y como resultado incrementan los niveles de ROS, situación que se puede observar en la enfermedad hepática alcohólica. En este sentido, el Cyp2e1 ejerce un efecto citoprotector al inducir factores de respuesta antioxidante como Nrf2, para proteger a la célula contra el incremento en los niveles de ROS (Leung y Nieto, 2013). Estudios recientes en los que se indujo la sobreexpresión de Cyp2e1 por diferentes fármacos relacionados con toxicidad hepática, han demostrado que la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina es un regulador transcripcional de esta enzima (Gerbai-Chaloin *et al.*, 2014).

## 2.9 Conformación histológica y anatómica del hígado

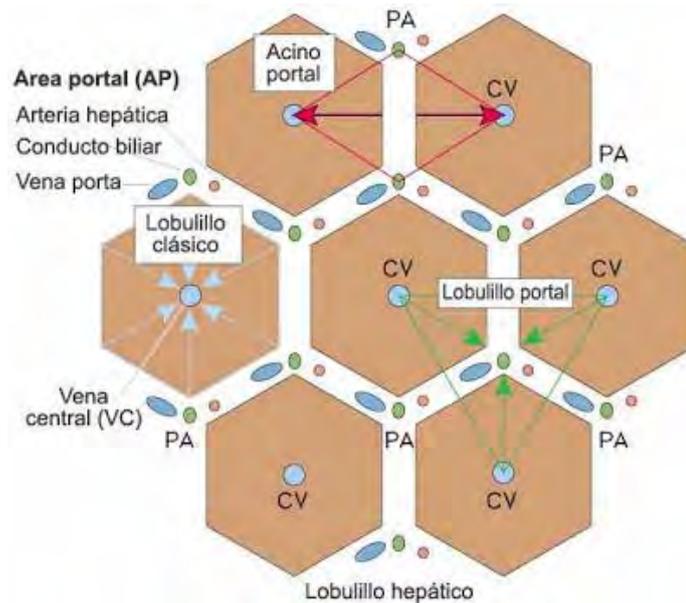
El hígado es la glándula más grande del organismo, pesa aproximadamente 1400 g en la mujer y 1800 g en el hombre (Sibulesky, 2013), se localiza en la parte superior derecha del abdomen y se encuentra rodeado por una delgada cápsula de tejido conectivo recubierta en su mayor parte por peritoneo, denominada cápsula fibrosa perivascular (cápsula de Glisson). En el hilio hepático el tejido conectivo de la cápsula continúa hacia el interior de la glándula y divide el parénquima hepático en lobulillos, donde rodea las triadas portales o de Glisson (Geneser, 2015). La triada es una unidad compuesta por una ramificación de la arteria hepática, la vena porta y el sistema de vías biliares (Bogdanosa *et al.*, 2013).

La unidad estructural y funcional hepática es el lobulillo hepático, un prisma hexagonal de aproximadamente 2 mm de longitud y 1 mm de diámetro, que está limitado por tejido conectivo interlobulillar (Figura 8). En las esquinas del lobulillo se localizan las triadas portales. Los lobulillos están compuestos por cordones de hepatocitos, separados por sinusoides, que irradian hacia la periferia desde la vena central. Los sinusoides comunican las ramificaciones terminales de la arteria hepática y la vena porta con la vena central, y están separados de las placas de hepatocitos por una hendidura llena de líquido, el espacio persinusoidal (espacio de Disse), que contiene el plasma que se filtra a través de la pared sinusoidal (Geneser, 2015).



**Figura 8. Fotomicrografía de un corte histológico de tejido hepático de cerdo.** En el centro de la imagen se observa un lobulillo hepático rodeado por otros seis lobulillos. Fuente: Geneser, 2015.

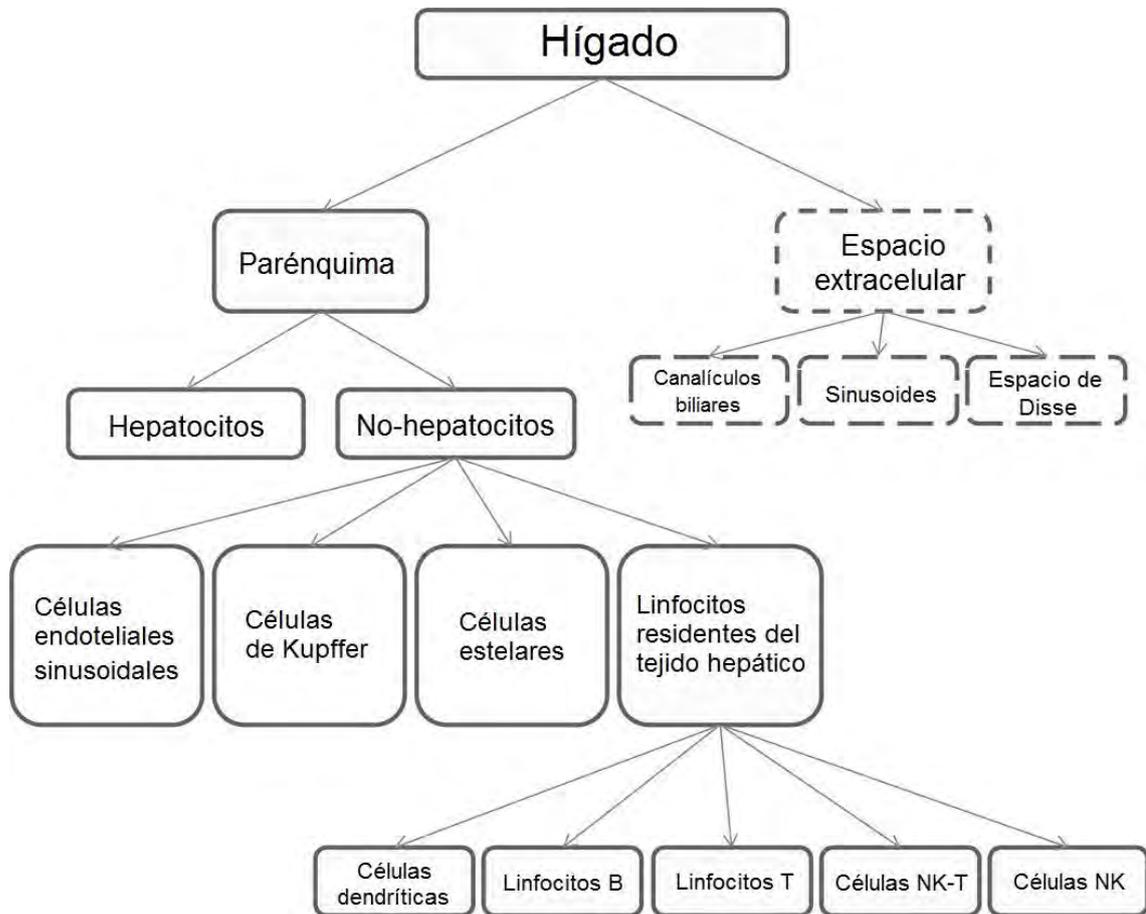
El ácino hepático (ácino portal) es la mínima unidad funcional; está conformado por el parénquima que se encuentra entre dos venas centrales, recibe su irrigación sanguínea de las ramas terminales de la arteria hepática y la vena porta y emite su secreción al conductillo biliar (Figura 9). La disposición de la células del ácino forma zonas funcionales concéntricas, en las cuales las células más cercanas al eje reciben sangre con mayor cantidad de oxígeno y nutrientes que las células más cercanas a la vena central (Geneser, 2015).



**Figura 9. Conformación estructural y funcional del hígado.** Dibujo esquemático de dos concepciones de unidad estructural (lobulillo) y funcional (ácino) hepática mínima.

La sangre venosa ingresa al órgano a través de la vena porta desde el tracto esofagogastrointestinal, el bazo y el páncreas. Dicha sangre contiene la mayor parte de las sustancias absorbidas en el intestino. La sangre arterial es proporcionada por la arteria hepática. La sangre de la vena porta y la arteria hepática se mezclan al atravesar el hígado y luego drenan por la vena hepática a la vena cava inferior con dirección a la circulación general (Geneser, 2015).

La mayor parte del hígado está conformada por las células del parénquima (hepatocitos), que ocupan aproximadamente el 78-80% del total de tejido; las células no parenquimatosas constituyen el 5-6% y el 14-17% restante corresponde a los componentes celulares del espacio extracelular (Figura 10) (Bogdanosa *et al.*, 2013).



**Figura 10. Conformación celular y extracelular del hígado.** Esquema que muestra las células que conforman el parénquima hepático, así como las estructuras que componen el espacio extracelular. Modificado de: Bogdanosa *et al*, 2013

Los hepatocitos son células parenquimatosas poliédricas grandes que poseen seis superficies. Los núcleos son grandes, redondos, de localización central, y poseen uno o varios nucléolos. El citoplasma presenta aspecto muy variable debido a las diferentes situaciones funcionales de los hepatocitos. El retículo endoplásmico liso está bien desarrollado, dado que varias de las principales funciones detoxificantes del hígado son realizadas por este organelo.

Entre las células no parenquimatosas se encuentran las células endoteliales sinusoidales, los macrófagos o células de Kupffer, las células estelares y los linfocitos residentes del tejido hepático.

La pared sinusoidal está constituida por las células endoteliales; es discontinua y carece de lámina basal, por lo que solo los elementos figurados de la sangre y las partículas grandes, como los quilomicrones, son detenidos. Las células de Kupffer, además de fagocitar eritrocitos desgastados, eliminan bacterias y virus transportados por la sangre. Liberan citocinas y factores de crecimiento como la Interleucina-1 (Il-1) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Se originan de monocitos que llegan al hígado por el torrente sanguíneo y son responsables en gran parte de la protección inmunológica del órgano.

Las células estelares (también denominadas células de Ito, lipocitos o células persinusoidales) se ubican alrededor del sinusoides y poseen prolongaciones citoplasmáticas con gran contenido de filamentos de actina (Geneser, 2015). De forma normal se encuentran quiescentes, almacenan lípidos y vitamina A; y tienen efecto regulador sobre el flujo sanguíneo a través de los sinusoides. Al activarse por diferentes patologías, cambian su morfología e inician la síntesis de componentes de la matriz extracelular que pueden conducir a fibrosis (Bogdanosa *et al.*, 2013).

Las células progenitoras hepáticas o células ovals, se localizan en los conductillos biliares intrahepáticos (canales de Hering). Por señalización de la matriz extracelular en caso de algún daño hepático, pueden diferenciarse a hepatocitos o colangiocitos (Katoonizadeh *et al.*, 2014). Por último, se encuentran los linfocitos residentes del tejido hepático, los cuales son las células dendríticas; los linfocitos B y T; y las células de Pit. Las células de Pit son linfocitos granulares ubicados en el sinusoides y funcionan de manera similar a las células NK y NK-T del sistema inmune (Bogdanosa *et al.*, 2013).

El hígado tiene importantes funciones de depósito. Acumula glucosa como glucógeno, por lo que participa en la regulación de la glucemia. También almacena vitamina A, vitamina B12, ácido fólico y hierro. Además, es el sitio de síntesis de varias proteínas plasmáticas, por ejemplo, albúmina, varias globulinas, protrombina y fibrinógeno. Interviene en el metabolismo y el transporte de lípidos, participa en la síntesis de algunas lipoproteínas plasmáticas y en el metabolismo de las hormonas esteroideas. Su función exocrina es la producción de bilis, que se almacena y concentra en la vesícula biliar; y participa en la digestión y absorción de grasas (Geneser, 2015).

## **2.10 Regeneración hepática**

El hígado adulto tiene la capacidad de regenerarse después de una lesión o pérdida de su masa. Esta característica ha hecho que se convierta en un modelo útil para estudiar la regeneración tisular y el crecimiento controlado. Una característica importante de la regeneración del hígado es que en lugar de utilizar células progenitoras o células madre, la repoblación del hígado se produce casi exclusivamente a través de la proliferación de células maduras, es decir, hepatocitos, células epiteliales biliares, células endoteliales, y células estrelladas (Kuijk *et al.*, 2016). Una vez que la magnitud del daño ha comprometido la proliferación de los hepatocitos, como en el caso de las enfermedades crónicas, las células progenitoras hepáticas u ovales se activan y funcionan como una reserva de células madre, las cuales tienen el potencial de proliferar, producir múltiples linajes celulares y repoblar el hígado (Oertel y Shafritz, 2008). Dicha regeneración se produce sin pérdida de las funciones necesarias para la homeostasis del organismo y se puede activar sin causar

inflamación o daño a los tejidos circundantes. En los casos de pérdida prolongada y constante de hepatocitos, una vez agotada la proliferación compensatoria, se forma tejido conectivo que conduce a fibrosis, que a su vez conduce a cirrosis hepática (Geneser, 2015).

Actualmente se sabe que la regeneración es capaz de restaurar el peso total del hígado al cabo de pocas semanas, después de una resección quirúrgica de hasta el 75% del tejido hepático. Esto se debe a que los hepatocitos realizan expansión clonal y poseen la capacidad casi ilimitada para proliferar *in vivo*, puesto que no sufren diferenciación terminal y pueden dividirse de forma continua bajo estímulos apropiados. La síntesis de ADN inducida por proliferación celular en los hepatocitos se produce alrededor de las 24 horas post cirugía en modelos de hepatectomía parcial (HP) en la rata y aproximadamente a las 36 horas en los ratones (Michalopoulos y De Frances, 1997), dicha síntesis avanza desde la zona periportal hacia la zona pericentral (Rabes, 1997).

Modelos experimentales como la HP han demostrado que 30 minutos después de la resección quirúrgica, se observa la inducción de genes tempranos, incluyendo la familia jun, c-fos y myc, así como, la transcripción de genes importantes para la regulación de la entrada al ciclo celular y marcadores de desarrollo temprano como la alfa-fetoproteína. Genes que participa activamente en el ciclo celular regulando puntos claves para el inicio de la proliferación, por ejemplo, Ciclina D1 (Patil *et al.*, 2009), se expresan a las 6 horas después de la HP. Otro factor clave en la expresión de Ciclina D1 y en la proliferación celular es  $\beta$ -catenina, que realiza también un importante papel en la regeneración hepática (Nelsen *et al.*, 2001). Durante la regeneración del hígado, el estado

basal de  $\beta$ -catenina cambia dramáticamente, llegando a aumentar hasta 2.5 veces durante los primeros minutos de la regeneración inducida por HP, esto debido a disminución en su degradación y no a cambios en su expresión génica. Además, este aumento inicial de  $\beta$ -catenina es contrarrestado inmediatamente por una regulación negativa de la vía y la activación del complejo de destrucción, lo que limita cualquier elevación sostenida. Algunos estudios han demostrado que la activación de  $\beta$ -catenina después de la HP es transitoria, y los niveles de proteína vuelven a la normalidad después de 48 horas. El aumento de la localización nuclear de  $\beta$ -catenina durante las primeras etapas de la regeneración hepática contribuye al aumento de la expresión de Ciclina-D1 y C-myc (He *et al.*, 1998).

## **2.11 Modelos de inducción de estrés oxidativo**

La participación del estrés oxidativo como mediador no sólo de procesos celulares normales, sino también de alteraciones en respuesta a diferentes agentes tanto endógenos como exógenos, plantea la necesidad de comprender los procesos tempranos y las vías de señalización implicadas en su desarrollo. La alteración de vías de señalización que participan en la proliferación y muerte celular ha sido asociada con la aparición de procesos neoplásicos, tal es el caso del CHC, fenómeno fuertemente vinculado con el estrés oxidativo (Carr, 2016). Actualmente, se practican protocolos experimentales que simulan el estrés oxidativo que se genera de forma natural bajo condiciones tanto normales como patológicas. Tal es el caso de la inducción de estrés oxidativo por la aplicación de DEN o por la remoción quirúrgica parcial del hígado, conocida como HP. El estrés oxidativo generado por la HP funciona como un

estímulo que participa en la activación de la proliferación celular durante la regeneración hepática, proceso que puede ser considerado no patológico. Por otro lado, la exposición al DEN también estimula la proliferación celular y permite observar el incremento en los niveles de ROS, fenómeno que se observa en el microambiente tumoral (Schiffer *et al.*, 2005). Una vez montado un escenario oxidante es posible determinar la modificación en los perfiles de expresión de una gran variedad de elementos implicados en su metabolismo y vías de señalización. Para montar dichos protocolos se utilizan diversos modelos animales, cuya elección depende del interés principal de la investigación. Entre los más utilizados se encuentran los roedores, debido a que poseen una estructura celular y molecular similar a la del ser humano; en ellos tanto las vías metabólicas como las funciones fisiológicas se ven comprometidas cuando son sometidas a procesos que generan daño a moléculas de importancia biológica, de forma similar a lo ocurrido en el ser humano. Su utilidad como modelo experimental reside en la capacidad de evaluar las alteraciones tempranas asociadas a diversas patologías que no se detectan en las muestras clínicas o que se presentan tardíamente durante la progresión. Además, pueden usarse para modelar interacciones gen-ambiente de forma controlada (Carr, 2016).

### **2.11.1 Modelo de inducción de regeneración hepática**

La HP consiste en la remoción de alrededor del 70% del tejido hepático. Es un modelo bien establecido en roedores que sirve para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la proliferación celular y regeneración hepática, y dispara la activación inmediata de múltiples factores que intervienen en la

regeneración, los cuales pueden ser similares a aquellos que se activan después de inducir un daño tóxico en el hígado (Taub, 1996). Recientemente se ha descrito que durante la regeneración hepática, las ROS inducen la trombospondina-1, una proteína de matriz celular y un gen de respuesta inmediata en las primeras horas post HP, que a su vez activa la vía del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) para inhibir la proliferación de los hepatocitos (Hayashi *et al.*, 2012). Similares investigaciones han establecido que posterior a la HP se induce un incremento significativo de los niveles de ROS (Ueno *et al.*, 2006). Sin embargo, en condiciones adversas, existen moléculas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el TGF- $\beta$ , que estimulan la producción de ROS para inducir la proliferación celular durante el desarrollo de la fibrosis hepática (Adachi *et al.*, 2005; Liu y Gaston, 2010). En este sentido, recientemente se ha descrito un mecanismo por el cual la sobreexpresión de una enzima de la familia de las tiorredoxinas llamada la Nucleorredoxina (Nxn) inhibe la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo, inducida por las ROS (Funato *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina regula mecanismos relacionados con la proliferación celular, así como la expresión de enzimas Citocromo P450 que participan en la producción de ROS (Gerbai-Chaloin *et al.*, 2014). Lo antes mencionado indica que las ROS activan vías de señalización implicadas en la proliferación y muerte celular tanto en condiciones normales como patológicas y que la función de la NXN está determinada por cambios redox generados por las ROS.

### **2.11.2 Modelo de inducción de hepatocarcinogénesis**

La biología propia del hígado, los procesos biológicos implicados en el desarrollo del CHC, los factores etiológicos que desencadenan esta neoplasia y la población de células en riesgo, propician la necesidad de observar y analizar cada una de las etapas de este padecimiento, para lo cual se han desarrollado protocolos experimentales de inducción de estrés oxidativo debido a que es el preámbulo del establecimiento del cáncer. Estos protocolos, mediante la administración de diferentes agentes químicos o sus análogos, logran recrear el microambiente tumoral. Actualmente, se sabe que aunque la etiología y la patogénesis molecular difieren entre roedores y humanos, las alteraciones citogenéticas y ciertos aspectos de la historia natural del CHC son muy similares (Carr, 2016). La cepa de ratón endogámico C57BL/6J y sus derivados, se utilizan ampliamente en la investigación debido a que poseen características como la susceptibilidad relativamente baja a la hepatocarcinogénesis inducida químicamente en comparación con otras cepas. En diversos estudios, al ser sometidos al tratamiento con carcinógenos como el DEN, se puede observar la formación de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el hígado de una manera dosis-dependiente (Kushida et al., 2011).

Se han diseñado una gran variedad de modelos de inducción de cáncer, entre los que se encuentran; 1) modelos de implantación de cáncer principalmente usados en estudios de fármacos antineoplásicos que involucran el sistema inmune (He *et al.*, 2015); 2) modelos virales que recrean un microambiente tumoral similar al generado por una infección viral, sin embargo, poseen limitaciones debido a la inestabilidad propia de los virus y su especificidad hacia los hepatocitos de seres humanos, por ejemplo, el ratón quimérico con

hepatocitos de seres humanos (Bissig *et al.*, 2010); 3) modelos genéticamente modificados que permiten observar el papel específico de los genes y modificaciones de su expresión, por ejemplo, los ratones transgénicos y knockout (He *et al.*, 2015); y los 4) modelos de cáncer inducido por carcinógenos químicos que permiten entender cómo la administración de diferentes agentes químicos o sus análogos contribuyen al desarrollo del cáncer para recrear el microambiente tumoral, desde etapas tempranas y en ocasiones acompañado de procesos característicos como la fibrosis y la cirrosis (Carr, 2016).

Los compuestos que pueden contribuir al desarrollo del cáncer se dividen en dos grupos de acuerdo con su modo de acción y se clasifican como genotóxicos y no genotóxico o epigenéticos. Los agentes genotóxicos inducen daño al ADN mediante mecanismos directos o indirectos; es decir, requieren de un metabolismo previo para ser activados. Entre sus mecanismos de acción se encuentran la alquilación del ADN, el agotamiento de nucleótidos, la formación de aductos u otros procesos que alteren la integridad del ADN o su reparación. Los agentes no genotóxicos no generan daño al ADN, pero interfieren con vías de señalización relacionados con la proliferación y muerte celular, propician la producción de ROS o generan metilación de histonas (Waters y Thomas, 2016). La elección del carcinógeno apropiado depende de los objetivos particulares de la investigación a desarrollar.

Para su estudio, el proceso de carcinogénesis se divide en tres etapas principales: 1) la iniciación, que es la etapa en la que las células individuales sufren alteraciones en su genoma, 2) la promoción, que implica la expansión clonal selectiva de células iniciadas, etapa donde los hepatocitos carecen de

cambios de cariotipos demostrables y son principalmente diploides; y 3) la progresión, que implica la expansión clonal de las células alteradas que expresan el fenotipo maligno, con la aparición de nuevas mutaciones y subclonas. Esta última etapa se caracteriza por la inestabilidad cariotípica y aneuploidía (Holland y Frei, 2003).

Actualmente, se han descrito una variedad de protocolos de inducción de cáncer. Entre los protocolos básicos inicialmente montados en ratas se encuentra el modelo de hepatocitos resistente o modelo de Solt-Farber que permite desarrollar tumores en solo 14 meses y reproduce sincrónicamente las etapas de iniciación, promoción y progresión, pero que tiene la desventaja de no desarrollar fibrogenesis ni cirrosis como ocurre en el ser humano (Macías *et al.*, 2013). El modelo de Schiffer consiste en la administración de una dosis semanal de DEN vía intraperitoneal (i.p.) a 50 mg/kg de peso corporal, hasta por 18 semanas. Este modelo genera un proceso crónico similar al del ser humano. En él, los animales desarrollan inflamación, fibrosis y cirrosis, la cual se puede observar desde la semana 16 (Schiffer *et al.*, 2005). Ambos modelos se generan en un contexto de necrosis extensa y se les han hecho modificaciones con la finalidad de cubrir los requerimientos e intereses de cada investigación.

### **2.11.3 Mecanismo de acción de dietilnitrosamina (DEN)**

La DEN es un carcinógeno genotóxico que actúa como carcinógeno completo, es decir, tiene actividad iniciadora y promotora de la tumorigénesis y además puede inducir el proceso de fibrogénesis. Actúa como agente alquilante del ADN, forma enlaces covalentes con las bases nitrogenadas y como resultado

origina aductos mutagénicos. Además, su bioactivación por parte de la enzima Citocromo P450 implica la producción de ROS (Bakiri y Wagner, 2013). Actualmente, se sabe que los tumores inducidos por la administración solo de DEN poseen una alta frecuencia de mutaciones del codón 61 del oncogén *Ha-RAS*, cuya participación en el cáncer del ser humano es ampliamente conocida (McCreery y Balmain, 2017). Tras la administración de DEN, se ha observado también la formación de focos de hepatocitos alterados que muestran niveles disminuidos del gen *p53*, y la producción de interleucina 6 por parte de las células de Kupffer (He *et al.*, 2015).

Los miembros de la familia del Citocromo P450 están asociados con la generación de ROS causada por el metabolismo de compuestos tóxicos. El Cyp2e1 es una de las principales enzimas involucradas en las biotransformación metabólica de DEN (Verna *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2011). El metabolismo ocurre durante las primeras horas posteriores a la administración, donde el DEN es hidroxilado mediante monooxigenasas P450 dependientes y forma etilcarbonio, compuesto que es altamente reactivo con el ADN y otras biomoléculas, o bien mediante un segundo proceso de biotransformación por la N-acetiltransferasa u O-acetiltransferasa, que también dan como resultado un compuesto muy reactivo (Salcido *et al.*, 2009).

## **2.12 Nucleorreductasa (Nxn)**

La Nxn es un integrante relativamente desconocido de la familia de las tiorreductas, familia de proteínas que está involucrada en varios procesos fisiológicos; entre ellos, la regulación de la respuesta al estrés oxidativo. La Nxn fue llamada así debido a que fue localizada inicialmente en el núcleo celular,

más tarde se determinó que se localiza principalmente en el citoplasma y que es translocada al núcleo en respuesta al estrés oxidativo debido a que responde a los cambios óxido-reducción (redox) que ocurren en las células. Múltiples evidencias indican que la Nxn puede participar en la regulación de una gran variedad de fenómenos biológicos, por ejemplo, las vías de señalización relacionadas con la morfogénesis primaria y el mantenimiento de las células madre, donde regula las reacciones redox (Funato y Miki, 2007). En este sentido, la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, participa en el control del desarrollo temprano, la proliferación y el destino celular, y su activación depende de la presencia de ROS. La alteración de esta vía ha sido relacionada con procesos tumorales (Ochoa *et al.*, 2012). En esta vía, Wnt se acopla a su receptor Frizzled (Fzd), que transmite la señal a la proteína adaptadora Dishevelled (Dvl). Las ROS pueden disociar el complejo Nxn/Dvl a través de la oxidación de Nxn, entonces Dvl puede ahora inhibir al complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina; que está compuesto por Axina, las enzimas caseína cinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) y el glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), dando como resultado la acumulación citosólica de  $\beta$ -catenina. Este proceso inhibe la fosforilación de  $\beta$ -catenina y por lo tanto su degradación por la vía ubiquitina/proteasoma. La acumulación de  $\beta$ -catenina genera su translocación al núcleo y la activación de diversos factores de transcripción que participan en la proliferación celular (Figura 11). Contrario a esto, la fosforilación de  $\beta$ -catenina en el citosol impide su acumulación; así, si el nivel de la proteína es muy bajo, ésta no se transloca al núcleo (Funato *et al.*, 2006). Por tanto, se cree que Nxn regula negativamente la vía Wnt/ $\beta$ -catenina a nivel de Dvl. Es posible que Nxn altere el estado de fosforilación de Dvl mediante la modulación de la función de

algunas quinasas y fosfatasas. Se sabe también que Nxn compite frecuentemente con la unión de Dvl a través del bloqueo del dominio PDZ-básico de DVL (Funato y Miki, 2007).



**Figura 11. Diagrama esquemático de la regulación redox del complejo Nxn/Dvl sobre la vía de señalización Wnt/β-catenina.** En el estado estable, Nxn se encuentra reducida y fuertemente unida a Dvl. En un ambiente oxidativo las ROS oxidan a Nxn y provoca la disociación de Dvl; Dvl ahora libre puede inhibir al complejo inhibidor de la vía Wnt/β-catenina, lo que resulta en su activación. Modificado de: Funato y Miki, 2007.

Recientemente se ha descubierto que Dvl actúa como un adaptador de doble función debido a que su interacción con la ligasa transmembranal E3 ZNRF3/RNF4 produce ubiquitinización y degradación de los receptores Wnt; esto trae como consecuencia la regulación negativa de la vía Wnt/β-catenina como parte de un control estricto (Jiang *et al.*, 2015).

Otra interacción interesante es la que realiza Nxn con Flightless-I (Flii), la cual es reclutada hacia la proteína conocida como gen primario de diferenciación mieloide-88 (Myd88) para formar un complejo que media la regulación negativa de la vía de señalización del receptor tipo toll 4 (TLR4)/Myd88, la cual activa al factor de transcripción NF-κβ, que se encarga de la transcripción del ADN,

participa en la inmunidad innata y la inflamación; y la alteración en su regulación se relaciona con procesos neoplásicos, enfermedades autoinmunes e infecciosas (Hayashi *et al.*, 2010). Entre las actividades de Flii se encuentra también la remodelación del citoesqueleto de actina, la regulación negativa de la apoptosis y la mejora de la invasión de las células tumorales, lo que se demostró con la disminución de caspasa I y anexina V en tumores que sobreexpresan Flii, por lo cual se ha identificado como un promotor tumoral (Kopecki *et al.*, 2015). Es importante mencionar que Nxn también interactúa con la proteína fosfatasa-2A (PP2A), una enzima que remueve los grupos fosfato a los aminoácidos serina y treonina; esta enzima está implicada en los procesos de replicación del ADN, transcripción, traducción y diferenciación celular (Lechward *et al.*, 2006). Actualmente, se sabe que Nxn interactúa con la proteína Sec63, localizada en la membrana del retículo endoplásmico, cuya actividad se especula puede estar relacionada con el transporte de proteínas al interior del retículo. La mutación del gen *Sec63* y *PRKCSH* se observa en la enfermedad poliquística del hígado (Müller *et al.*, 2011). Además, Nxn interactúa con la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), principal enzima glicolítica, y cuya alteración está implicada en la reprogramación metabólica del cáncer (Funato *et al.*, 2013). Sin embargo, recientes investigaciones sugieren que algunas de las interacciones de Nxn con otras proteínas, por ejemplo PFK-1, podrían ser no redox-dependientes (Nakao *et al.*, 2015).

En resumen, Nxn regula vías de señalización que participan en el desarrollo, la proliferación y diferenciación celular, así como en procesos de replicación, transcripción y traducción del ADN, en el metabolismo de la glucosa, procesos de inflamación, regeneración de tejidos, y probablemente en la tumorigénesis.

Su función está determinada por cambios redox generados por las ROS y éstas a su vez activan vías de señalización implicadas en la proliferación celular tanto en condiciones normales como patológicas. Sin embargo, aún se desconoce el papel dinámico de la Nxn durante la proliferación celular inducida por la regeneración hepática y durante la inducción de la hepatocarcinogénesis experimental. Lo anterior resalta la importancia de contribuir en la generación de conocimientos a través de una descripción más detallada del papel que desempeñan la Nxn y algunos de sus componentes de señalización en la regeneración hepática y en la hepatocarcinogénesis. En consecuencia, definir la respuesta que Nxn tiene durante la progresión de procesos normales y patológicos permitirá plantear la posibilidad de que la manipulación de la expresión de Nxn pueda ser de utilidad clínica, ya sea para acelerar o inhibir la proliferación hepática.

### **3. HIPÓTESIS**

Con base en lo anterior, proponemos que la Nxn responde a los estímulos oxidantes promovidos por la regeneración hepática y por la hepatocarcinogénesis y juega un papel determinante en su regulación; lo anterior se debe a que Nxn interactúa con vías de señalización que participan en la proliferación y el destino celular.

Las bases que sustentan dicha hipótesis son que las fluctuaciones de ROS que se efectúan en el microambiente celular, modulan la interacción/separación de Nxn y que dicha producción de ROS se eleva durante la regeneración hepática inducida por la HP y durante las primeras horas posteriores a la administración de DEN.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general:

Determinar la respuesta que Nxn tiene en los procesos de proliferación celular *in vivo*, inducido de manera experimental por estímulos oxidantes en un contexto no patológico, durante la regeneración hepática, y en uno patológico, durante el proceso de hepatocarcinogénesis.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Verificar la funcionalidad tanto del modelo de hepatocarcinogénesis como del modelo de regeneración hepática experimental.
- Determinar si la administración crónica de DEN y la HP en ratones de la cepa C57BL/6J induce cambios en la expresión de Nxn.
- Definir la temporalidad en que Nxn desempeña un papel central durante el proceso de regeneración hepática y de hepatocarcinogénesis experimental.
- Evaluar los niveles de expresión de algunas de las proteínas que interactúan con Nxn así como de sus efectores de señalización.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para determinar el efecto que ejercen los estímulos oxidantes sobre la expresión de la Nxn y de algunas proteínas con las que interactúa, así como su correspondiente efecto antiproliferativo, grupos de ratones fueron sometidos a diferentes protocolos de inducción de estrés oxidativo, es decir, a una cinética de administración de DEN y a HP; esto con el fin de inducir la producción de ROS por el metabolismo del carcinógeno DEN administrado a diferentes dosis, y por el estímulo proliferativo generado por la regeneración hepática que se observa a diferentes días de eutanasia post HP. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con los reglamentos propuestos por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, tomando en cuenta las especificaciones de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 correspondiente a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Se realizó una evaluación constante de los signos clínicos que nos permitieron determinar el punto final humanitario (humane end-point) establecido por el Consejo Canadiense de Cuidado de los Animales (Canadian Council on Animal Care). Brevemente, los criterios del punto final humanitario establecen que los animales de experimentación deben ser retirados en el momento en que presenten signos característicos del deterioro de su bienestar, sufrimiento excesivo e injustificado, o incompatibilidad con la vida, que puedan alejarnos a su vez del objetivo principal de la investigación. En este sentido y con base en resultados previos donde determinaron la dosis letal 50 (DL50) del carcinógeno

DEN en ratones, encontraron que los signos clínicos de enfermedad y deterioro de su calidad de vida se manifestaron a una dosis de 132 mg/kg de peso corporal (Simmon *et al.*, 1979); para evitar esto, los ratones fueron administrados con dosis muy por debajo de la antes mencionada (entre 2.5 y 40 mg/kg de peso corporal).

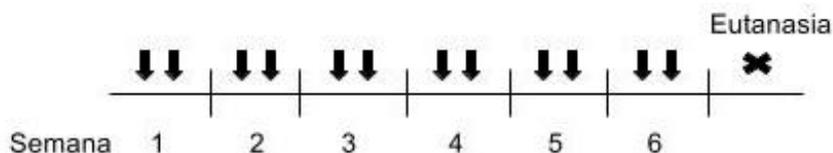
Los ratones fueron proporcionados por la Unidad Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN para ser utilizados exclusivamente de acuerdo al protocolo experimental número 0114-14, autorizado después de una rigurosa evaluación realizada por el comité de ética institucional. Se utilizaron ratones machos de 20 a 25 g de peso corporal de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron aclimatados y alimentados *ad libitum* en un ambiente controlado de 12 horas luz/oscuridad y una temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

## **5.1 Modelos de inducción de estrés oxidativo**

### **5.1.1 Modelo de inducción de hepatocarcinogénesis**

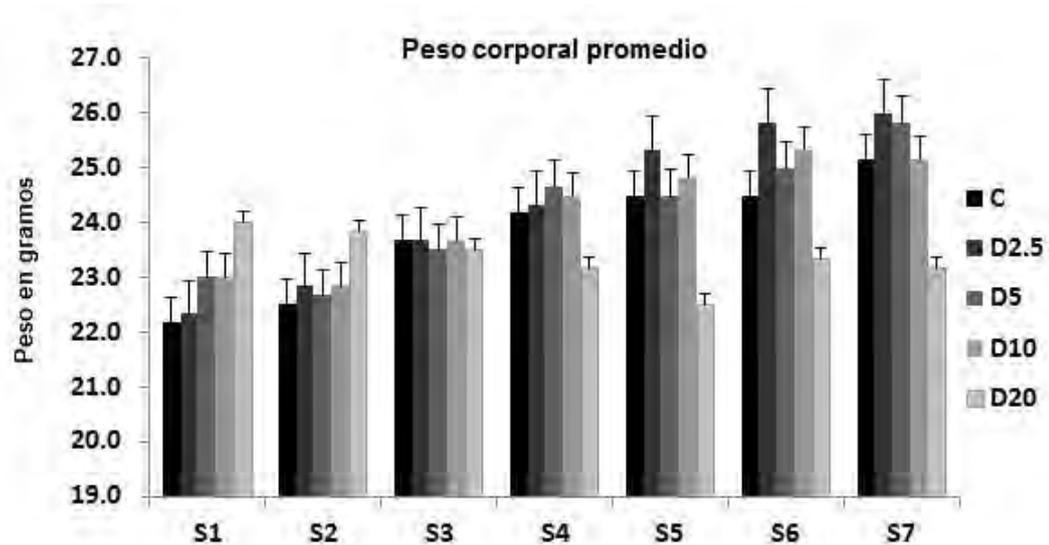
Para la cinética de administración de DEN se utilizaron 36 ratones de 6 semanas de edad y 20 a 25 g de peso corporal aproximadamente, que fueron sometidos a un esquema similar al que propone el modelo de Schiffer, el cual consiste en administrar una dosis intraperitoneal (i.p.) semanal de 50 mg/kg de peso corporal, hasta por 18 semanas (Schiffer *et al.*, 2005). Se realizó una modificación al protocolo antes mencionado y se administraron 2 dosis semanales vía i.p., por 8 semanas, a diferentes concentraciones de DEN (2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg, dosis que están muy por debajo de la DL50), en un volumen correspondiente al peso corporal (Figura 12). Los ratones fueron

divididos en 6 grupos, correspondientes a las diferentes dosis, incluyendo un grupo control el cual no recibió ningún tratamiento. Concluido el tratamiento los ratones fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico para recuperar el órgano de interés, empleando anestesia inhalada con isoflurano. Finalizado el procedimiento los ratones fueron sometidos a eutanasia.



**Figura 12. Régimen de administración del modelo de hepatocarcinogénesis.** Esquemización del régimen de administración de DEN a diferentes dosis; 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg de peso corporal, dos veces a la semana, los días lunes y jueves, durante 6 semanas. A los grupos control se les practicó la eutanasia a las 6 semanas.

Se realizó un registro del peso de cada uno de los ratones, acorde con los días de administración de cada uno de los tratamientos (Figura 13). Observamos que la dosis de 20 mg/kg (D20) de peso corporal disminuyó el peso de los animales al término del protocolo experimental (S7); sin embargo, ésta disminución no fue estadísticamente significativa respecto de la semana inicial (S1). También se registró el peso del hígado de cada ratón al momento de la eutanasia, el cual tuvo un comportamiento similar al de los pesos corporales (Figura 14).



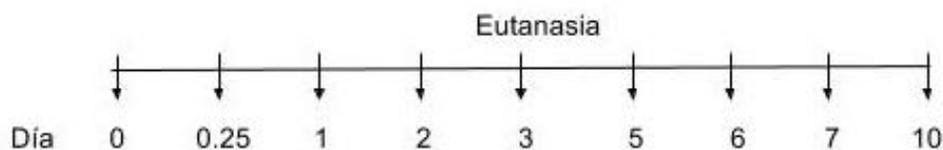
**Figura 13. Peso corporal de los ratones sometidos al modelo de hepatocarcinogénesis.** Los ratones sometidos al tratamiento con DEN fueron pesados dos veces por semana, previo a la administración del carcinógeno. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE (Error Estándar) de los pesos corporales en gramos. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales. C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg, S: Semana.



**Figura 14. Porcentaje del peso relativo de los hígados.** El peso relativo de los hígados recuperados durante la eutanasia de ratones sometidos al tratamiento con DEN fue calculado con base al peso corporal de los animales. Las barras representan el porcentaje de los pesos corporales en gramos. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales. C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

### 5.1.2 Modelo de inducción de regeneración hepática

Para la HP, se utilizaron 60 ratones machos de 12 semanas de edad y 20 a 25 g de peso corporal aproximadamente. Al inicio de los experimentos, los ratones fueron divididos en 10 grupos, sometidos a HP por laparotomía bajo anestesia con isoflurano utilizando un sistema de anestesia inhalada, a una dosis de 2-3% para inducción en cámara y de 0.25-2% para mantenimiento con mascarilla de inhalación. Al respecto, las dosis utilizadas del isoflurano tanto para la inducción como para el mantenimiento de la anestesia fueron administradas con base en las dosis recomendadas para dichas finalidades por la revista científica del Institute of Laboratory Animal Resources (Gargiulo *et al.*, 2012). Se realizó una resección de aproximadamente 70% del tejido hepático. Posterior a la cirugía, los grupos de ratones fueron sometidos a eutanasia bajo anestesia con Isoflurano en los siguientes tiempos post HP: 6 horas, 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10 días; se consideró un grupo control, el cual no fue sometido a dicho procedimiento (Figura 15).



**Figura 15. Régimen de administración del modelo de regeneración hepática.** Esquematación del régimen de práctica de la eutanasia post HP; 0 horas (grupo control), 6 horas, 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10 días.

Al igual que en el modelo anterior se registró el peso del hígado de cada ratón al momento de la eutanasia (Figura 16). El peso corporal de los animales de todos los grupos se encontró en el intervalo de 20 a 25 g.



**Figura 16. Peso de los hígados post-HP.** Peso de los hígados recuperados durante la eutanasia de ratones sometidos al modelo de regeneración hepática. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de los pesos de cada hígado en gramos. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales. 1: Control, 2: HP a las 6 horas, 3: HP a un día, 4: HP a los 2 días, 5: HP a los 3 días, 6: HP a los 5 días, 7: HP a los 6 días, 8: HP a los 7 días, 9: HP a los 10 días.

### 5.1.3 Manejo analgésico

El manejo analgésico preoperatorio no se realizó debido a la naturaleza de la investigación; es decir, el proyecto fue diseñado para evaluar el efecto de las ROS generadas por el estímulo oxidativo, reproducido *in vivo* tanto en una condición normal como patológica. En este sentido, en investigaciones previas está ampliamente documentado que algunos de los mecanismos de acción de los analgésicos son la inducción de estrés oxidativo y en consecuencia la inhibición de la proliferación celular (Arellanes *et al.*, 2006; Ettarh *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2016). Por lo tanto, al administrar algún analgésico en los animales ya sea en un esquema pre o postoperatorio, éste interferiría sobre fenómenos moleculares como el estrés oxidativo y la proliferación

celular, los cuales son fenómenos centrales de evaluación en nuestros objetivos planteados. Adicionalmente, durante la recuperación postoperatoria, los ratones sometidos a la HP estuvieron bajo supervisión estricta por médicos veterinarios certificados del CINVESTAV. Cabe mencionar que gracias a investigaciones previas realizadas, la hepatectomía parcial es un procedimiento de rutina perfectamente estandarizado que se realiza en un tiempo no mayor a 6 minutos por ratón; de esta forma, minimizamos en todo lo posible el sufrimiento del animal. Así mismo, no se administraron analgésicos a los ratones tratados con DEN debido a la razón descrita para la HP. Durante la eutanasia bajo anestesia con isoflurano se realizó la extirpación total del hígado y la recolección de la sangre total, prácticas que son incompatibles con la vida. Finalmente, todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la institución y se realizaron de acuerdo a Guías para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NRC, 2011).

#### **5.1.4 Metodología para la eutanasia**

La eutanasia se realizó por exanguinación bajo anestesia con isoflurano como previamente fue descrito en el protocolo original, en el laboratorio 50 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. La exanguinación se realizó por punción cardíaca con una aguja para insulina estéril de media pulgada de longitud.

### **5.1.5 Obtención de las muestras**

Durante la eutanasia el tejido hepático recuperado fue conservado en formaldehído al 4% para la realización de la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y para pruebas de inmunohistoquímica (IHQ); y en congelación directa en nitrógeno líquido para western blot (WB).

### **5.1.6 Procesamiento de las muestras**

Las muestras fueron analizadas para determinar los niveles de expresión de proteínas totales. Los parámetros fueron evaluados con la tinción de H&E, WB e IHQ. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de las proteínas que interactúan con Nxn y algunas de los componentes de señalización. En todos los casos, los anticuerpos y reactivos requeridos en esta investigación fueron adquiridos de casas comerciales disponibles en el mercado con recursos obtenidos a través proyectos institucionales, los animales fueron obtenidos a través del proyecto: número 0114-14 “La nucleorredoxina, una proteína redox sensible, regula la proliferación celular durante la regeneración hepática inducida por la hepatectomía parcial en el ratón”, aprobado por el UPEAL-CINVESTAV.

## **5.2 Determinación de proteína total por Western Blot**

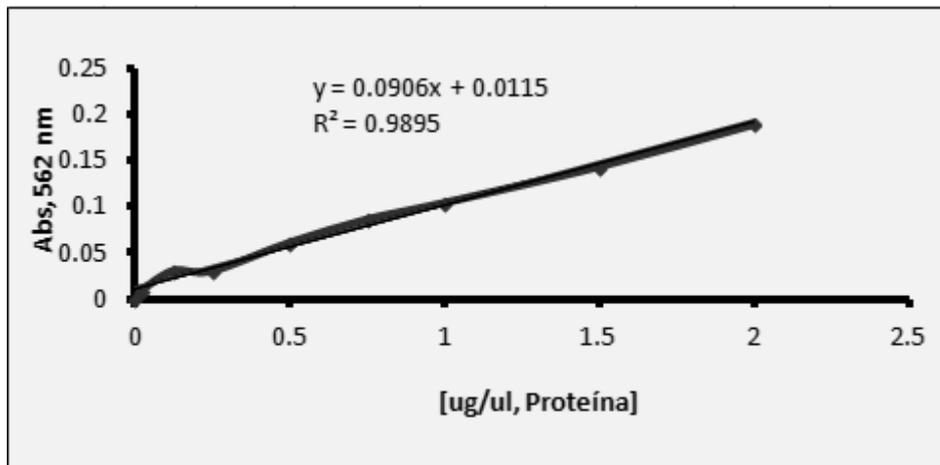
### **5.2.1 Extracción de proteína**

Se homogeneizaron 50 mg del tejido en un homogeneizador GLAS-COL 099C K64, con 0.5 ml de buffer de lisis no desnaturizante (Tris-HCl 20 mM, pH 7.8, NaCl 137 mM, 10% de glicerol, 1% Nonidet P40, EDTA 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas “Protease inhibitor Cocktail mammalian” de amresco dilución 1:15). El homogeneizado se mantuvo en agitación en una plataforma oscilante GyroMini Nutating Mixer de Labnet, durante 20 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó en una microcentrífuga Heraeus Pico de Thermo Scientific a 3500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf de 1.5 ml, el cual fue centrifugado a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La muestra se volvió a centrifugar para eliminar cualquier residuo de grasa que pudiera quedar y se realizó la cuantificación de proteínas de acuerdo al protocolo de ácido bicinconínico (ABC) (Anexo 1).

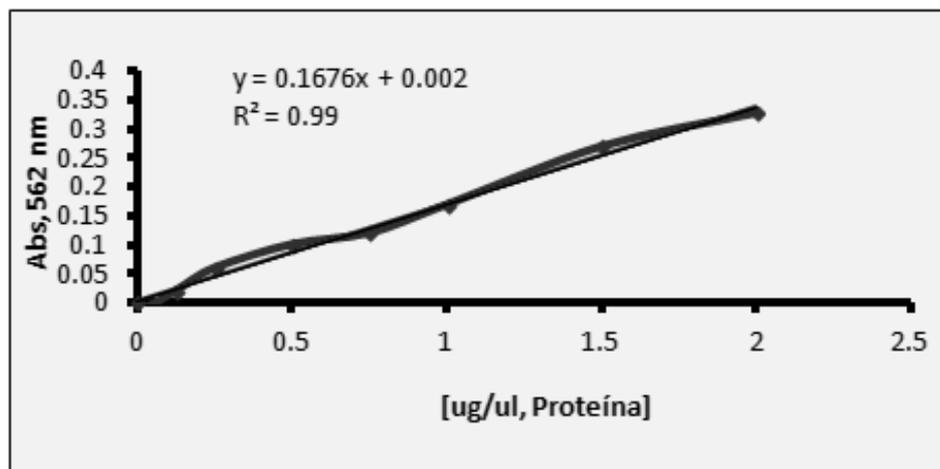
### **5.2.2 Cuantificación de proteína**

Las muestras correspondientes a cada una de las dosis del carcinógeno DEN y a cada uno de los tiempos de eutanasia post-HP, fueron diluidas en una proporción 1:15 (28 µl de Buffer de lisis + 2 µl de muestra tratada). La curva estándar de calibración se realizó a partir de diluciones seriadas partiendo de una concentración inicial de albúmina de suero bovino (ASB) de 2 µg/µl, compuesta por 9 puntos, identificados de la A a la I (Figuras 17 y 18). En tubos eppendorf de 0.6 ml se realizó una mezcla de 50 µl de cada uno de los elementos tanto de las muestras como de la curva estándar, más 200 µl de una

mezcla de ABC y sulfato de cobre (Relación 50:1). Dicha mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se colocó por duplicado 115 µl de cada uno de los elementos. La lectura se realizó a 562 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch de BioTek.



**Figura 17. Curva estándar para la cuantificación de proteínas del modelo de administración de DEN.** La gráfica muestra los valores de las absorbancias por concentración estándar de la ASB presentes en microgramos.



**Figura 18. Curva estándar para la cuantificación de proteínas del modelo de HP.** La gráfica muestra los valores de las absorbancias por concentración estándar de la ASB presentes en microgramos.

Posterior a la cuantificación se colocó a cada una de las muestras 25  $\mu$ l de buffer de carga 1x Laemmli (Para preparar el stock 4x mezclar: 2.4 ml de Tris 1M pH 6.8, 0.8 g de dodecilsulfato sódico (SDS), 4 ml de glicerol 100%, 0.1% de azul de bromofenol 0.01%, 2.8 ml de agua y 1 ml  $\beta$ -mercaptoetanol agregado hasta el final), y se calentaron en un thermoblock Thermo Stat Plus a 95°C por 10 minutos. Inmediatamente después las muestras fueron colocadas en hielo y almacenadas a -70°C para su posterior análisis.

### **5.2.3 Análisis por Western blot desnaturalizante (SDS page)**

Brevemente, el análisis por WB es una técnica que se emplea para el análisis de proteínas específicas dentro de una muestra biológica. La técnica se fundamenta en que todas las proteínas presentan una carga eléctrica neta cuando se encuentran en una solución con un pH diferente al de su punto isoeléctrico, de esta forma al ser sometidas a un campo eléctrico, éstas se desplazan hacia un polo y se distribuyen de acuerdo a su tamaño. Posteriormente las proteínas son transferidas a membranas de PVDF y su detección específica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés (De la Fuente *et al.*, 2007).

### **5.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, empleando el sistema MiniProtean de BioRad para geles de 1.5 mm con 10 pozos. Para 10 ml del gel separador al 10% se mezclaron 4.0 ml de agua, 3.3 ml de acrilamida mix 30%, 2.5 ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 0.1 ml de SDS al 10%, 0.1 ml de

persulfato de amonio (APS) al 10% y 0.004 ml de TEMED. Para 5 ml del gel concentrador al 5% se mezclaron 3.4 ml de agua, 0.83 ml de acrilamida mix 30%, 0.63 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 0.05 ml de SDS al 10%, 0.05 ml APS al 10% y 0.005  $\mu$ l de TEMED. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína en cada pozo, con un volumen correspondiente según los valores de la cuantificación previamente realizada (Anexos 2 y 3). Se empleó el marcador de peso molecular PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 5  $\mu$ l en el primer pozo. El corrimiento electroforético se realizó en cámara Mini Protean Tertragel BioRad con una fuente de poder PowerPac HC, inicialmente a 70 V, una vez observado el frente de corrida en el gel separador se cambió a 120 V, la corrida se detuvo a las 2 horas aproximadamente. Se utilizó buffer de corrida (BC) 1x a partir de un stock 10x (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 30 g de Tris base, 144 g de Glicina y 10 g de SDS), para llevar el BC a 1x se mezclaron 100 ml del stock y 900 ml de agua destilada. Una vez concluida la electroforesis los geles fueron transferidos siguiendo el protocolo preestablecido (Towbin *et al.*, 1979).

### **5.2.5 Transferencia de proteínas a membrana**

Los geles resultantes de la electroforesis fueron transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activadas en metanol durante 2 minutos, se realizó el ensamblaje de los cassettes de transferencia siguiendo el orden correspondiente (Ánodo - esponja - filtro - membrana - gel - filtro - esponja - cátodo), sumergidos en buffer de transferencia (BT) 1x a partir de un stock 10x (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 30.2 g de Tris base y 144.2 g de Glicina), para llevar el BT a 1x se mezcló 100 ml del stock,

100 ml de metanol y 800 ml de agua destilada. La transferencia se realizó en un sistema húmedo de electrotransferencia Mini Trans-Blot Cell BioRad, con una fuente de poder PowerPac HC, a 0.25 A (250 mA) durante 2.5 horas. Concluida la transferencia las membranas fueron bloqueadas en una solución de TBST 1x y leche al 5%. El TBST 1x se preparó a partir de un stock 10x (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 24.23 g de Trizma HCl y 80.06 g de NaCl), para llevar el TBST a 1x se mezclaron 100 ml del stock, 899 ml de agua destilada y 1 ml de Tween 20. El bloqueo de las membranas se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Terminado el bloqueo se realizaron 3 lavados en TBST 1x, cada uno de 5 minutos.

### **5.2.6 Inmunodetección en membrana de las proteínas de interés**

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario, durante una noche a 4°C, en agitación constante. El anticuerpo primario se diluyó según la dilución correspondiente, en una solución de TBST 1x y 5% de leche (Tabla 2). Concluida la incubación el anticuerpo primario fue retirado, y las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos en TBST 1x. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario. Para la normalización de la expresión génica se utilizó como control de carga a la proteína constitutiva (Housekeeping) Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh). Esta proteína se expresa principalmente en núcleo donde participa en la transcripción, el transporte del ARN, la replicación del ADN y la apoptosis, además de ser una enzima clave en la glucólisis ( Lin y Redies, 2012).

**Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios**

| <b>Anticuerpo</b>                  | <b>Pm (KDa)</b> | <b>Especie</b> | <b>Dilución</b> | <b>Empresa</b>    | <b>No catalogo</b> |
|------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| <b><math>\beta</math>-catenina</b> | 92              | Mouse          | 1:500           | Cell Signaling T. | 2698               |
| <b>Ciclina D1</b>                  | 37              | Rabbit         | 1:1000          | Santa Cruz B.     | SC-753             |
| <b>Cyp2e1</b>                      | 50 – 55         | Rabbit         | 1:500           | Abcam             | ab28146            |
| <b>Flii</b>                        | 145             | Mouse          | 1:100           | Santa Cruz B.     | SC-21716           |
| <b>Gapdh</b>                       | 37              | Mouse          | 1:500           | Santa Cruz B.     | SC-51905           |
| <b>Gstp1</b>                       | 23 – 24         | Rabbit         | 1:2000          | Sigma Aldrich     | SAB3500265         |
| <b>Myd88</b>                       | 33              | Mouse          | 1:500           | Santa Cruz B.     | SC-74532           |
| <b>Nxn</b>                         | 48              | Rabbit         | 1:4000          | Gene Tex          | GTX107039          |
| <b>Pcna</b>                        | 29              | Mouse          | 1:1000          | Thermo Fisher     | 13-3900            |

La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora, a temperatura ambiente y agitación constante. De acuerdo a cada anticuerpo primario, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), el cual fue diluido en una solución de TBST 1x y 5% de leche (Tabla 3). Una vez terminada la incubación se retiró el anticuerpo secundario, y las membranas fueron lavadas 3 veces, por 5 minutos con TBST 1x. Por último, para determinar la presencia de la proteína de acuerdo al peso molecular conocido, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con el Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate de MILLIPORE, en un fotodocumentador mini HG9 de Uvitec Cambridge, método que consiste en la emisión de luz del sustrato luminol al oxidarse en presencia de peróxido de hidrógeno y HRP. Las imágenes fueron obtenidas a tiempos de exposición de 5 segundos a 5 minutos (Mahmood y Yang, 2012).

**Tabla 3. Características de los anticuerpos secundarios**

| <b>Anticuerpo</b>  | <b>Dilución</b> | <b>Empresa</b> | <b>No catalogo</b> |
|--------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| <b>Anti- Mouse</b> | 1:10000         | Jackson        | 315-035-003        |
| <b>Anti-Rabbit</b> | 1:10000         | Jackson        | 111-035- 003       |

### **5.2.7 Análisis densitométrico**

Las cuantificaciones de las imágenes correspondientes a las muestras de ambos modelos fueron analizadas por densitometría con el software para procesamiento de imágenes Imagen J, del National Institutes of Health, versión 1.50.

### **5.2.8 Análisis estadístico**

Se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) para comparaciones múltiples ó la prueba *t* de Student para comparar sólo dos grupos. Los experimentos en ratones fueron realizados en grupos de 6 ratones para el modelo de hepatocarcinogénesis y de 10 para el modelo de proliferación celular. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

### **5.3 Determinación de la localización estructural de las proteínas por análisis de inmunohistoquímica**

Para la IHQ se realizaron cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$ , de cada uno de los hígados de ratón, colocados juntos en un portaobjetos según el tratamiento administrado, es decir; en un mismo portaobjetos todos los controles de DEN, en otro todos los de DEN a 5 mg/Kg, etc., así con cada uno de los modelos experimentales. La IHQ se llevó a cabo según el protocolo preestablecido. Después de ser desparafinados los tejidos fueron colocados en buffer de exposición de antígeno Tris-EDTA pH 9.0 (Para preparar 1 litro de solución stock se mezclaron 1.21 g de Tris base, 0.37 g de EDTA, y 0.5 ml de Tween 20, posteriormente se ajustó el pH), en baño maría en olla de presión durante 30 minutos. Se dejó enfriar el buffer con los tejidos y se cambió por agua desionizada. Posteriormente, los tejidos se lavaron una vez con TBST 1x, y se realizó el bloqueó de la peroxidasa endógena con el Kit Mouse/Rabbit inmunodetector HRP/DAB de Bio SB, durante 30 minutos, concluido el bloqueo los tejidos se lavaron con TBST 1x. Se realizó un segundo bloqueo con albúmina al 1% diluida en TBST 1x durante 30 minutos, después de esto los tejidos se lavaron una vez más con TBST 1x y se incubaron en cámara húmeda con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBST 1x a 4°C durante toda la noche (Tabla 4).

**Tabla 4. Características de los anticuerpos primarios**

| <b>Anticuerpo</b>                          | <b>Especie</b> | <b>Dilución</b> | <b>Empresa</b> | <b>No catalogo</b> |
|--|----------------|-----------------|----------------|--------------------|
| <b><math>\beta</math>-catenina (H-102)</b> | Rabbit         | 1:100           | Santa Cruz B.  | SC-7199            |
| <b>Gstp1</b>                               | Rabbit         | 1:100           | Sigma Aldrich  | SAB3500265         |
| <b>Ki67 (SP6)</b>                          | Rabbit         | 1:100           | Gene Tex       | GTX16667           |
| <b>Nxn</b>                                 | Rabbit         | 1:100           | Gene Tex       | GTX107039          |
| <b>Pcna (PC10)</b>                         | Mouse          | 1:100           | Thermo Fisher  | 13-3900            |

Concluida la incubación con el anticuerpo primario los tejidos se lavaron con TBST 1x, y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, a temperatura ambiente, durante 30 minutos, se realizó una lavado más con TBST 1x. El revelado se realizó con Buffer DAB-Sustrato más 1½ gota de DAB-Cromógeno del Kit de inmunodetección Bio SB. Los tejidos se observaron al microscopio hasta que la señal apareció (tiempo aproximado de 15 segundos a 5 minutos). Se removió la solución de revelado de los tejidos con agua destilada. Por último los tejidos fueron teñidos con una tinción de H&E y montados.

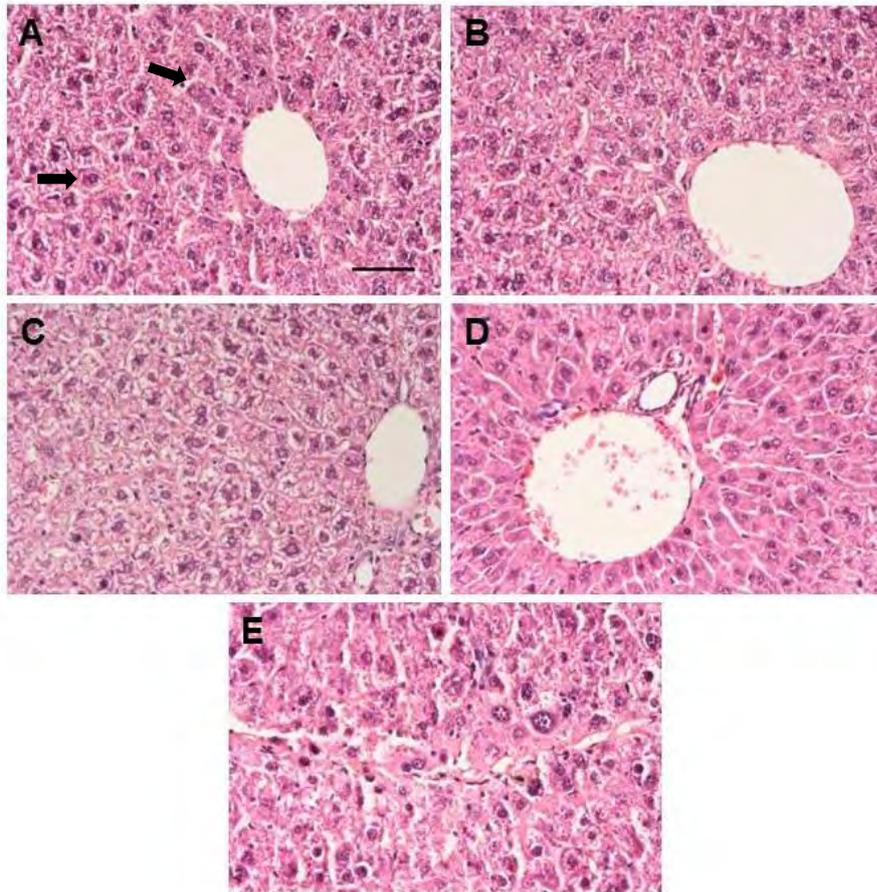
**Tabla 5. Características de los anticuerpos secundarios**

| <b>Anticuerpo</b>  | <b>Dilución</b> | <b>Empresa</b> | <b>No catalogo</b> |
|--------------------|-----------------|----------------|--------------------|
| <b>Anti- Mouse</b> | Prediluido      | Jackson        | 315-035-003        |
| <b>Anti-Rabbit</b> | Prediluido      | Jackson        | 111-035- 003       |

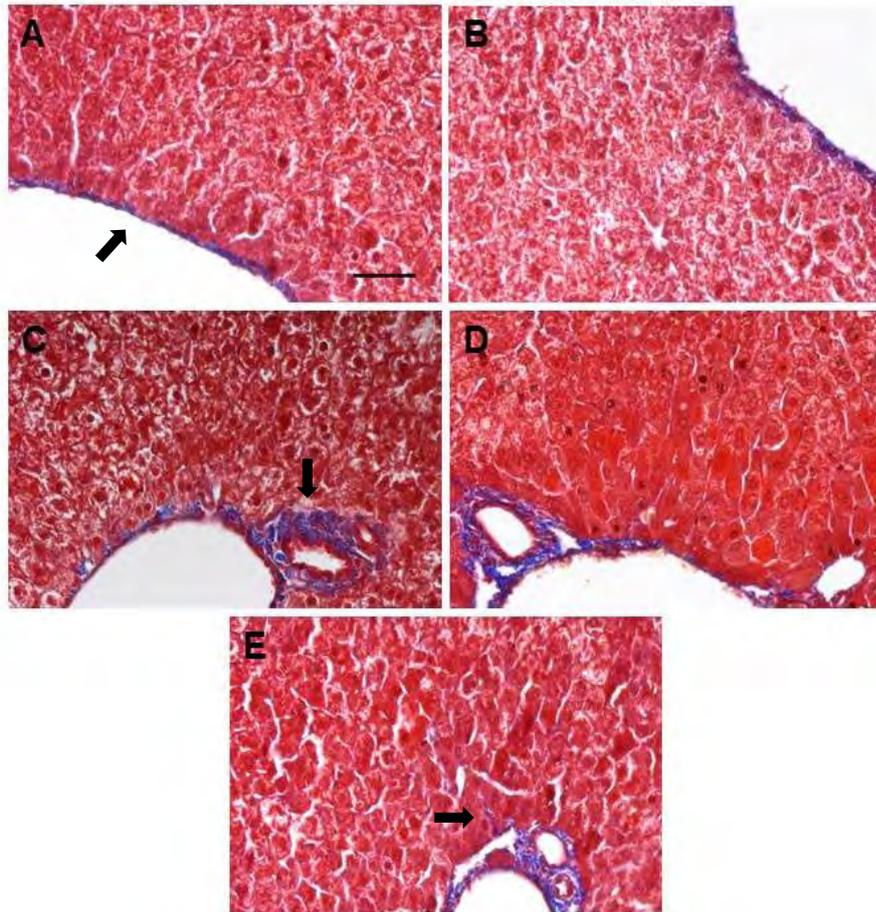
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Efecto de la dietilnitrosamina en el parénquima hepático del ratón

En el hígado normal, la arquitectura celular y los componentes de la matriz extracelular están perfectamente organizados en membranas basales que rodean los tractos portales y la vena central, estas membranas basales se componen principalmente de colágeno y laminina (Geneser, 2015). A nivel histológico los carcinógenos genotóxicos como DEN inducen la formación de focos de hepatocitos alterados y zonas de fibrosis (Bakiri y Wagner, 2013). En la presente investigación evaluamos los efectos de DEN en el hígado del ratón. Inicialmente, determinamos las alteraciones que se producen en el parénquima hepático como resultado de la administración de diferentes dosis de DEN (2.5, 5, 10 y 20 mg/kg) administradas vía i.p.; lo anterior, con la finalidad de inducir la hepatocarcinogénesis en el hígado del ratón. Con base en los análisis realizados en tejidos hepáticos teñidos con la tinción de H&E, observamos que las alteraciones estuvieron asociadas al incremento de la dosis de DEN. Se apreció la aparición e incremento del número de células gigantes. Las células alteradas mostraron un aumento en el tamaño de sus núcleos y citoplasmas, se observó también pérdida de la definición de los cordones de hepatocitos y espacios sinusoidales (Figura 19). Además, a través de la tinción conocida como tricrómica de Masson, una tinción que contrasta fibras de colágena en color azul, pudimos observar que en los animales que recibieron mayores concentraciones de DEN, las fibras de colágena empezaron a aparecer distribuidas en el parénquima hepático (Figura 20).



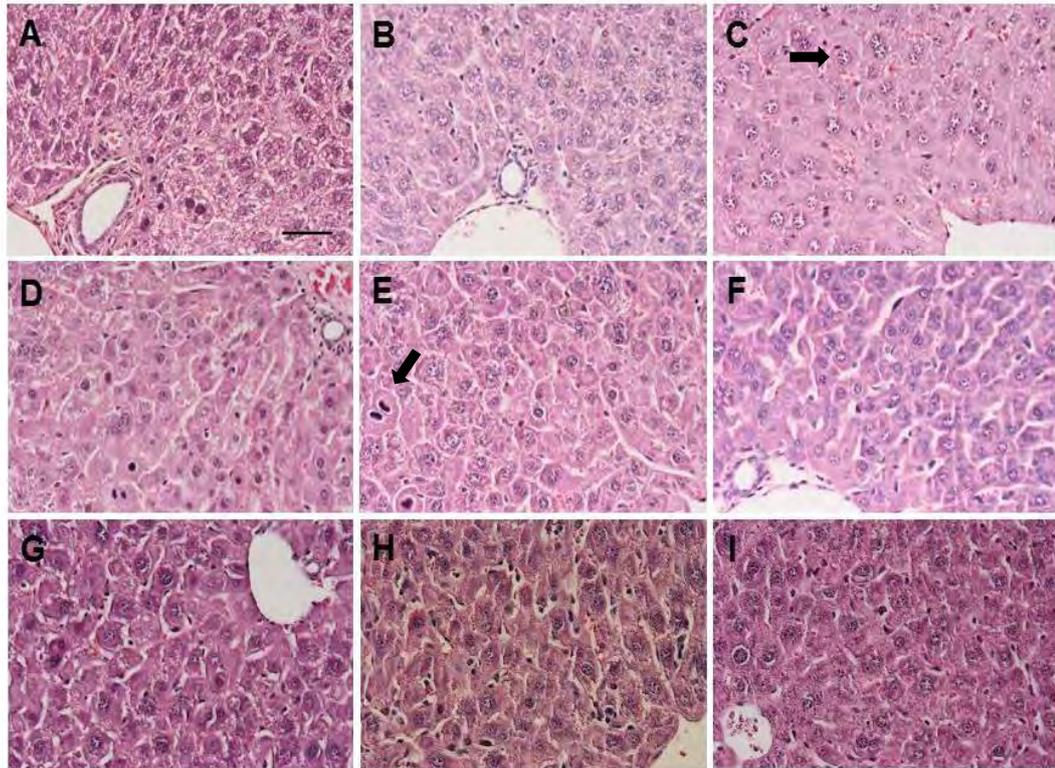
**Figura 19. Determinación de la integridad del tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La integridad del tejido fue determinada mediante la tinción de H&E. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados y teñidos. En el corte se observan los núcleos teñidos de color púrpura y el citoplasma teñido de color rosa. **A.** Control sin tratamiento, **B.** DEN2.5: DEN 2.5 mg/kg, **C.** DEN5: DEN 5 mg/kg, **D.** DEN10: DEN 10 mg/kg, **E.** DEN 20: DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.



**Figura 20. Determinación de la presencia de colágeno en el parénquima hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** Cortes de tejido hepático de 5 µm de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados y teñidos con la tinción tricrómica de masson. En el corte se observan las fibras de colágeno teñidas de color azul, lo núcleos teñidos de color rojo intenso y el citoplasma teñido de color rosa. **A.** Control sin tratamiento, **B.** DEN2.5, **C.** DEN5, **D.** DEN10, **E.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40 µm.  $n = 6$  animales por grupo.

## **6.2 Arquitectura del parénquima hepático durante la regeneración post hepatectomía parcial**

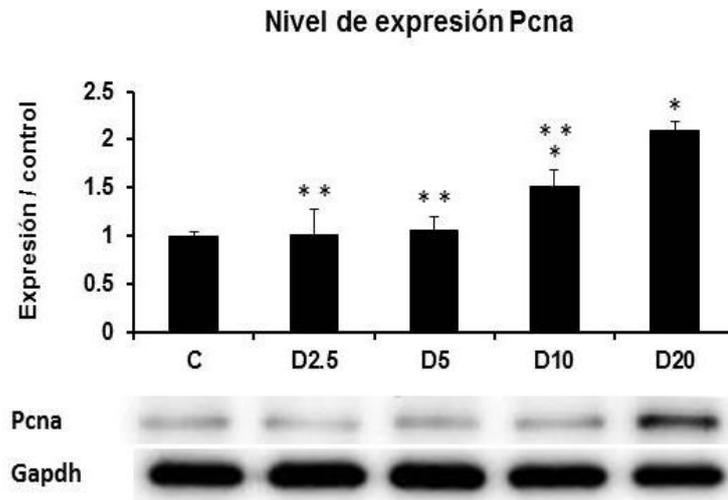
Un modelo ampliamente utilizado para estudiar la proliferación celular es la regeneración hepática después de realizar una HP (Taub, 1996). Este proceso experimental que puede ser considerado normal o no patológico estimula la regeneración hepática a través de la activación de la proliferación celular. Para reproducir este fenómeno, grupos de ratones fueron sometidos a eutanasia post HP en los tiempos correspondientes a 6 horas, 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 10 días. Como se esperaba, los análisis por H&E revelaron que los tejidos de los animales sometidos a la HP presentaron un aumento en el número de células en división y en el tamaño de los núcleos celulares en los primeros días posteriores a la HP (Figura 21). Estos cambios fueron disminuyendo de acuerdo con la progresión de la regeneración hepática; asimismo, los cordones de hepatocitos y espacios sinusoidales mostraron una reorganización.



**Figura 21. Determinación de la integridad del tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La integridad del tejido fue determinada mediante la tinción de H&E. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados y teñidos. En el corte se observan los núcleos teñidos de color púrpura y el citoplasma de color rosa. **A.** Control sin tratamiento, **B.** HP6H: HP a las 6 horas, **C.** HP1: HP a 1 día, **D.** HP2: HP a los 2 días, **E.** HP3: HP a los 3 días, **F.** HP5: HP a los 5 días, **G.** HP6: HP a los 6 días, **H.** HP7: HP a los 7 días, **I.** HP10: HP a los 10 días. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

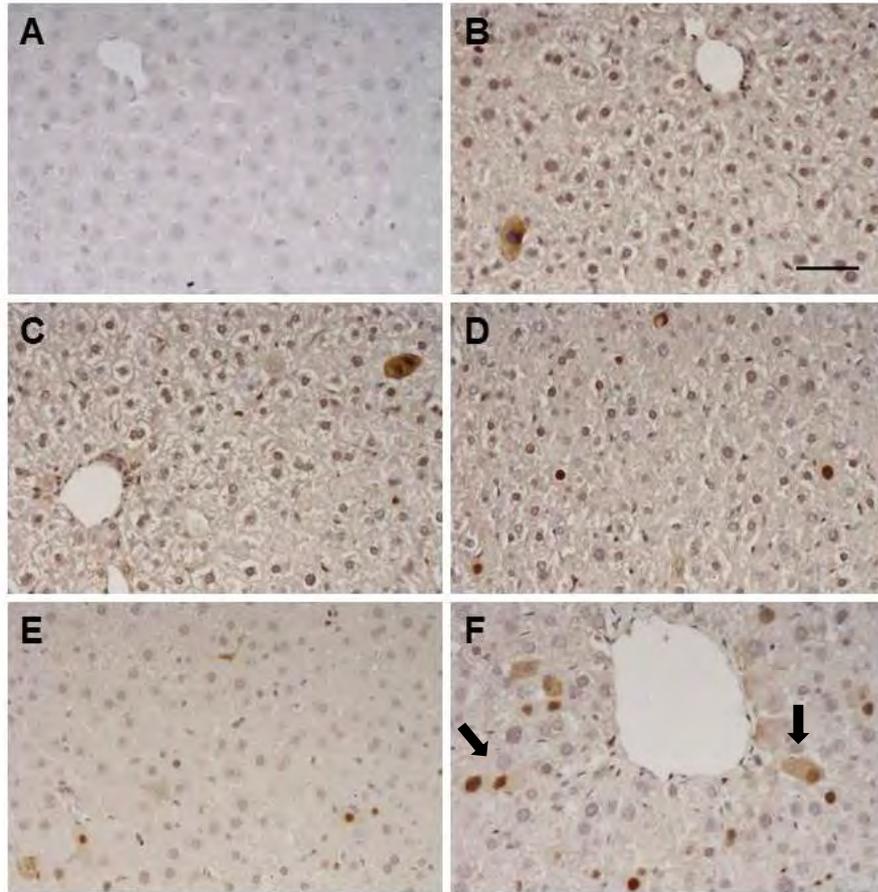
### **6.3 Respuesta de las proteínas implicadas en la proliferación celular a los efectos del modelo de hepatocarcinogénesis**

La proliferación celular es un proceso que implica la activación de una gran variedad de vías de señalización y rutas metabólicas. Entre los principales elementos que regulan la proliferación celular se encuentran los marcadores de proliferación celular PcnA y el regulador del ciclo celular Ciclina D1, así como también la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Zhang *et al.*, 2011). Por lo tanto, determinamos la respuesta de estas proteínas al tratamiento con DEN y a HP. Los análisis de WB revelaron que DEN incrementó gradualmente la expresión de PcnA de una manera dosis dependiente; es decir, las dosis más altas (10 ( $p= 0.01999$ ) y 20 mg/kg ( $p= 0.000001$ )) incrementaron significativamente la expresión de esta enzima comparada con el grupo control (Figura 22). Además, el incremento de la expresión de PcnA inducido por la dosis de 20 mg/kg también fue significativo respecto de todos los grupos administrados con DEN ( $p\leq 0.05$ ). Estos resultados demuestran que DEN induce la expresión del marcador de proliferación celular PcnA, especialmente cuando es administrado en dosis mayores a 10 mg/kg de peso corporal.



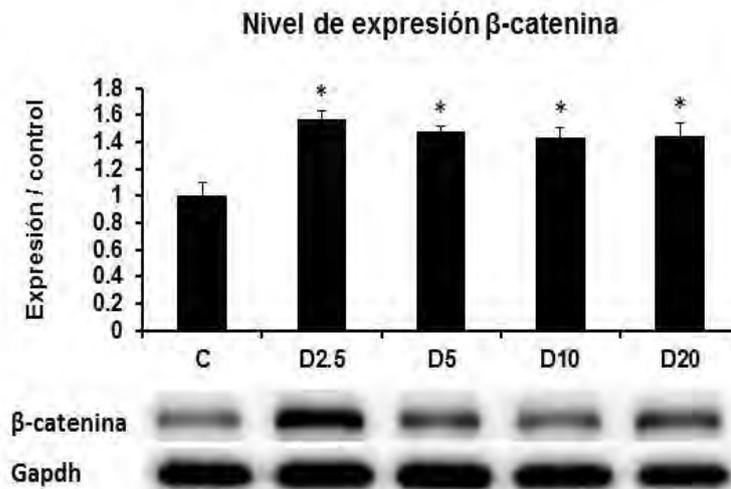
**Figura 22. Efecto de DEN sobre la expresión de Pcná.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Pcná revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Pcná fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D20. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Pcná respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

En el análisis inmunohistoquímico para Pcná se observa un aumento progresivo de la expresión de la enzima conforme aumentan las dosis de DEN, esto coincide con lo observado en el análisis por WB. En la figura 23 se observa que la expresión de Pcná a lo largo del parénquima aumenta ligeramente desde la dosis de 5 mg/kg. Cabe destacar que su expresión es considerablemente mayor tanto a nivel nuclear como citoplasmático en la dosis de DEN a 20 mg/kg, donde se observa con mayor intensidad en las proximidades de la vena central.



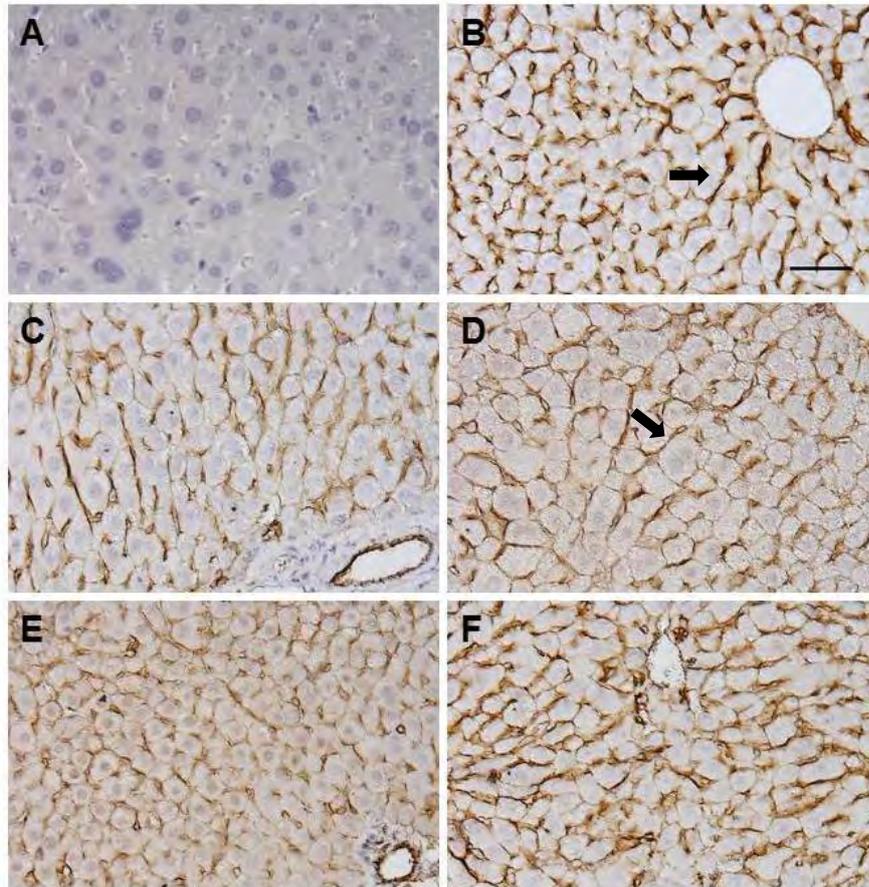
**Figura 23. Expresión de PcnA en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La expresión de PcnA fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-PcnA. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** DEN2.5, **D.** DEN5, **E.** DEN10, **F.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

Cuando se analizaron los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina encontramos que todas las dosis de DEN incrementaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) esta expresión comparada con la del grupo control (Figura 24). Así, DEN indujo la expresión de  $\beta$ -catenina la cual no fue dependiente de la concentración administrada de DEN.



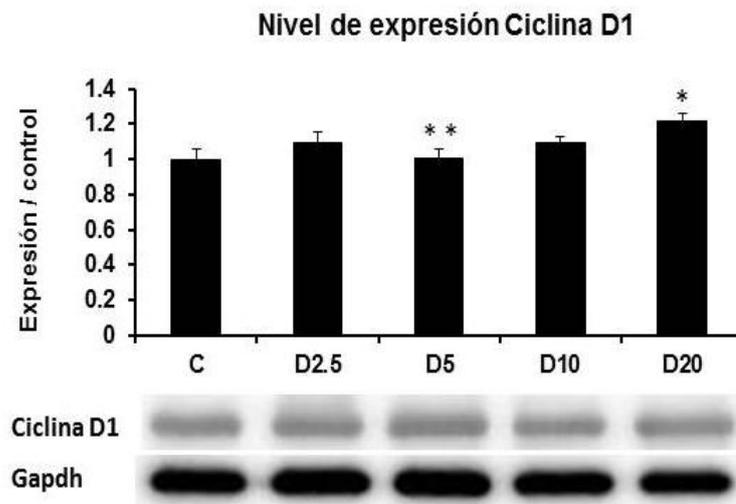
**Figura 24. Efecto de DEN sobre la expresión de  $\beta$ -catenina.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de  $\beta$ -catenina respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística t-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

En la figura 25 del análisis por IHQ para  $\beta$ -catenina se observa un aumento sostenido de la expresión de la enzima con todas las dosis administradas de DEN, este aumento se localiza principalmente a lo largo de la membrana citoplasmática y ligeramente en el núcleo celular.



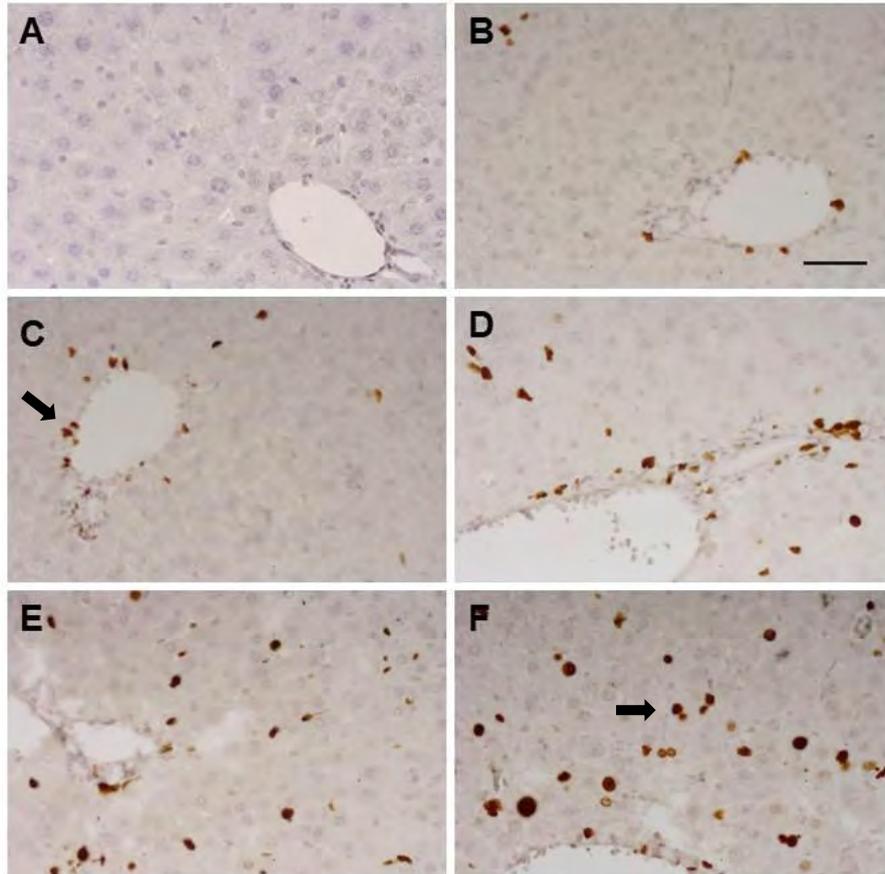
**Figura 25. Expresión de  $\beta$ -catenina en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La expresión de  $\beta$ -catenina fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** DEN2.5, **D.** DEN5, **E.** DEN10, **F.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

Otro marcador ampliamente utilizado para determinar la activación de la proliferación celular es la Ciclina D1 (Qie y Diehl, 2016). Al respecto, se observó que solo la dosis más alta de DEN (20 mg/kg) incrementó significativamente ( $p= 0.01609$ ) la expresión de esta proteína comparada con la del grupo control (Figura 26). Este incremento también fue significativo respecto del grupo tratado con DEN a 5 mg/kg ( $p= 0.00986$ ).



**Figura 26. Efecto de DEN sobre la expresión de Ciclina D1.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Ciclina D1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Ciclina D1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva GAPDH correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D20. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Ciclina D1 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

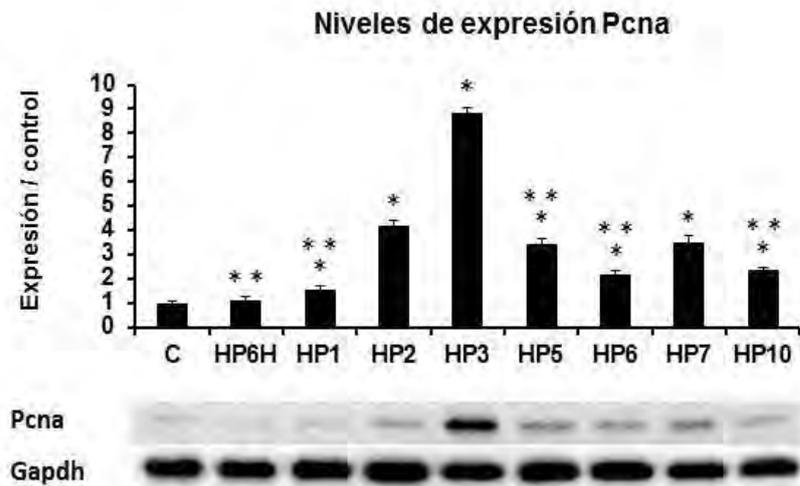
Como un indicador del índice de proliferación celular se utilizó al antígeno Ki67 que se expresa únicamente durante el ciclo celular y se confina al núcleo (Sobecki, *et al.*, 2016). La figura 27 permite apreciar un incremento gradual en el número de núcleos Ki67 positivos desde las dosis más bajas aplicadas de DEN, con un incremento considerable en la dosis de DEN a 20 mg/kg. A su vez, se observa que en el hígado no tratado los núcleos se localizan principalmente en la periferia de la triada portal, conforme aumentan las dosis de DEN, aumenta el número de núcleos positivos y su área de distribución en el parénquima hepático.



**Figura 27. Expresión de Ki67 en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La expresión de Ki67 fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5 µm de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Ki67. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** DEN2.5, **D.** DEN5, **E.** DEN10, **F.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40 µm.  $n = 6$  animales por grupo.

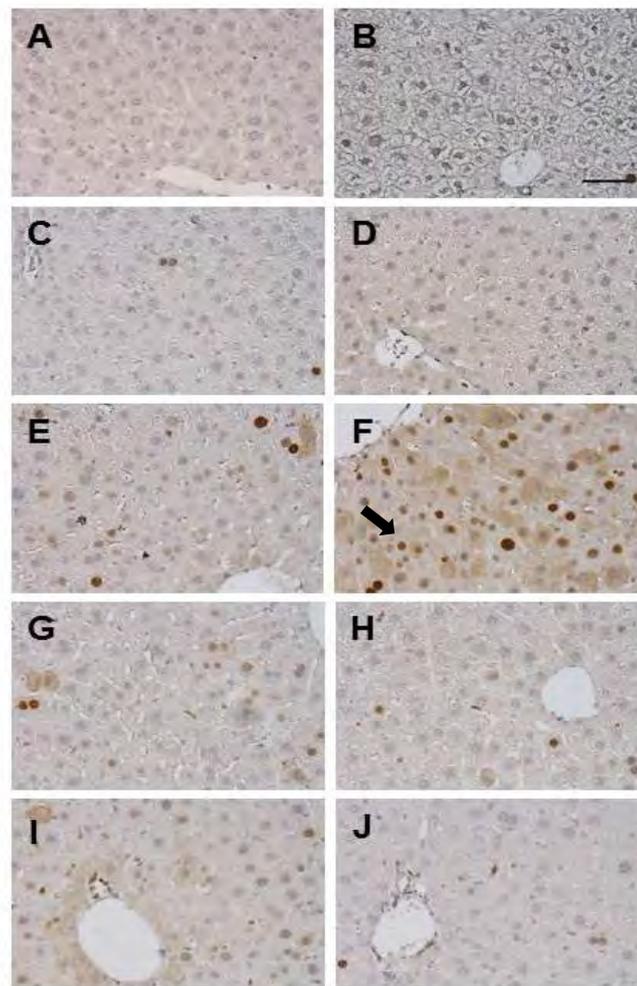
#### **6.4 Efectos del modelo de regeneración hepática sobre proteínas implicadas en la proliferación celular**

Respecto a la respuesta de Pcná en la HP, el análisis por WB reveló que la expresión de Pcná incrementó durante los primeros días de la regeneración hepática (Figura 28). Se observó que en todos los puntos post HP evaluados, la expresión de Pcná incrementó significativamente (día 2 a 10 post HP ( $p \leq 0.05$ )) comparada con el grupo control. De manera interesante, tres días después de la HP observamos que los niveles de expresión de Pcná incrementaron más de ocho veces comparado con el grupo control. Este incremento también fue significativo respecto a los demás tiempos post HP evaluados. Estos resultados indican que durante la regeneración hepática estimulada por la HP la replicación del ADN y en consecuencia la proliferación celular alcanza su mayor nivel tres días después del estímulo.



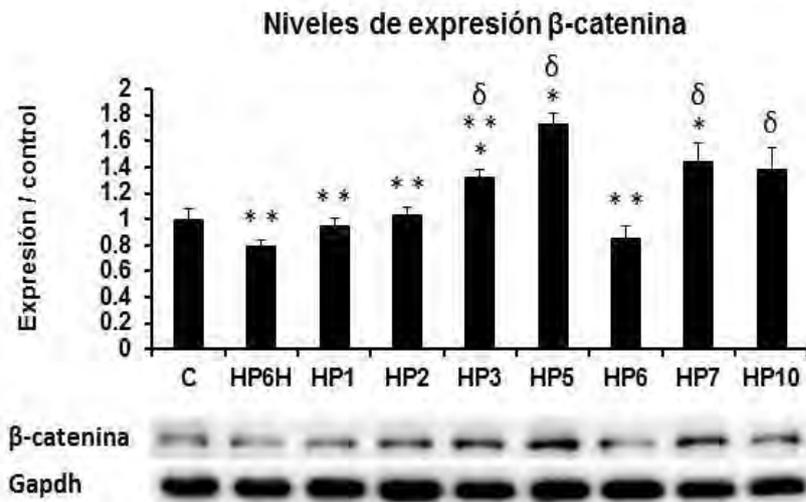
**Figura 28. Efecto de la HP sobre la expresión de Pdna.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Pdna revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Pdna fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP3. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Pdna respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

La figura 29 del análisis por IHQ muestra un aumento moderado de la expresión nuclear de Pcn a partir de las 6 horas posteriores a la HP. Sin embargo, este incremento tanto a nivel nuclear como citoplasmático es visiblemente mayor a los 3 días, lo cual coincide con lo observado en el análisis por WB. La expresión decrece inmediatamente a los 5 días y continúa con fluctuaciones en su expresión en los días posteriores.



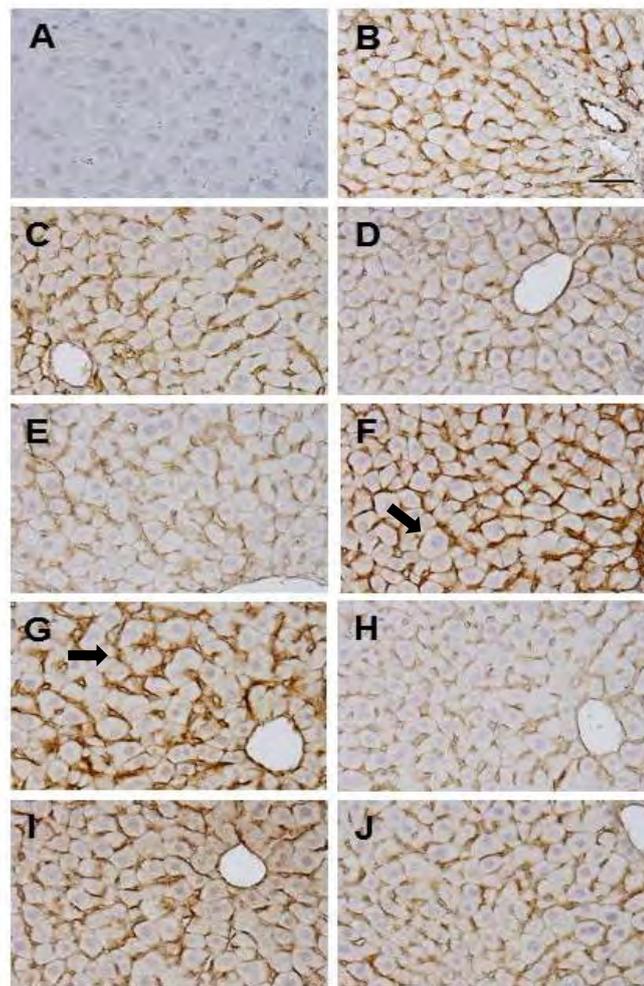
**Figura 29. Expresión de Pcn en el tejido hepático de ratones sometidos a diferentes días de eutanasia post HP.** La expresión de Pcn fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Pcn. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** HP6H, **D.** HP1, **E.** HP2, **F.** HP3, **G.** HP5, **H.** HP6, **I.** HP7, **J.** HP10. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

Por otro lado, aunque la expresión de  $\beta$ -catenina incrementó gradualmente y alcanzó su mayor expresión en el día 5 post HP, mostró una disminución en el día 6 pero se recuperó parcialmente en los días 7 y 10; como consecuencia, el incremento fue significativo en los días 3, 5 y 7 ( $p \leq 0.05$ ) post HP comparado con el grupo control (Figura 30). Adicionalmente y debido a que el día 5 post HP mostró el mayor incremento, este incremento fue significativo respecto de los grupos de 6 horas, 1, 2, 3 y 6 días post HP. Finalmente, la disminución observada en el día 6 fue significativa respecto a los grupos 3, 5, 7 y 10 días post HP. Estos resultados muestran que la mayor participación de  $\beta$ -catenina durante la regeneración hepática podría llevarse a cabo entre los días 3 y 5 post HP.



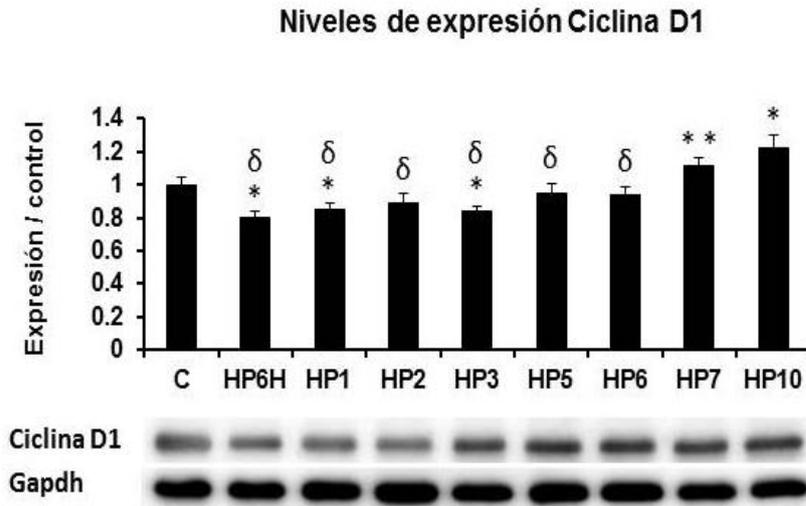
**Figura 30. Efecto de la HP sobre la expresión de  $\beta$ -catenina.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP5. El signo ( $\delta$ ) delta sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP6. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de  $\beta$ -catenina respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

En el análisis por IHQ, la figura 31 permite observar que  $\beta$ -catenina se localiza a nivel de la membrana plasmática y ligeramente en el núcleo, el aumento progresivo de su expresión se observa con mayor claridad durante los días 3 y 5 post HP, en estos días se aprecia con mayor intensidad localizada en las proximidades de la vena central. Posteriormente se observa un decremento a los 6 días y vuelve a aumentar entre los 7 y 10 días post HP.



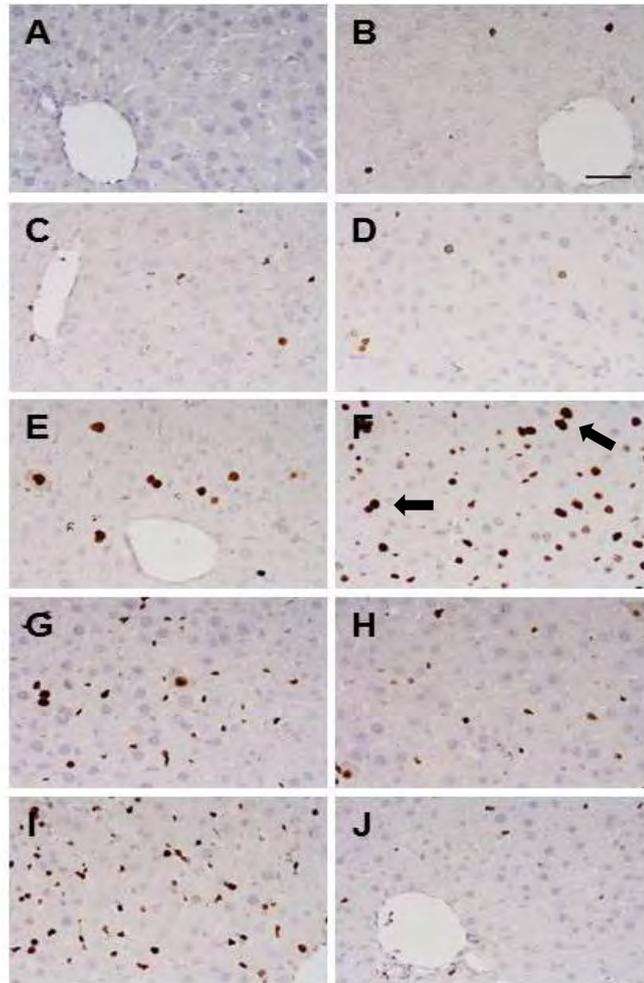
**Figura 31. Expresión de  $\beta$ -catenina en el tejido hepático de ratones sometidos a diferentes días de eutanasia post HP.** La expresión de  $\beta$ -catenina fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti- $\beta$ -catenina. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** HP6H, **D.** HP1, **E.** HP2, **F.** HP3, **G.** HP5, **H.** HP6, **I.** HP7, **J.** HP10. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

Respecto a la respuesta de Ciclina D1 observamos que la expresión de esta proteína mostró un decremento a partir de la 6 horas post HP pero que gradualmente incrementó significativamente hasta los 10 días posteriores (Figura 32). Así, el análisis densitométrico reveló un decremento significativo durante las 6 horas, 1 y 3 días y un incremento en el día 10 post HP ( $p \leq 0.05$ ), respecto del grupo control. El umbral mínimo de expresión a las 6 horas fue significativo con respecto a los grupos sometidos a eutanasia a los 7 días post HP ( $p = 0.00149$ ). El grupo sometido a eutanasia a los 10 días post HP también mostró significancia con respecto a todos los grupos con excepción del grupo sometido a eutanasia a los 7 días.



**Figura 32. Efecto de la HP sobre la expresión de Ciclina D1.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Ciclina D1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Ciclina D1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP6H. El signo (δ) delta sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Ciclina respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

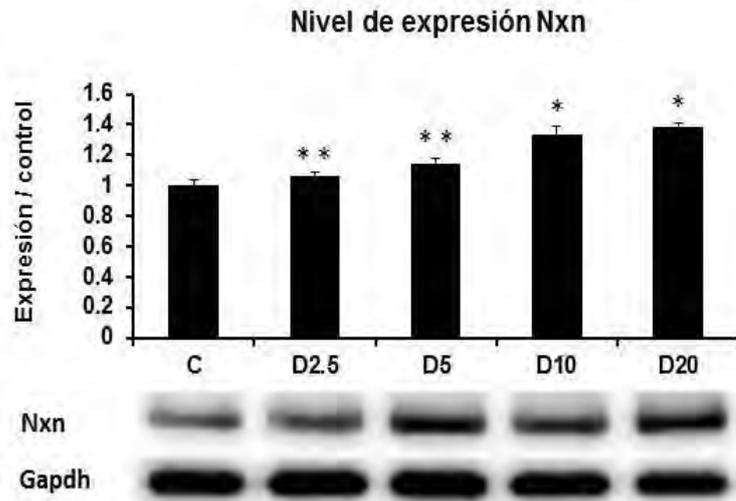
Al igual que en el modelo de hepatocarcinogénesis para el modelo de regeneración hepática se determinó por IHQ la activación del marcador de proliferación celular Ki67. En las imágenes de la figura 33 se observan núcleos Ki67 positivos que se encuentran distribuidos por todo el parénquima hepático, se aprecia un incremento gradual de la expresión desde las 6 horas post HP, con un umbral máximo a los 3 días, donde también se observa un aumento en el número de células en división. Posterior a los 3 días se aprecia un decremento progresivo de la expresión de la enzima.



**Figura 33. Expresión de Ki67 en el tejido hepático de ratones sometidos a diferentes días de eutanasia post HP.** La expresión de Ki67 fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Ki67. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** HP6H, **D.** HP1, **E.** HP2, **F.** HP3, **G.** HP5, **H.** HP6, **I.** HP7, **J.** HP10. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

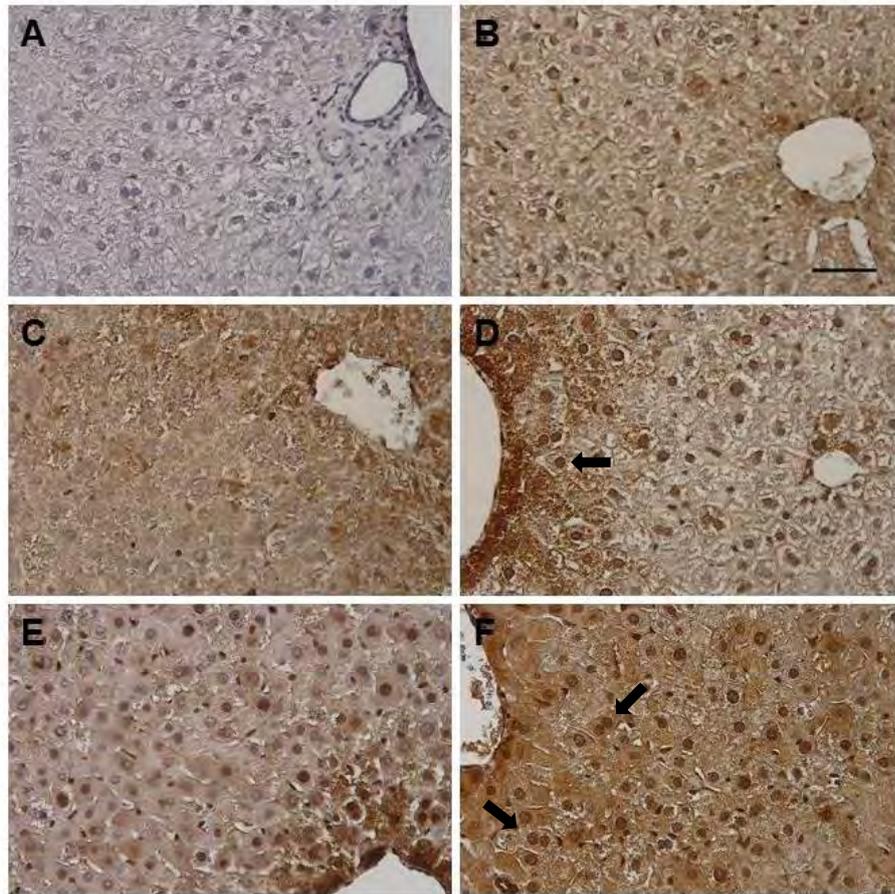
## **6.5 Incremento de los niveles de expresión de la Nxn bajo el efecto de DEN**

Algunos de los blancos moleculares del estrés oxidativo son las proteínas redox sensibles, tal es el caso de la Nxn, una enzima que regula vías de señalización a través de interacciones que responden a las fluctuaciones de los niveles de ROS en el microambiente celular (Funato y Miki, 2007). En esta investigación determinamos la respuesta de la Nxn a los efectos de las diferentes dosis de DEN. Los análisis de WB revelaron que DEN incrementó gradualmente la expresión de la Nxn y este incremento fue dosis dependiente; es decir, las dosis más altas (10 mg/kg ( $p= 0.00145$ ) y 20 mg/kg ( $p= 0.00001$ )) incrementaron significativamente la expresión de esta enzima comparada con el grupo control (Figura 34). Adicionalmente, el incremento de la expresión de la Nxn inducido por la dosis de 20 mg/kg también fue significativo respecto de los grupos administrados con las dosis de 2.5 y 5 mg/kg ( $p\leq 0.05$ ). Estos resultados indican que la enzima redox sensible Nxn responde a los efectos del carcinógeno DEN y dada la naturaleza de la Nxn, es muy probable que su respuesta esté relacionada con la producción de ROS inducida por DEN.



**Figura 34. Efecto de DEN sobre la expresión de la Nxn.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de la Nxn revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de la Nxn fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D20. Las barras representan el promedio  $\pm$  el EE de la expresión de la Nxn respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

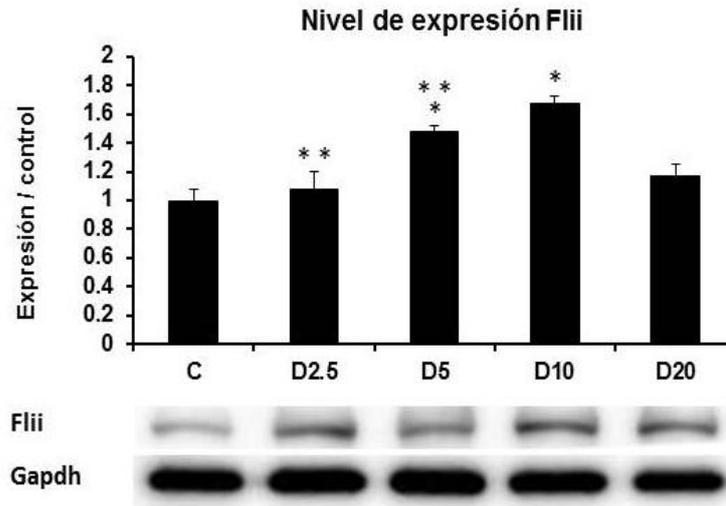
Posteriormente, mediante IHQ detectamos la localización estructural de la Nxn en el parénquima hepático. En las imágenes de la figura 35 se observa que de acuerdo con los análisis por WB, el tratamiento de DEN incrementó la expresión de Nxn, ésta se observa con mayor intensidad a partir de la dosis de 5 mg/kg y aunque se encuentra distribuida en toda la estructura celular, también se puede observar que a partir de esta dosis su localización incrementó tanto en los núcleos de las células parenquimales como en aquellas que rodean la vena central. Es importante resaltar que en los tejidos expuestos a la dosis de 20 mg/kg la intensidad de Nxn tanto nuclear como citoplasmática fue claramente incrementada.



**Figura 35. Expresión de NxN en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La expresión de NxN fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-NxN. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** DEN2.5, **D.** DEN5, **E.** DEN10, **F.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

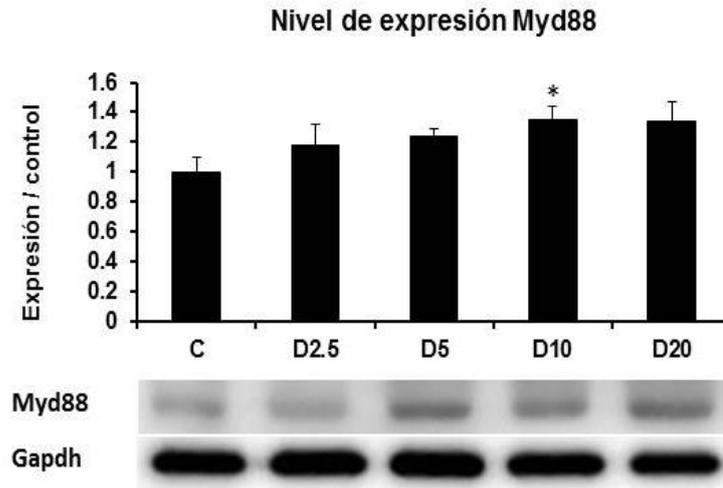
## **6.6 Efecto de la dietilnitrosamina sobre los niveles de expresión de proteínas que interaccionan con la Nxn**

Con la finalidad de determinar el efecto de DEN sobre algunas proteínas que interactúan con la Nxn, evaluamos la expresión de Flii, una proteína que forma complejo con Nxn a través de su interacción con la proteína Myd88 (Hayashi *et al.*, 2010). Los análisis densitométricos de los ensayos por WB revelaron que DEN incrementó la expresión de Flii (Figura 36). La gráfica muestra un incremento significativo en los grupos tratados con DEN a 5 mg/kg ( $p=0.00045$ ) y 10 mg/kg ( $p=0.00004$ ), con respecto al grupo control; asimismo, el incremento observado en el grupo tratado con DEN a 10 mg/kg fue significativo con respecto a los grupos tratado con DEN a 2.5 mg/kg ( $p=0.00131$ ) y 5 mg/kg ( $p=0.02376$ ). Estos resultados indican que el aumento en la expresión de Flii está vinculado con el aumento en la producción de ROS inducido por la administración de DEN.



**Figura 36. Efecto de DEN sobre la expresión de Flii.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Flii revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Flii fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Flii respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

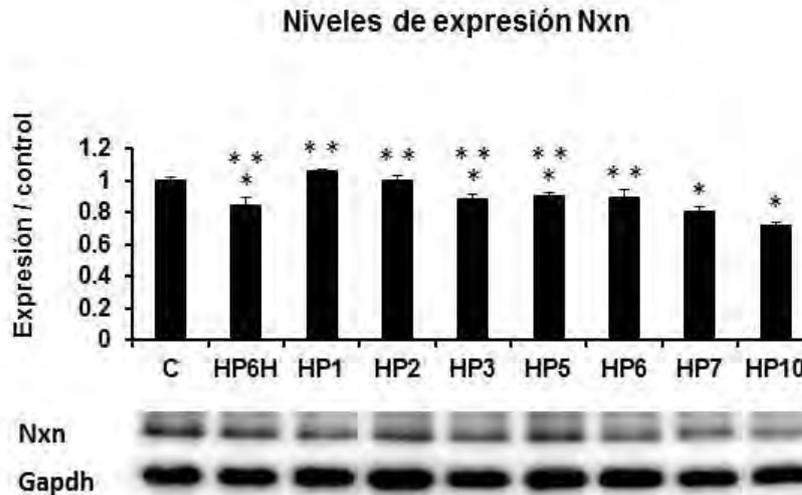
Myd88 es una proteína activada por el TLR4 que a su vez participa en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Hayashi *et al.*, 2010). Como ya se mencionó anteriormente, Nxn interactúa con el complejo Myd88/Flii para regular negativamente la vía antes mencionada. Para determinar la respuesta de Myd88 a los efectos inducidos por DEN determinamos sus niveles de expresión en los diferentes grupos tratados con ese carcinógeno. En el análisis por WB de los grupos sometidos al modelo de hepatocarcinogénesis, se observa una tendencia de incremento de los niveles de Myd88; sin embargo, este incremento sólo fue estadísticamente significativo entre el grupo tratado con DEN a 10 mg/kg ( $p= 0.02471$ ) respecto del grupo control (Figura 37).



**Figura 37. Efecto de DEN sobre la expresión de Myd88.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Myd88 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Myd88 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Myd88 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg

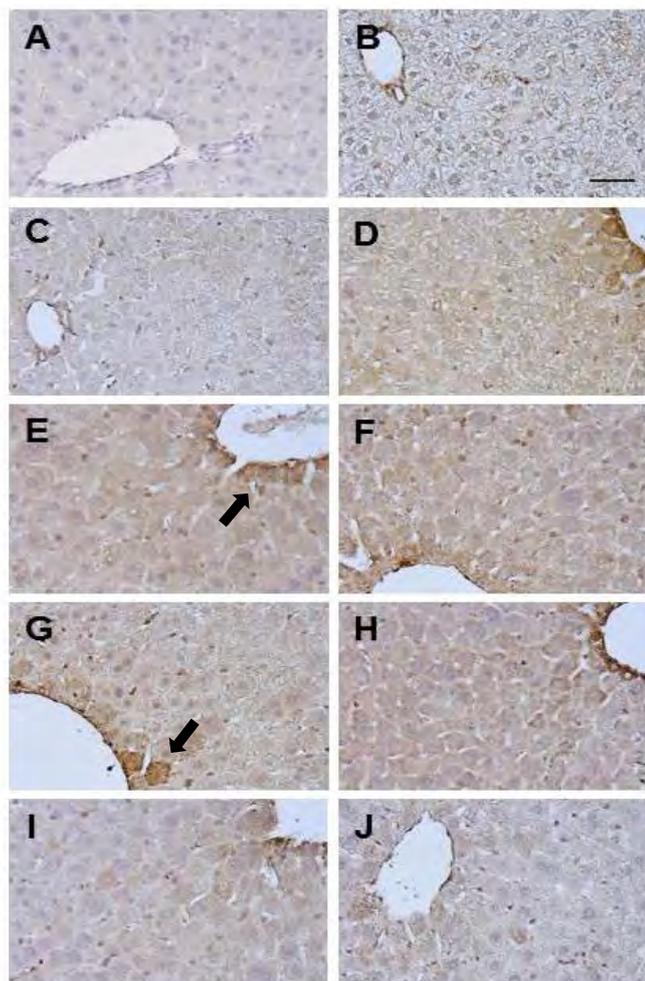
## **6.7 Expresión proteica de la Nxn durante la regeneración hepática**

Debido a que la Nxn es una enzima redox sensible también puede ser estimulada por el estrés oxidativo inducido por la HP. De esta forma, determinamos el nivel de expresión de la Nxn durante la regeneración hepática. El análisis de WB reveló que el nivel de expresión de la Nxn mostró una tendencia a disminuir conforme la regeneración hepática se fue estabilizando. Este decremento fue tiempo dependiente; es decir, al avanzar los días post HP (6 horas, 3, 5, 7 y 10 días ( $p \leq 0.05$ )) disminuyó la expresión de la Nxn comparada con el grupo control (Figura 38). Adicionalmente, esta disminución también fue significativa respecto de los grupos sometidos a eutanasia desde las 6 horas hasta los 6 días ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados indican que durante la regeneración hepática los niveles de expresión de la Nxn tienden a disminuir.



**Figura 38. Efecto de la HP sobre la expresión de la Nxn.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de la Nxn revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de la Nxn fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de la Nxn respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

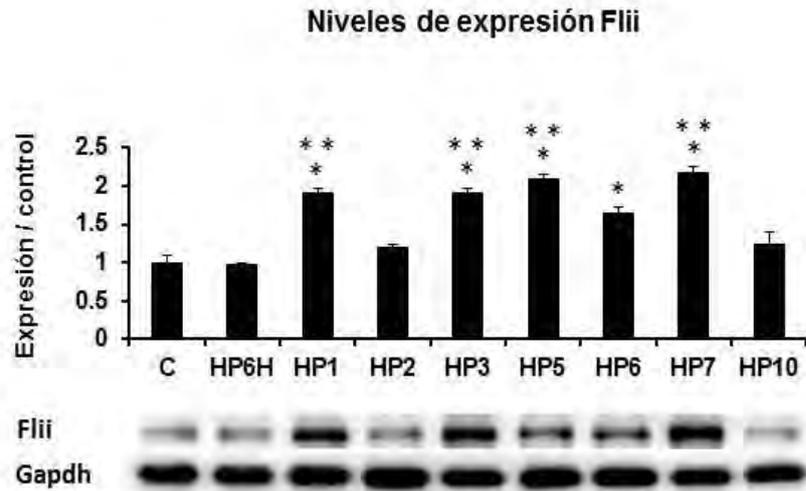
Por su parte, los análisis de IHQ confirmaron los hallazgos encontrados con los análisis por WB. En la figura 39 se puede observar que durante la regeneración hepática estimulada por la HP, la expresión de Nxn mostró un ligero incremento tanto en el citoplasma como en la periferia de las venas centrales especialmente en los primeros tiempos post HP, pero ésta decrece a partir de los 6 días hasta el último tiempo evaluado. La expresión de Nxn, aunque ligeramente, también se encuentra claramente visible en los núcleos de las células; especialmente, 5 días post HP.



**Figura 39. Expresión de Nxn en el tejido hepático de ratones sometidos a diferentes días de eutanasia post HP.** La expresión de Nxn fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Nxn. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** HP6H, **D.** HP1, **E.** HP2, **F.** HP3, **G.** HP5, **H.** HP6, **I.** HP7, **J.** HP10. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

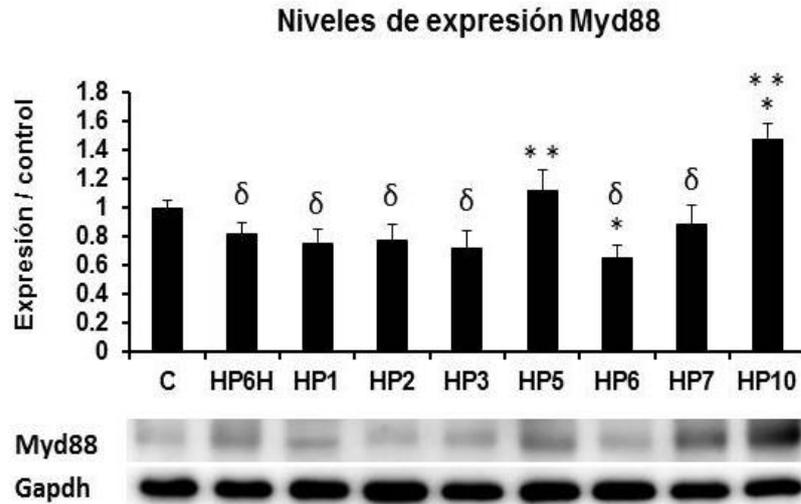
## **6.8 Efecto de la regeneración hepática sobre los niveles de expresión de proteínas que interaccionan con Nxn**

La respuesta de Flii al modelo de regeneración hepática fue variable durante los tiempos evaluados post HP. Observamos un marcado incremento de su expresión a los 1, 3, 5 y 7 días post HP (Figura 40). Los grupos sometidos a eutanasia a los 1, 3, 5, 6 y 7 días post HP ( $p \leq 0.05$ ) mostraron un incremento significativo con respecto al grupo control. Además, en el grupo sometido a eutanasia a los 10 días post HP disminuyó su expresión y esta disminución fue significativa también con respecto a aquella de los grupos sometidos a eutanasia a los 1, 3, 5 y 7 días, de forma similar a lo ocurrido con el grupo control.



**Figura 40. Efecto de la HP sobre la expresión de Flii.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Flii revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Flii fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Flii respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

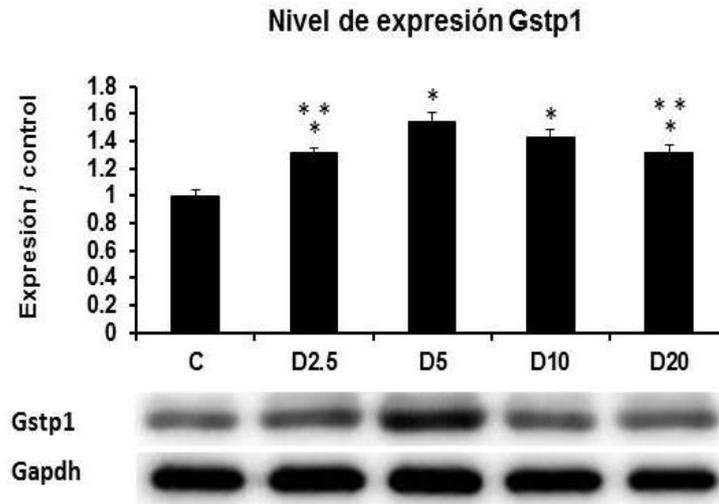
Cuando se determinaron los niveles de expresión de Myd88 observamos un incremento significativo ( $p= 0.00706$ ) de su expresión únicamente a los 10 días posteriores a la intervención quirúrgica respecto del grupo control (Figura 41). En el resto de los días evaluados su expresión fue variable. Por ejemplo, su expresión en el grupo de 6 horas post HP ( $p= 0.01031$ ) presenta una disminución significativa con respecto al grupo control. El umbral mínimo de expresión lo observamos a los 6 días post HP y fue significativo con respecto a los grupo sometido a eutanasia a los 5 ( $p= 0.02311$ ) y 10 días ( $p= 0.00058$ ) post HP; el incremento de este último, fue significativo comparado con el resto de los grupos con excepción del grupo sometidos a eutanasia a los 5 días.



**Figura 41. Efecto de la HP sobre la expresión de Myd88.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Myd88 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Myd88 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP6. Es signo (δ) delta sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Myd88 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

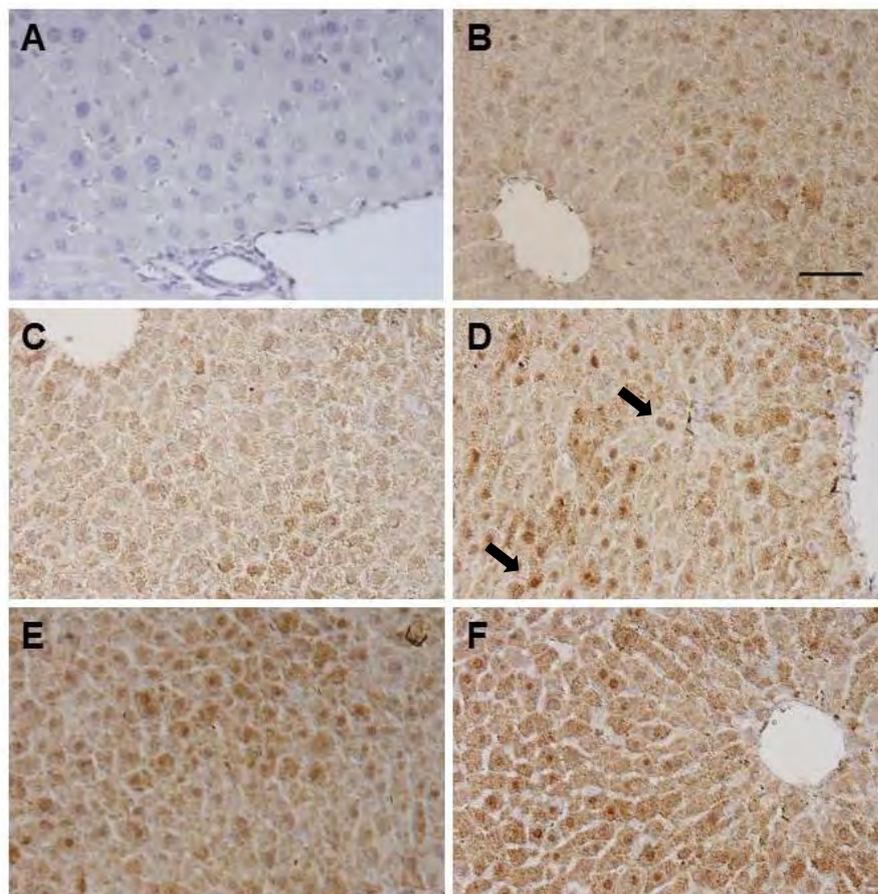
## **6.9 Expresión proteica de marcadores de daño hepático en el modelo de hepatocarcinogénesis**

Uno de los marcadores de hepatocarcinogénesis ampliamente conocido es Gstp1, cuya sobreexpresión se observa posterior a la administración del carcinógeno DEN (Martignano *et al.*, 2016). Por lo tanto, para asociar la aparición de la hepatocarcinogénesis con la inducción de la expresión de la Nxn y las proteínas con que interactúa determinamos su expresión en los animales tratados con DEN. Encontramos que su expresión incrementó de una manera significativa ( $p \leq 0.05$ ) y muy similar en respuesta a todas las dosis administradas de DEN con respecto al grupo control (Figura 42). Observamos un umbral máximo de su expresión en el grupo tratado con DEN a 5 mg/kg. Además, el incremento observado en el grupo tratado con DEN a 5 mg/kg fue significativo con respecto a los grupos tratados con DEN a 2.5 ( $p = 0.01794$ ) y 20 ( $p = 0.25606$ ) mg/kg.



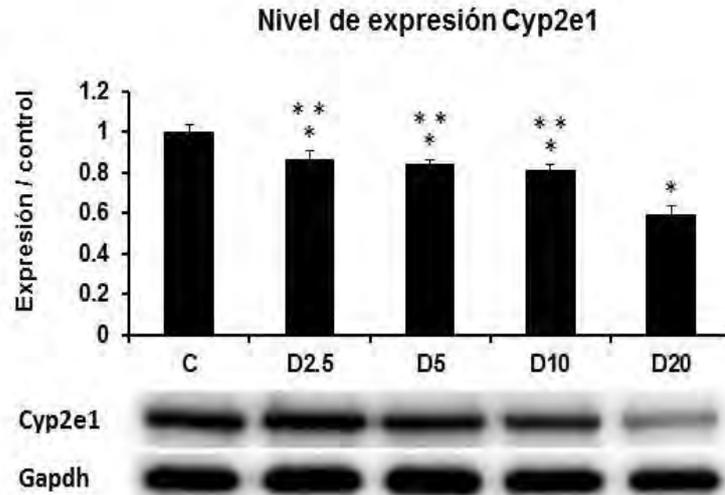
**Figura 42. Efecto de DEN sobre la expresión de Gstp1.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Gstp1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Gstp1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D5. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Gstp1 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

En el análisis inmunohistoquímico las imágenes de la figura 43 permite observar un aumento progresivo de la expresión citoplasmática de Gstp1 a lo largo del parénquima hepático, esto desde las dosis más bajas del carcinógeno. A partir de la dosis administrada de DEN a 5 mg/kg se aprecian un umbral máximo de la expresión de Gstp1 tanto a nivel citoplasmático como nuclear, esta condición se mantiene conforme aumentan las dosis del carcinógeno.



**Figura 43. Expresión de Gstp1 en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN.** La expresión de Gstp1 fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Gstp1. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** DEN2.5, **D.** DEN5, **E.** DEN10, **F.** DEN20. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

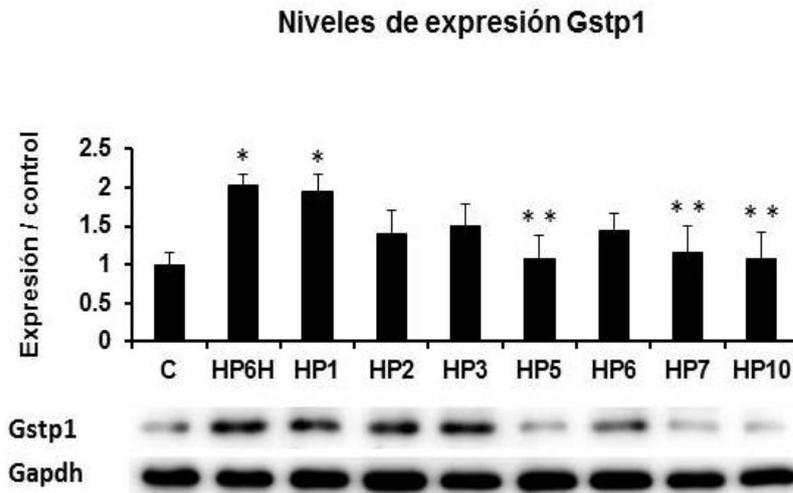
Una de las principales enzimas encargada del metabolismo de DEN es la enzima Cyp2e1 (Kaledin, *et al.*, 2015); por tal motivo, evaluamos su expresión para determinar su inducción en respuesta al tratamiento con este carcinógeno. De manera interesante y diferente a lo esperado, encontramos un decremento progresivo de su expresión el cual fue más pronunciado en la medida en que la dosis de DEN fue mayor. Como resultado, se observó un decremento gradual y significativo de su expresión en todos los grupos tratados con DEN ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al grupo control (Figura 44). La disminución observada en el grupo tratado con una dosis de 20 mg/kg también fue significativa respecto a todos los grupos tratados con menores dosis de DEN. Esto indica que la expresión de esta enzima se ve disminuida conforme la dosis administrada del carcinógeno va aumentando.



**Figura 44. Efecto de DEN sobre la expresión de Cyp2e1.** Los animales fueron administrados dos veces por semana con diferentes dosis de DEN. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Cyp2e1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Cyp2e1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo D20. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Cyp2e1 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, D2.5: DEN dosis 2.5 mg/kg, D5: DEN dosis 5 mg/kg, D10: DEN dosis 10 mg/kg, D20: DEN dosis 20 mg/kg.

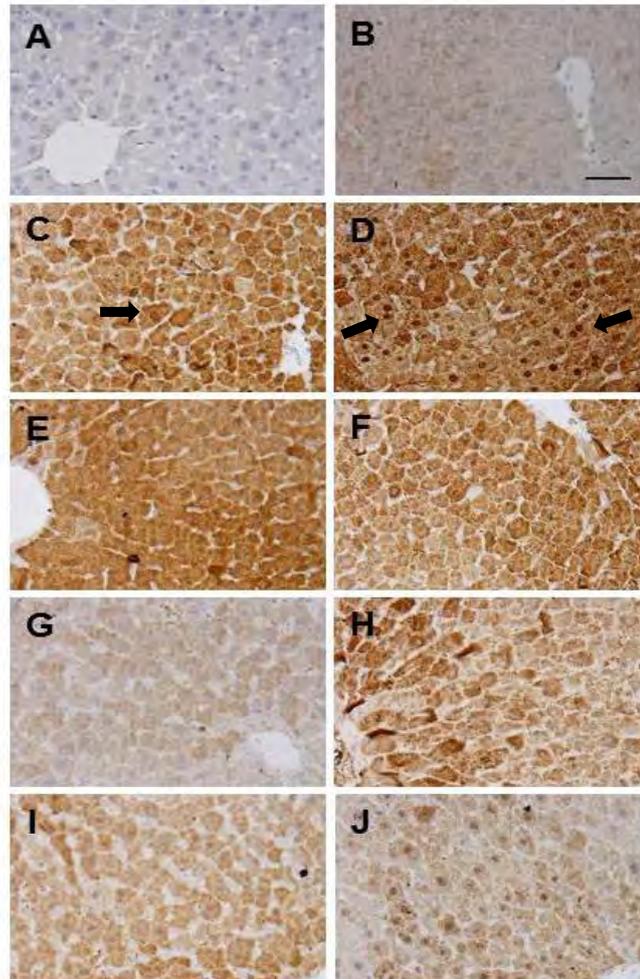
## **6.10 Efecto de la regeneración hepática sobre la expresión de marcadores de daño hepático**

La respuesta de Gstp1 al modelo de regeneración hepática también la determinamos por análisis de WB. Los resultados mostraron que la expresión de Gstp1 presenta una tendencia de incremento a partir de las 6 horas hasta los 3 días post HP, en los días posteriores se observó un decremento considerable (Figura 45). A pesar de que la tendencia de incremento en los tiempos iniciales fue evidente, sólo fue significativo en los grupos sometidos a eutanasia a las 6 horas ( $p= 0.000851327$ ) y un 1 día ( $p= 0.006700626$ ) post HP comparado con el grupo control. El umbral máximo de expresión observado a las 6 horas posteriores a la intervención fue significativo con respecto a los grupos sometidos a eutanasia a los 5, 7 y 10 días.



**Figura 45. Efecto de la HP sobre la expresión de Gstp1.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Gstp1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Gstp1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP6H. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Gstp1 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

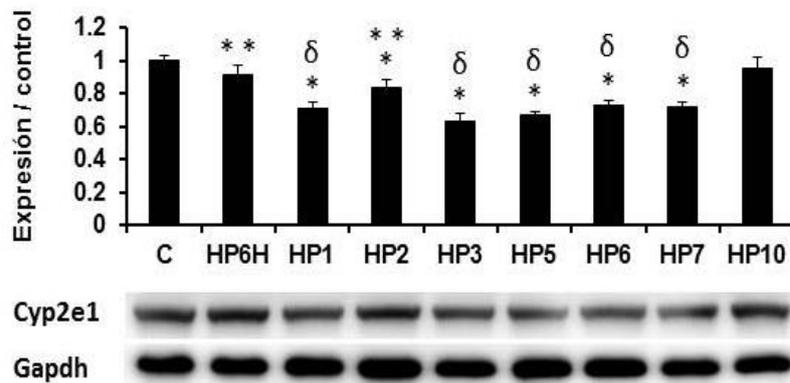
De acuerdo a lo observado en el análisis por IHQ, la figura 46 revela que la expresión tanto nuclear como citoplasmática de Gstp1 se encuentra marcadamente incrementada entre las 6 horas y el día 1 post HP; posterior a lo cual se observa un decremento en su expresión con bastantes fluctuaciones, esto coincide con lo observado en el análisis por WB.



**Figura 46. Expresión de Gstp1 en el tejido hepático de ratones sometidos a diferentes días de eutanasia post HP.** La expresión de Gstp1 fue determinada por análisis inmunohistoquímicos. Cortes de tejido hepático de 5  $\mu\text{m}$  de espesor incluidos en parafina fueron desparafinados, rehidratados e incubados con un anticuerpo anti-Gstp1. La señal de interacción antígeno-anticuerpo fue revelada con un kit comercial y se observa como áreas o estructuras celulares teñidas en gradientes de color café. **A.** Control negativo, **B.** Control sin tratamiento, **C.** HP6H, **D.** HP1, **E.** HP2, **F.** HP3, **G.** HP5, **H.** HP6, **I.** HP7, **J.** HP10. Magnificación de las imágenes 200x. La barra en B representa 40  $\mu\text{m}$ .  $n = 6$  animales por grupo.

Respecto a la respuesta que la enzima Cyp2e1 mostró durante la regeneración hepática, observamos una tendencia de disminución en su expresión. Esta tendencia se observó a partir de las 6 horas hasta los 7 días post HP y se recuperó a niveles normales a los 10 días posteriores (Figura 47). La gráfica muestra que la disminución fue significativa en los grupos sometidos a eutanasia a partir del día 1 y hasta los 7 días ( $p \leq 0.05$ ) con respecto al grupo control. El umbral mínimo de expresión se observó a los 3 días y también fue significativo con respecto a los grupo sometido a eutanasia a las 6 horas ( $p = 0.00479$ ) y 2 días ( $p = 0.01308$ ) post HP. El incremento de los niveles de expresión de esta enzima observado en el día 10 también fue significativo respecto de los grupos sometidos a eutanasia a los 1, 3, 5, 6 y 7 días post HP.

## Niveles de expresión Cyp2e1



**Figura 47. Efecto de la HP sobre la expresión de Cyp2e1.** Los animales fueron sometidos a eutanasia post HP a diferentes días. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica correspondiente a los niveles de expresión de Cyp2e1 revelados mediante análisis de WB. Los niveles de expresión de Cyp2e1 fueron normalizados con la expresión de la proteína constitutiva Gapdh correspondiente a cada muestra. Un (\*) asterisco sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Dos (\*\*) asteriscos sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP3. Es signo (δ) delta sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo HP10. Las barras representan el promedio de  $\pm$  el EE de la expresión de Cyp2e1 respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 6 animales y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística *t*-test considerando una  $p < 0.05$ . C: Control, HP6H: HP a las 6 horas, HP1: HP a un día, HP2: HP a los 2 días, HP3: HP a los 3 días, HP5: HP a los 5 días, HP6: HP a los 6 días, HP7: HP a los 7 días, HP10: HP a los 10 días.

## 7. DISCUSIÓN

El análisis de los cambios en la expresión de proteínas implicadas en el desarrollo del estrés oxidativo, a través del proceso de regeneración hepática y hepatocarcinogénesis, puede dilucidar con mayor precisión el papel que juegan diversas proteínas redox sensibles en el establecimiento del estrés oxidativo. En este sentido, comprender el papel que juega la Nxn, así como sus interacciones con otras enzimas, vías de señalización y rutas metabólicas, podría tener importantes repercusiones que permitan evaluar los cambios tempranos que se producen bajo estímulos oxidantes antes de la aparición de enfermedades clínicamente detectables, por ejemplo, el CHC. Generalmente, el CHC se detecta en la etapa tardía ya que son evidentes e irreversibles muchos cambios genéticos y moleculares, por lo cual es importante la búsqueda de biomarcadores de estadios tempranos que puedan funcionar como blancos terapéuticos.

En esta tesis se evaluaron dos modelos de inducción de estrés oxidativo; el modelo de hepatocarcinogénesis y el modelo de regeneración hepática, estos modelos ofrecen la ventaja de estimular la proliferación celular por diferentes mecanismos y de esta forma recrear el desarrollo temprano de la hepatocarcinogénesis de forma similar a como ocurre en el ser humano.

Al administrar diferentes dosis de DEN se observó que conforme aumentan las dosis del carcinógeno, la conformación histológica del hígado se ve afectada, aparecen células gigantes, hay disminución de la definición de los cordones de hepatocitos y los espacios sinusoidales, así como invasión de fibras de colágeno hacia el interior del parénquima, lo cual está referido como un

indicativo de fibrosis del tejido (Geneser, 2015). Por el contrario, conforme avanzó el proceso de regeneración hepática en los ratones sometidos a HP, se observó una recuperación de la arquitectura normal del parénquima hasta restaurar su totalidad y como consecuencia su funcionalidad.

El impacto del estrés oxidativo en la proliferación celular como uno de los temas claves de esta investigación, nos dirigió a centrar nuestra atención en la Nxn, una proteína que censa y responde a las fluctuaciones en los niveles de ROS en el microambiente celular (Funato y Miki, 2007). Los análisis por WB e IHQ realizados para la Nxn mostraron que esta enzima responde a la administración de DEN de una forma dosis dependiente, confirmándose también este resultado por un aumento en su expresión a nivel tanto citoplasmático como nuclear. Este aumento se debe probablemente a que: a mayor dosis de DEN aumenta la producción de ROS resultantes de su metabolismo, y dada la naturaleza redox sensible de la Nxn su expresión se ve estimulada; de esta manera, el aumento en su expresión muy probablemente busca contrarrestar el desacoplamiento del complejo Nxn/Dvl que se genera por la producción de ROS. El desacoplamiento de este complejo en condiciones normales activa la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y por ende la proliferación celular; en este sentido, se puede inferir que la inducción de la sobreexpresión de Nxn busca limitar tal estímulo proliferativo. De acuerdo con nuestros resultados, la inducción de la Nxn muy probablemente pudo inhibir la proliferación en las dosis bajas de DEN; sin embargo, en la dosis de 20 mg/kg el incremento de la expresión de los marcadores de proliferación celular (Pcna, Clina D1 y Ki67) sugieren que a pesar de que Nxn mostró el mayor incremento, éste no fue suficiente para inhibir la proliferación celular. En el modelo de

regeneración hepática se observó una tendencia decreciente de la expresión de la Nxn conforme avanzan el tiempo post HP tanto en el análisis por WB como en la IHQ. Similares investigaciones mencionan que los niveles de ROS tienen un umbral máximo de producción durante las primeras horas post HP, el cual se asocia a un aumento en el metabolismo y división celular (Ueno *et al.*, 2006); lo que coincide con la sobreexpresión de la Nxn observada a las 24 horas post HP, debido probablemente a que censa el aumento de la concentración de ROS, para de esta forma contrarrestar la oxidación de la Nxn y así regular la velocidad de proliferación celular. Durante las horas posteriores la visible disminución en la expresión de la Nxn posiblemente coincide con un descenso en la concentración de ROS, lo cual da pie a su acoplamiento con Dvl por disminución de su oxidación, que a su vez permite la degradación de  $\beta$ -catenina, limitando su acumulación y por ende su translocación al núcleo. Esto da como resultado la regulación negativa de la proliferación celular conforme la regeneración hepática progresa y el hígado recupera su tamaño normal. Se presume que en el modelo de hepatocarcinogénesis su sobreexpresión es inducida por el aumento en los niveles de ROS y responde a la necesidad de inhibir la proliferación celular, mientras que el modelo de regeneración hepática su decremento responde a una disminución de los niveles de ROS, que resulta en una disminución de la señalización proliferativa conforme el parénquima se va restituyendo. En ambos modelos se aprecia la estimulación de la actividad de la Nxn en respuesta al incremento en los niveles de ROS, esto confirma lo descrito en anteriores investigaciones (Arellanes, 2013).

Para confirmar la influencia directa que ejerce la administración de DEN como un estímulo oxidante sobre la proliferación celular se midió la expresión de

otras proteínas implicadas en su regulación, tal es el caso de Pcn $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina y Ciclina D1 (Zhang *et al.*, 2011). Pcn $\alpha$  es un conocido marcador de proliferación celular localizado principalmente en el núcleo, cuya máxima expresión se observa durante la fase S del ciclo celular y que participa en la replicación del ADN (Fan *et al.*, 2016). En el análisis de la expresión de Pcn $\alpha$  se observó que su expresión se ve aumentada por la administración de DEN, especialmente con dosis superiores a los 10 mg/kg, esto se confirmó con lo observado en el análisis inmunohistoquímico donde se aprecia un aumento considerable a nivel nuclear y citoplasmico. Probablemente esto se debe a su participación en la reparación del ADN que es uno de los blancos principales de acción del DEN (Bakiri y Wagner, 2013), la sobreexpresión de Pcn $\alpha$  a su vez, antecede a la expresión de  $\beta$ -catenina y ha sido descrita en una gran variedad de tumores malignos entre los que se encuentra el CHC (Fan *et al.*, 2016).

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la principal vía implicada en la regulación de la proliferación celular (Ochoa *et al.*, 2012), por lo cual se determinó la expresión de  $\beta$ -catenina. Tanto en el análisis por WB como en el análisis por IHQ se observó un incremento en su expresión que no mostró ser dependiente de la dosis administrada de DEN, se localizó en todos los casos en la membrana celular de los hepatocitos, sin mostrar una translocación evidente al núcleo. Estos resultados sugieren que la producción de ROS inducida por DEN ejerce una acción directa sobre la actividad celular dependiente de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Lo antes mencionado concuerda con su sobreexpresión, sin embargo, parece ser que su activación requiere de la participación de otras vías de señalización debido a que a pesar de que  $\beta$ -catenina incrementa su expresión principalmente en la dosis de 20 mg/kg, la expresión de  $\beta$ -catenina en este

tratamiento; no se vio afectada; este fenómeno ya ha sido observado en otras investigaciones (Nejak-Bowen y Monga, 2011). Diversos estudios han demostrado que la activación de  $\beta$ -catenina en procesos neoplásicos regula negativamente la proliferación con la finalidad de impedir el desarrollo del CHC, y a su vez disminuye la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis hepática y la regeneración;  $\beta$ -catenina parece también proteger contra lesiones genotóxicas generadas por la administración de DEN (Zhang *et al.*, 2010; Rignall *et al.*, 2011). Debido a que  $\beta$ -catenina es un factor de transcripción que requiere de su translocación nuclear para ejercer su función, posteriores investigaciones serán necesarias para determinar si la inducción de su expresión observada en este modelo tiene un impacto en la transcripción de sus genes blanco. Al respecto, uno de sus blancos es Ciclina D1; coincidentemente, la expresión de esta proteína y de la  $\beta$ -catenina fueron incrementadas en la dosis de 20 mg/kg, lo cual sugiere que si DEN indujo la translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo, muy probablemente ésta se llevó a cabo principalmente en respuesta a dicha dosis.

La respuesta celular a estímulos oxidantes a menudo resulta en cambios en la función de proteínas como las antes mencionadas Pcn1 y  $\beta$ -catenina; esto trae como consecuencia cambios en su interacción con otras proteínas implicadas en la replicación del ADN y el ciclo celular. Ciclina D1 participa en la regulación del ciclo celular, específicamente en la transición de la fase G1 a S y participa también en el control del estado redox (Bustany, *et al.*, 2016). El análisis por WB mostró un incremento en su expresión que fue sólo significativo con la dosis más alta de DEN. Esto indica que su expresión solo obedece a la estimulación con dosis elevadas del carcinógeno, y que dicho incremento en su

expresión está directamente relacionado con el aumento de la expresión de Pcn $\alpha$  y  $\beta$ -catenina; esta última, estimula la proliferación celular a través de la activación transcripcional de genes tales como Ciclina D1. Actualmente se sabe que la alteración en su expresión conduce al crecimiento celular rápido, a la eliminación de puntos de control celular, y en última instancia, al crecimiento neoplásico (Qie y Diehl, 2016).

La estimulación de la proliferación celular también fue corroborada con otro marcador de proliferación celular, el antígeno Ki67 que se sobreexpresa únicamente durante el ciclo celular y cuya localización se restringe al núcleo (Sobecki *et al.*, 2016). En el análisis por IHQ se observa un incremento constante de su expresión conforme aumenta la dosis del carcinógeno, y su expresión máxima se observa en la dosis más alta de DEN. Esto sugiere que su expresión responde al incremento en los niveles de ROS resultantes del metabolismo de DEN. También podría deberse a una acción directa del DEN sobre la reorganización de la heterocromatina, la cual se ve comprometida en las células tumorales. En este sentido, actualmente se sabe que Ki67 participa en la reorganización de la heterocromatina, por tal motivo se le considera un biomarcador de cáncer (Cidado *et al.*, 2016).

La regeneración hepática constituye un evento crítico en el curso de las enfermedades crónicas mientras que; por un lado, es necesaria para el mantenimiento de la función hepática en un estado de inflamación y lesión crónica por otro, propicia la displasia de hepatocitos que proliferan en un medio adverso; por ejemplo, en procesos de fibrosis y cirrosis dan paso a la proliferación de hepatocitos algunos de los cuales poseen alteraciones genéticas y/o epigenéticas, alteraciones que finalmente contribuyen al

establecimiento de afecciones como el CHC (Nejak-Bowen y Monga, 2011). Por tal motivo, en esta investigación también se evaluó la respuesta de las proteínas antes mencionadas a estímulos oxidantes, debido a su papel como agentes reguladores de la proliferación celular.

Por su parte Pcná mostró en el análisis por WB y en la IHQ un incremento general en su expresión tanto nuclear como citoplásmica, condición que fue máxima a los 3 días, esta sobreexpresión nos hace suponer que al 3 día de la regeneración hepática hay un aumento en la replicación del ADN y como consecuencia en la proliferación celular, funciones en las que Pcná ejerce un papel preponderante.

Previamente se mencionó que el incremento en la expresión de Pcná es un fenómeno que precede al incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina. De acuerdo a lo observado en ambos análisis, la expresión de  $\beta$ -catenina está aumentada en los días 3 y 5 de la regeneración hepática, lo que se asocia a su mayor actividad en esos días. Dicho incremento probablemente se debe a la disminución en su degradación y no precisamente a cambios en su expresión génica (Nejak-Bowen y Monga, 2011). Además, se observó que el aumento inicial de la expresión de  $\beta$ -catenina decreció abruptamente a los 6 días, esta disminución podría deberse a una regulación negativa de la vía y la activación del complejo de destrucción, con la finalidad de evitar elevaciones sostenidas de la enzima ya que el hígado ha alcanzado su tamaño y funcionalidad normal. Anteriormente se describió que la sobreexpresión de Pcná y  $\beta$ -catenina está directamente relacionada con la sobreexpresión del regulador de proliferación celular Ciclina D1. En los análisis realizados se observó que Ciclina D1 muestra una tendencia decreciente durante los primeros días post HP, posteriormente

su expresión incrementa hasta hacerse evidente en los últimos días, lo cual nos indica que su expresión se ve disminuida inicialmente como parte de un mecanismo de adaptación que permite limitar la velocidad de crecimiento de las células y como consecuencia la proliferación celular, condición que de no ser regulada podría conducir a crecimiento incontrolado y desorganizado.

Al igual que en el modelo anterior las implicaciones del estrés oxidativo en la proliferación celular se corroboraron mediante la expresión del antígeno Ki67, de acuerdo a lo observado en la IHQ la expresión de esta enzima en el parénquima hepático se vio notoriamente aumentada hacia el día 3 de la regeneración hepática, posterior a este tiempo su expresión bajo considerablemente. Se aprecia también un aumento en el número de células en división en el días 3 post HP. Conforme esta condición se estabiliza, disminuye el número de células que entran en división con la finalidad de restaurar el tejido, posiblemente también decrece su expresión a causa de la disminución de los estímulos proliferativos entre los que se encuentran las ROS.

Otra interacción relevante de Nxn es la que realiza con Flii y Myd88, como previamente se describió dicha interacción trae como consecuencia la regulación negativa de NF- $\kappa$ B para limitar su actividad (Hayashi *et al.*, 2010). Al analizar las muestras de los ratones tratados con DEN se pudieron observar los efectos que la inducción de estrés oxidativo tiene sobre Flii y Myd88 debido posiblemente a su interacción con la proteína redox sensible Nxn. Ambas enzimas mostraron un comportamiento similar, se observó un incremento en su expresión en todas las dosis administradas del carcinógeno, este incremento fue máximo en la dosis administrada de 10 mg/kg para ambas enzimas. Los

resultados sugieren que tanto Flii como Myd88 responden al incremento en los niveles de ROS, dicho incremento podría estar directamente asociado con la sobreexpresión observada de la enzima redox sensible Nxn, como un mecanismo para mediar posiblemente la transcripción del ADN.

Se evaluó también el comportamiento de Flii y Myd88 bajo el estímulo proliferativo inducido por la HP. En el caso de la regeneración hepática su comportamiento mostró incrementos y decrementos variables a lo largo del proceso de regeneración. Nxn mostró una tendencia decreciente conforme avanzan los días post HP, por lo que proponemos que Nxn recluta en menor medida a Flii y ésta a su vez a Myd88, lo cual trae como consecuencia la regulación positiva de la transcripción del ADN. Esto podría estar relacionado con las fluctuaciones en la síntesis de ADN a lo largo del proceso de regeneración del parénquima.

En esta investigación también se determinó la modificación en el perfil de expresión de proteínas directamente vinculadas con el daño hepático. Gstp1 es una enzima que participan en la desintoxicación de sustancias endógenas, en la inactivación de carcinógenos electrofílicos, en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis (Martignano *et al.*, 2016). Por tal motivo se evaluó su nivel de expresión durante el proceso de hepatocarcinogénesis. Observamos que su expresión incrementó en respuesta a todas las dosis administradas de DEN; sorprendentemente, su inducción máxima la provocó la dosis de 5 mg/kg; además, a partir de esta dosis se observó localizada dentro del núcleo en el análisis por IHQ. En este sentido, su sobreexpresión podría deberse en primera instancia a un aumento de su actividad antioxidante debido al incremento en los niveles de ROS que se generan por la exposición a DEN. Estos resultados

confirman lo descrito por diversos estudios que indican que su expresión aberrante se observa en hepatocitos alterados que responden a la acción de carcinógenos genotóxicos, por tal motivo Gstp1 está considerado como un biomarcador de lesiones preneoplásicas (Carr, 2016; Martignano *et al.*, 2016). Aunque la presencia de Gstp1 en el núcleo ya la hemos observados en anteriores protocolos de hepatocarcinogénesis su función en ese organelo no está completamente descrito. Posteriores análisis serán necesarios para clarificar este fenómeno.

Otra enzima utilizada como un marcador de respuesta al daño hepático es la enzima Cyp2e1, debido a su alta capacidad para producir grandes cantidades de ROS, peroxinitritos y peroxidación de lípidos (Abdelmegeed *et al.*, 2015); además de ser la principal enzima encargada del metabolismo de DEN (Kaledin *et al.*, 2015). Su análisis mostró la disminución en su expresión conforme las dosis de DEN fue incrementando y como resultado su menor expresión se observó en la dosis más alta del carcinógeno. Estos resultados, contrarios a lo esperado, indican que DEN induce la inactivación de la enzima y como resultado una deficiencia en el metabolismo y eliminación de DEN. Debido a que las dosis de DEN utilizadas se encuentran por debajo de la dosis letal media, es muy posible que la inactivación de la expresión de Cyp2e1 sea una de la primeras alteraciones que sufre el parénquima hepático durante la progresión del CHC. La pérdida gradual de la expresión y actividad de esta enzima también ha sido observada en cultivos primarios de hepatocitos y en diferentes líneas celulares establecidas; además, recientemente fue reportado que la expresión de esta enzima disminuye sustancialmente en ratones viejos (Abdelmegeed *et al.*, 2016). Al respecto, está ampliamente documentado que la

probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer incrementa con la edad. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el decremento de la expresión del Cyp2e1 es uno de los eventos moleculares que DEN induce para promover el desarrollo del cáncer hepático cuando es administrado en ratones jóvenes.

Estos marcadores de daño hepático también fueron analizados para el modelo de regeneración hepática. En los análisis por WB e IHQ la enzima Gstp1 se observó incrementada en los primeros días de la regeneración pero a partir del tercer día su expresión disminuyó. En este caso la expresión de Gstp1 se encontró localizada principalmente en el núcleo durante el primer día. Este incremento inicial probablemente se debe a un aumento en los niveles de ROS que se origina por el metabolismo celular, y también a que Gstp1 participa en la regulación del ciclo y proliferación celular. Posterior a esto, muy probablemente el decremento en los niveles de ROS trae como consecuencia la disminución de la expresión de Gstp1 conforme progresa la regeneración hepática y el órgano alcanza su tamaño y funcionalidad normal.

Por su parte la expresión de Cyp2e1 mostró una tendencia decreciente hasta el día 7 de la regeneración y mostró un incremento hasta el último día evaluado, es decir, el día 10 post HP. Esto podría estar relacionado con lo descrito en otros estudios donde se observó la regulación transcripcional que ejerce la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina sobre Cyp2e1 (Gerbai-Chaloin *et al.*, 2014), como un mecanismo que limita la expresión de Cyp2e1 y por ende la producción de ROS (Abdelmegeed *et al.*, 2015). De esta forma, al limitar la generación de ROS se regula negativamente la proliferación celular y evita así el crecimiento descontrolado.

Estos resultados de forma general permiten observar la importancia del estrés oxidativo en la regulación de los procesos de proliferación celular. En ambos modelos se observa cómo el incremento en los niveles de ROS regula positiva o negativamente la expresión de la enzima Nxn, confirmando así que es una enzima que responde a los estímulos oxidantes y a las demandas del microambiente celular. En este sentido, mientras que en el modelo de hepatocarcinogénesis se estimula su expresión, en el modelo de regeneración hepática su expresión es modulada de forma intermitente. Por lo tanto, podemos sugerir que mientras en el primer modelo la sobreexpresión de Nxn forma parte de un mecanismo que busca revertir un proceso de proliferación celular aberrante, en el segundo, sus fluctuaciones responden a una regulación controlada de la proliferación celular estimulada, en parte, por los niveles de ROS presentes durante la regeneración hepática; por lo tanto, su expresión se estabiliza cuando el hígado alcanza su tamaño normal. También se comprobó que la administración de DEN en dosis que no rebasan la dosis letal media, es capaz de estimular la sobreexpresión de reguladores claves del ciclo y proliferación celular como son la expresión de Pcn,  $\beta$ -catenina, Ciclina D1 y Ki67. Estas dosis también pudieron inducir cambios evidentes en la arquitectura del parénquima hepático ya que se observó la acumulación inicial de fibras, especialmente en respuesta a la mayor dosis de DEN administrada. Esto se corroboró por el incremento en la expresión del marcador de daño hepático Gstp1, que en las células tumorales actúa como un elemento citoprotector. Además, la disminución en la expresión del Cyp2e1 se relacionó con su inactivación progresiva y en consecuencia en la deficiencia para metabolizar el DEN.

En conclusión, mediante el uso de modelos que pueden inducir la proliferación celular tanto de un contexto patológico como no patológico y que promueven el estrés oxidativo, hemos determinado por primera vez, (i) que Nxn es inducida por DEN, un hepatotóxico ampliamente conocido, lo que sugiere que podría estar jugando un papel relevante en el desarrollo del CHC, (ii) que a pesar de que su papel como regulador de la proliferación celular está caracterizado en modelos *in vitro*, nuestros resultados representan la primer evidencia de su participación en un modelo de regeneración hepática como la HP, el modelo más estudiado para caracterizar la proliferación celular normal *in vivo*. Adicionalmente, (iii) hemos encontrado que algunos componentes moleculares que interactúan con Nxn, también responden a los estímulos oxidantes inducidos en la hepatocarcinogénesis y en la regeneración hepática. Finalmente, (iv) estos resultados podrían ser la primer evidencia que estimule el planteamiento de posteriores investigaciones para determinar si Nxn tiene el potencial de ser un blanco terapéutico que contribuya en el diseño de estrategias para el tratamiento del CHC.

## 8. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos, resaltan a la vista varias preguntas que deben ser contestadas. Por ejemplo, nos inquieta saber ¿Cuál es el estatus de las interacciones Flii/Nxn/Myd88 y Nxn/Dvl durante la hepatocarcinogénesis inducida por DEN y durante la regeneración hepática post HP? ¿Cuál es el papel que desempeña Nxn en el núcleo de las células hepáticas especialmente en las mayores dosis de DEN utilizadas? ¿El incremento de la expresión de  $\beta$ -catenina también se ve reflejado en su translocación nuclear inducida en ambos modelos? ¿Es posible revertir los procesos de proliferación celular inducidos por DEN y por la HP a través de la inducción de la sobreexpresión de Nxn mediante la transfección de un vector de expresión *in vitro*? Al respecto, ya hemos diseñado una estrategia experimental para contestar estos interesantes cuestionamientos y así, clarificar la participación de Nxn en procesos tanto patológicos como no patológicos, en los cuales, aún no ha sido descrita.

## 9. REFERENCIAS

- Abdelmegeed MA, Choi Y, Ha SK, Song BJ. Cytochrome P450-2E1 promotes aging-related hepatic steatosis, apoptosis and fibrosis through increased nitroxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2016;91:188-202.
- Abdelmegeed MA, Ha SK, Choi Y, Akbar M, Song BJ. Role of CYP2E1 in mitochondrial dysfunction and hepatic tissue injury in alcoholic and non-alcoholic diseases. *Curr Mol Pharmacol.* 2015.
- Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K *et al.* NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2005;41:1272-1281.
- Arellanes RJ, Márquez RL, Pérez CJ, Fattel FS, Aguirre GJ, Villa TS. Celecoxib induces regression of putative preneoplastic lesions in rat liver. *Anticancer research.* 2006;26(2A):1271-1280.
- Arellanes RJ, Reyes GK, Shah R, Domínguez RJ, Hernandez NZ, Ramirez F *et al.* Fibrogenic actions of acetaldehyde are beta-catenin dependent but Wingless independent: a critical role of nucleoredoxin and reactive oxygen species in human hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1487-1496.
- Bakiri L, Wagner EF. Mouse models for liver cancer. *Mol Oncol.* 2013;7(2):206-223.
- Balasus D, Way M, Fusilli C, Mazza T, Morgan MY, Cervello M *et al.* The association of variants in PNPLA3 and GRP78 and the risk of developing hepatocellular carcinoma in an Italian population. *Oncotarget.* 2016;7(52):86791-86802. doi: 10.18632/oncotarget.13558
- Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, *et al.* Apc tumor suppressor gene is the “zonation-keeper” of mouse liver. *Dev Cell.* 2006;10(6):759-770.
- Bissig KD, Wieland SF, Tran P, Isogawa M, Le TT, Chisari FV *et al.* Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest.* 2010;120(3):924-930. doi:10.1172/JCI40094.
- Bogdanosa DP, Gao B, Gershwin ME. Liver Immunology. *Compr Physiol.* 2013;3(2): 567–598. doi: 10.1002/cphy.c120011
- Bustany S, Bourgeais J, Tchakarska G, Body S, Hérault O, Gouilleux F *et al.* Cyclin D1 unbalances the redox status controlling cell adhesion, migration, and drug resistance in myeloma cells. *Oncotarget.* 2016;7(29):45214-45224. doi: 10.18632/oncotarget.9901
- Carr BI. *Hepatocellular Carcinoma; Diagnosis and Treatment.* 3a. ed. Switzerland: Springer International Publishing AG; 2016.
- Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG *et al.* Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget.* 2016;7(5):6281. doi: 10.18632/oncotarget.7057
- De la Fuente GA, Rodríguez LJ, Fonseca CE. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel.* 2007;22(5):252-258.
- De March M, Merino N, Barrera-Vilarmau S, Crehuet R, Onesti S, Blanco FJ *et al.* Structural basis of human PCNA sliding on DNA. *Nature Communications.* 2017;8:13935. doi: 10.1038/ncomms13935

- Dhanasekaran R, Bandoh S, Roberts LR. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research*. 2016;5. doi:10.12688/f1000research.6946.1
- Ding S, Li C, Cheng N, Cui X, Xu X, Zhou G. Redox Regulation in Cancer Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; doi: 10.1155/2015/750798
- E-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132:2557–2576.
- El-Osta H, Circu ML. Mitochondrial ROS and apoptosis. *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease*. Springer International Publishing. 2016; doi: 10.1007/9978-3-319-42139-1\_1
- Ettarh R, Cullen A, Calamai A. NSAIDs and cell proliferation in colorectal cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(7):2007-2021.
- Fan J, Zhou X, Huang J, Wang X, Che G. Prognostic roles of PCNA expressions in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(3):5655-5665.
- Funato Y, Hayashi T, Irino Y, Takenawa T, Miki H. Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(4):737-742.
- Funato Y, Michiue T, Asashima M, Miki H. The thioredoxin-related redox-regulating protein nucleoredoxin inhibits Wnt- $\beta$ -catenin signalling through dishevelled. *Nat Cell Biol*. 2006;8(5):501-508.
- Funato Y, Miki H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(8):1035-1058.
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A *et al*. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J*. 2012;53(1):E55-69.
- Geneser F. *Histología, sobre bases biomoleculares*. 3a. ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana; 2015.
- Gerbal-Chaloin S, Dumé AS, Briolotti P, Klieber S, Raulet E, Duret C *et al*. The WNT/ $\beta$ -catenin pathway is a transcriptional regulator of CYP2E1, CYP1A2, and aryl hydrocarbon receptor gene expression in primary human hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2014;86(6):624-634.
- González HM, Sánchez ÁJ. Consenso mexicano de diagnóstico y manejo del carcinoma hepatocelular. *Rev Gastroenterol Mex*. 2014;79(4):250-262.
- Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48): 6035-604. doi:10.3748/wjg.v16.i48.6035
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
- Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC *et al*. Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. *Cancer Cell*. 2015;27(2):211-22.
- Hayashi H, Sakai K, Baba H, Sakai T. Thrombospondin-1 is a novel negative regulator of liver regeneration after partial hepatectomy through transforming growth factor-beta1 activation in mice. *Hepatology*. 2012;55:1562-1573.
- Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, Morinaka A, Sakamoto R, Ichise H *et al*. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment

- of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J Biol Chem.* 2010;285(24):18586-18593.
- He L, Tian DA, Li PY, He XX. Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations. *Oncotarget.* 2015;6(27):23306–23322.doi:10.18632/oncotarget.4202
  - He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa LT *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998;281(5382):1509-1512.
  - Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine.* 6a ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
  - Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Baumert TF, Chung RT. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2014;61(1):S79-90.
  - Jiang X, Charlat O, Zamponi R, Yang Y, Cong F. Dishevelled promotes Wnt receptor degradation through recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2015;58(3):522-533.
  - Kaledin VI, Il'nitskaya SI, Vasyunina EA, Popova NA, Bogdanova LA, Perepechaeva ML *et al.* The effect of changes in CYP2E1 activity in the liver on toxicity and carcinogenicity of diethylnitrosamine in mice. *Biophysics.* 2015;60(6):970-976.
  - Katoonizadeh A, Poustchi H, Malekzadeh R. Hepatic progenitor cells in liver regeneration: current advances and clinical perspectives. *Liver Int.* 2014;34:1464–1472. doi: 10.1111/liv.12573
  - Khabaz MN, Buhmeida A, Ghabrah T, Qureshi IA, Butt NS, Al-Maghrabi B *et al.* Cyclin D1 expression is associated with stage, grade and survival in urinary bladder carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(12):23482-23490.
  - Kopecki Z, Yang GN, Jackson JE, Melville EL, Calley MP, Murrell DF *et al.* Cytoskeletal protein Flightless I inhibits apoptosis, enhances tumor cell invasion and promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression. *Oncotarget.* 2015;6(34):36426–36440.doi: 10.18632/oncotarget.5536
  - Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367(1):116-123.
  - Kuijk EW, Rasmussen S, Blokzijl F, Huch M, Gehart H, Toonen P *et al.* Generation and characterization of rat liver stem cell lines and their engraftment in a rat model of liver failure. *Sci Rep.* 2016;6:22154. doi: 10.1038/srep22154
  - Kushida M, Kamendulis LM, Peat TJ, Klaunig JE. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. *Toxicol Pathol.* 2011;39(5):776-786.
  - Lechward K, Sugajska E, De Baere I, Goris J, Hemmings BA, Zolnierowicz S. Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* 2006;580(15):3631-3637.
  - Leung TM, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013;58(2):395-398.
  - Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016;64(1):S84-101.doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.021
  - Li T, Zhao XP, Wang LY, Gao S, Zhao J, Fan YC *et al.* Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013;10(6):683-690.

- Lin J, Redies C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Dev Genes Evol.* 2012;222(6):369-376.
- Liu RM, Gaston PK. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:1-15.
- Macedo MA. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2012;15(2):97-103.
- Macías JR, Beltrán O, Vasquez VR, Salcido ME, Martínez PA, Ruiz MB *et al.* The effect of caffeic acid phenethyl ester analogues in a modified resistant hepatocyte model. *Anticancer drugs.* 2013;24(4):394-405.
- Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429.
- Martignano F, Gurioli G, Salvi S, Calistri D, Costantini M, Gunelli R *et al.* GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications. *Dis Markers.* 2016. doi: 10.1155/2016/4358292
- McCreery MQ, Balmain A. Chemical Carcinogenesis Models of Cancer: Back to the Future. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1:295–312.
- Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997;276(5309):60-66.
- Mu X, Español-Suñer R, Mederacke I, Affò S, Manco R, Sempoux C *et al.* Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. *The J Clin Invest.* 2015;125(10):3891-903. doi:10.1172/JCI77995
- Müller L, Funato Y, Miki H, Zimmermann R. An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease. *FEBS Lett.* 2011;585(4):596-600.
- Muñoz E, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-496.
- Nakao LS, Everley RA, Marino SM, Lo SM, de Souza LE, Gygi SP *et al.* Mechanism-based proteomic screening identifies targets of thioredoxin-like proteins. *J Biol Chem.* 2015;290(9):5685-5695.
- Nantasanti S, Toussaint MJ, Youssef SA, Tooten PC, Bruin A. Rb and p53 Liver Functions Are Essential for Xenobiotic Metabolism and Tumor Suppression. *PLoS One.* 2016;1(3): e0150064. doi: 10.1371/journal.pone.0150064
- National Research Council (US). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 8a. ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Nejak-Bowen KN, Monga SP. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.* 2011;21(1):44-58.
- Nelsen CJ, Rickheim DG, Timchenko NA, Stanley MW, Albrecht JH. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. *Cancer Res.* 2001;61(23):8564-8568.
- Ochoa HA, Juárez VC, Rosales RM, Barros NP. La vía de señalización Wnt-B-catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos.* 2012;80(4):389-398.
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(2):61-74.
- Organización mundial de la salud OMS. *Cáncer; Nota descriptiva.* 2017.

- Park JW, Chen M, Colombo M, Roberts LR, Schwartz M, Chen PJ, et al. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int.* 2015;35(9): 2155–2166. doi: 10.1111/liv.12818
- Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2016;8(9): 421-438.
- Patil MA, Lee SA, Macias E, Lam ET, Xu C, Jones KD, et al. Role of Cyclin D1 as a Mediator of c-Met–and  $\beta$ -Catenin–Induced Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2009;69(1):253-261.
- Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med.* 2016;94:1313. doi: 10.1007 / s00109-016-1475-3
- Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp.* 1977:31-59.
- Rai N, Sarkar M, Raha S. Piroxicam, a traditional non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) causes apoptosis by ROS mediated Akt activation. *Pharmacol Rep.* 2015;67(6):1215-1223.
- Rignall B, Braeuning A, Buchmann A, Schwarz M. Tumor formation in liver of conditional  $\beta$ -catenin-deficient mice exposed to a diethylnitrosamine/phenobarbital tumor promotion regimen. *Carcinogenesis.* 2011;32(1):52-57.
- Salaverry O. Cancer etymology and its historical curious course. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013;30(1):137-41.
- Salcido ME, Sierra A, Beltrán O, Macías JR, Villa S. Celecoxib enhances the detoxification of diethylnitrosamine in rat liver cancer. *World J Gastroenterol.* 2009;15(19):2345-2350. doi: 10.3748 / wjg.15.2345
- Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C *et al.* Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology.* 2005;41(2):307-314.
- Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiological Trends and Risk Factors. *Dig Dis.* 2009;27:80–92.
- Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology.* 2017;152:745–761.
- Sibulesky L. Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease.* 2013;2(4):61–63.
- Sid B, Verrax J, Calderon PB. Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic Res.* 2013; 47(11): 894–904.
- Simmon VF, Rosenkranz HS, Zeiger E, Poirier LA. Mutagenic activity of chemical carcinogens and related compounds in the intraperitoneal host-mediated assay. *J Natl Cancer Inst.* 1979;62(4):911-918.
- Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisi N, Nicolas E, Lleres D *et al.* The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife.* 2016;5:e13722. doi: 10.7554/eLife.13722
- Stoimenov I, Thomas H. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans.* 2009;37:605-13. doi: 10.1042/BST0370605
- Sung MW, Lee DY, Park SW, Oh SM, Choi JJ, Shin ES *et al.* Celecoxib enhances the inhibitory effect of 5-FU on human squamous cell carcinoma proliferation by ROS production. *Laryngoscope.* 2016;127(4):117-123.

- Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J.* 1996;10(4):413-427.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(9):4350-4354.
- Ueno S, Campbell J, Fausto N. Reactive oxygen species derived from NADPH oxidase system is not essential for liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res.* 2006;136:260-265.
- Uribe EM, García SM, Chávez TN, Román SJ. Carcinoma hepatocelular. *Rev Gastroenterol Mex.* 2010;2(75):168-176.
- 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(1):57-81.
- Waters MD, Thomas RS. *Toxicogenomics in Predictive Carcinogenicity.* Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry; 2016.
- Zhang NY, Qi M, Zhao L, Zhu MK, Guo J, Liu J *et al.* Curcumin Prevents Aflatoxin B1 Hepatotoxicity by Inhibition of Cytochrome P450 Isozymes in Chick Liver. *Toxins.* 2016;8(11):327. doi:10.3390/toxins8110327
- Zhang XF, Tan X, Zeng G, Misse A, Singh S, Kim Y *et al.* Conditional  $\beta$ -catenin loss in mice promotes chemical hepatocarcinogenesis: Role of oxidative stress and platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ /phosphoinositide 3-kinase signaling. *Hepatology.* 2010;52(3):954-965.
- Zhang Y, Du Y, Le W, Wang K, Kieffer N, Zhang J. Redox Control of the Survival of Healthy and Diseased Cells. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(11):2867-2908. doi: 10.1089/ars.2010.3685

## 10. ANEXOS

### Anexo 1. Protocolo de Ácido Bicinconínico (ABC)

#### Curva estándar

| Reactivos                  | Volumen (µl) | Volumen x Duplicado (µl) |
|----------------------------|--------------|--------------------------|
| Agua                       | 15           | 30                       |
| Buffer de lisis específico | 5            | 10                       |
| Solución estándar          | 5            | 10                       |
| <b>Total</b>               | <b>25</b>    | <b>50</b>                |

#### Muestras

| Reactivos    | Volumen (µl) | Volumen x Duplicado (µl) |
|--------------|--------------|--------------------------|
| Agua         | 20           | 40                       |
| Muestras     | 5            | 10                       |
| <b>Total</b> | <b>25</b>    | <b>50</b>                |

1. Agregar las cantidades indicadas en tubos eppendorf de 0.6 ml.
2. Preparación de la mezcla de ABC y sulfato de cobre (Relación 50:1).
  - a. Considerar todos los puntos de la curva estándar más el número de muestras más uno
3. Agregar 200 µl de la mezcla ABC y sulfato de cobre a los tubos de la curva estándar y las muestras, mezclar.
  - a. Volumen final en cada uno de los tubos= 250 µl
4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Unificar la mezcla mediante agitación.
6. Depositar la mezcla en una placa de 96 pozos, colocar 115 µl del tubo A de la curva estándar en el primer pozo y el excedente en el pozo contiguo, así sucesivamente con cada uno de los elementos de la curva estándar y de la muestra.
7. Lectura de la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro

**Preparación de la Curva Estándar a partir de Albúmina (BSA, 2 µg/ µl)**

| <b>Vial</b> | <b>Volumen de agua (µl)</b> | <b>Volumen de solución Stock (BSA, 2 µg/ µl)</b> | <b>Concentración final (µg/ µl)</b> |
|-------------|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| <b>A</b>    | 0                           | 300 del Stock                                    | 2                                   |
| <b>B</b>    | 125                         | 375 del Stock                                    | 1.5                                 |
| <b>C</b>    | 325                         | 325 del Stock                                    | 1                                   |
| <b>D</b>    | 175                         | 175 de la dilución B                             | 0.75                                |
| <b>E</b>    | 325                         | 325 de la dilución C                             | 0.5                                 |
| <b>F</b>    | 325                         | 325 de la dilución E                             | 0.25                                |
| <b>G</b>    | 325                         | 325 de la dilución F                             | 0.125                               |
| <b>H</b>    | 400                         | 100 de la dilución G                             | 0.025                               |
| <b>I</b>    | 400                         | 0  | 0= Blanco                           |

## Anexo 2. Tabla de cuantificación de proteínas del modelo de administración de DEN

| Grupos        | Abs1 | Abs2 | Abs Prom | [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ] | Factor dil 1 a 15 | ug en alic. 100 ul | más buffer carga 5X, ul | [ug/ul] en 125 ul | para 30ug tomar:ul |
|---------------|------|------|----------|-------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>CC1</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 6.7               | 670.5              | 25                      | 5.4               | 5.6                |
| <b>D2.5-1</b> | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 5.2               | 523.6              | 25                      | 4.2               | 7.2                |
| <b>D5-1</b>   | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 5.1               | 514.6              | 25                      | 4.1               | 7.3                |
| <b>D10-1</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 6.0               | 604.1              | 25                      | 4.8               | 6.2                |
| <b>D20-1</b>  | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.2                           | 3.7               | 366.9              | 25                      | 2.9               | 10.2               |
| <b>D40-1</b>  | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.2                           | 3.5               | 353.5              | 25                      | 2.8               | 10.6               |
| <b>CC2</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.5                           | 7.1               | 707.0              | 25                      | 5.7               | 5.3                |
| <b>D2.5-2</b> | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.2                           | 2.9               | 290.9              | 25                      | 2.3               | 12.9               |
| <b>D5-2</b>   | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.6               | 559.4              | 25                      | 4.5               | 6.7                |
| <b>D10-2</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 5.2               | 519.1              | 25                      | 4.2               | 7.2                |
| <b>D20-2</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.5               | 550.4              | 25                      | 4.4               | 6.8                |
| <b>D40-2</b>  | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.1                           | 1.7               | 174.5              | 25                      | 1.4               | 21.5               |
| <b>CC3</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.5                           | 7.7               | 769.7              | 25                      | 6.2               | 4.9                |
| <b>D2.5-3</b> | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.3                           | 3.9               | 393.8              | 25                      | 3.2               | 9.5                |
| <b>D5-3</b>   | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.3                           | 3.8               | 375.9              | 25                      | 3.0               | 10.0               |
| <b>D10-3</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.4               | 541.5              | 25                      | 4.3               | 6.9                |
| <b>D20-3</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 4.9               | 492.2              | 25                      | 3.9               | 7.6                |
| <b>CC4</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 6.0               | 599.6              | 25                      | 4.8               | 6.3                |
| <b>D2.5-4</b> | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.3                           | 3.9               | 393.8              | 25                      | 3.2               | 9.5                |
| <b>D5-4</b>   | 0.0  | 0.1  | 0.0      | 0.3                           | 4.1               | 407.2              | 25                      | 3.3               | 9.2                |
| <b>D10-4</b>  | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.3                           | 4.0               | 402.7              | 25                      | 3.2               | 9.3                |
| <b>D20-4</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 4.6               | 460.9              | 25                      | 3.7               | 8.1                |
| <b>CC5</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 4.7               | 474.3              | 25                      | 3.8               | 7.9                |
| <b>D2.5-5</b> | 0.0  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 4.8               | 478.8              | 25                      | 3.8               | 7.8                |
| <b>D5-5</b>   | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 5.0               | 501.2              | 25                      | 4.0               | 7.5                |
| <b>D10-5</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.3               | 532.5              | 25                      | 4.3               | 7.0                |
| <b>D20-5</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 4.7               | 465.4              | 25                      | 3.7               | 8.1                |
| <b>CC6</b>    | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 6.0               | 595.2              | 25                      | 4.8               | 6.3                |
| <b>D2.5-6</b> | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.7               | 568.3              | 25                      | 4.5               | 6.6                |
| <b>D5-6</b>   | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.4                           | 5.5               | 550.4              | 25                      | 4.4               | 6.8                |
| <b>D10-6</b>  | 0.1  | 0.1  | 0.1      | 0.3                           | 5.1               | 505.7              | 25                      | 4.0               | 7.4                |
| <b>D20-6</b>  | 0.0  | 0.0  | 0.0      | 0.3                           | 4.1               | 407.2              | 25                      | 3.3               | 9.2                |

### Anexo 3. Tabla de cuantificación de proteínas del modelo de regeneración hepática

| Grupos        | Abs1 | Abs2 | Abs Prom | [µg/µl] | Factor dil 1 a 5 | ug en alic. de 100 ul | más buffer carga 5X, ul | [ug/ul] en 125 ul | para 30ug tomar:ul |
|---------------|------|------|----------|---------|------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>C1</b>     | 0.19 | 0.17 | 0.18     | 1.056   | 5.280            | 528.0                 | 25                      | 4.22              | 7.1                |
| <b>HP6H-1</b> | 0.21 | 0.18 | 0.20     | 1.152   | 5.758            | 575.8                 | 25                      | 4.61              | 6.5                |
| <b>HP1-1</b>  | 0.25 | 0.25 | 0.25     | 1.480   | 7.399            | 739.9                 | 25                      | 5.92              | 5.1                |
| <b>HP2-1</b>  | 0.19 | 0.19 | 0.19     | 1.104   | 5.519            | 551.9                 | 25                      | 4.42              | 6.8                |
| <b>HP3-1</b>  | 0.25 | 0.25 | 0.25     | 1.480   | 7.399            | 739.9                 | 25                      | 5.92              | 5.1                |
| <b>HP4-1</b>  | 0.14 | 0.14 | 0.14     | 0.829   | 4.147            | 414.7                 | 25                      | 3.32              | 9.0                |
| <b>HP5-1</b>  | 0.2  | 0.19 | 0.19     | 1.140   | 5.698            | 569.8                 | 25                      | 4.56              | 6.6                |
| <b>HP6-1</b>  | 0.18 | 0.17 | 0.18     | 1.029   | 5.146            | 514.6                 | 25                      | 4.12              | 7.3                |
| <b>HP7-1</b>  | 0.27 | 0.26 | 0.26     | 1.563   | 7.816            | 781.6                 | 25                      | 6.25              | 4.8                |
| <b>HP10-1</b> | 0.22 | 0.23 | 0.23     | 1.345   | 6.727            | 672.7                 | 25                      | 5.38              | 5.6                |
| <b>C2</b>     | 0.24 | 0.25 | 0.25     | 1.453   | 7.264            | 726.4                 | 25                      | 5.81              | 5.2                |
| <b>HP6H-2</b> | 0.24 | 0.25 | 0.24     | 1.444   | 7.220            | 722.0                 | 25                      | 5.78              | 5.2                |
| <b>HP1-2</b>  | 0.22 | 0.22 | 0.22     | 1.298   | 6.489            | 648.9                 | 25                      | 5.19              | 5.8                |
| <b>HP2-2</b>  | 0.24 | 0.23 | 0.23     | 1.384   | 6.921            | 692.1                 | 25                      | 5.54              | 5.4                |
| <b>HP3-2</b>  | 0.22 | 0.22 | 0.22     | 1.298   | 6.489            | 648.9                 | 25                      | 5.19              | 5.8                |
| <b>HP4-2</b>  | 0.15 | 0.15 | 0.15     | 0.874   | 4.371            | 437.1                 | 25                      | 3.50              | 8.6                |
| <b>HP5-2</b>  | 0.20 | 0.19 | 0.20     | 1.152   | 5.758            | 575.8                 | 25                      | 4.61              | 6.5                |
| <b>HP6-2</b>  | 0.23 | 0.23 | 0.23     | 1.357   | 6.787            | 678.7                 | 25                      | 5.43              | 5.5                |
| <b>HP7-2</b>  | 0.19 | 0.18 | 0.19     | 1.092   | 5.459            | 545.9                 | 25                      | 4.37              | 6.9                |
| <b>HP10-2</b> | 0.22 | 0.2  | 0.21     | 1.235   | 6.175            | 617.5                 | 25                      | 4.94              | 6.1                |
| <b>C3</b>     | 0.29 | 0.3  | 0.30     | 1.766   | 8.831            | 883.1                 | 25                      | 7.06              | 4.2                |
| <b>HP6H-3</b> | 0.24 | 0.23 | 0.23     | 1.378   | 6.891            | 689.1                 | 25                      | 5.51              | 5.4                |
| <b>HP1-3</b>  | 0.18 | 0.19 | 0.19     | 1.089   | 5.445            | 544.5                 | 25                      | 4.36              | 6.9                |
| <b>HP2-3</b>  | 0.22 | 0.21 | 0.22     | 1.277   | 6.384            | 638.4                 | 25                      | 5.11              | 5.9                |
| <b>HP3-3</b>  | 0.29 | 0.23 | 0.23     | 1.337   | 6.683            | 668.3                 | 25                      | 5.35              | 5.6                |
| <b>HP4-3</b>  | 0.23 | 0.24 | 0.24     | 1.393   | 6.966            | 696.6                 | 25                      | 5.57              | 5.4                |
| <b>HP5-3</b>  | 0.16 | 0.2  | 0.18     | 1.071   | 5.355            | 535.5                 | 25                      | 4.28              | 7.0                |
| <b>HP6-3</b>  | 0.23 | 0.22 | 0.23     | 1.345   | 6.727            | 672.7                 | 25                      | 5.38              | 5.6                |
| <b>HP7-3</b>  | 0.17 | 0.17 | 0.17     | 1.008   | 5.042            | 504.2                 | 25                      | 4.03              | 7.4                |
| <b>C4</b>     | 0.33 | 0.32 | 0.32     | 1.894   | 9.472            | 947.2                 | 25                      | 7.58              |                    |
| <b>HP6H-4</b> | 0.24 | 0.24 | 0.24     | 1.411   | 7.055            | 705.5                 | 25                      | 5.64              | 5.3                |
| <b>HP1-4</b>  | 0.20 | 0.20 | 0.20     | 1.193   | 5.967            | 596.7                 | 25                      | 4.77              | 6.3                |
| <b>HP2-4</b>  | 0.28 | 0.27 | 0.27     | 1.605   | 8.025            | 802.5                 | 25                      | 6.42              | 4.7                |
| <b>HP3-4</b>  | 0.24 | 0.23 | 0.23     | 1.375   | 6.876            | 687.6                 | 25                      | 5.50              | 5.5                |
| <b>HP4-4</b>  | 0.15 | 0.15 | 0.15     | 0.859   | 4.296            | 429.6                 | 25                      | 3.44              | 8.7                |
| <b>HP5-4</b>  | 0.22 | 0.22 | 0.22     | 1.289   | 6.444            | 644.4                 | 25                      | 5.16              | 5.8                |
| <b>HP6-4</b>  | 0.20 | 0.22 | 0.21     | 1.244   | 6.220            | 622.0                 | 25                      | 4.98              | 6.0                |
| <b>HP7-4</b>  | 0.15 | 0.15 | 0.15     | 0.892   | 4.460            | 446.0                 | 25                      | 3.57              | 8.4                |
| <b>HP10-4</b> | 0.21 | 0.18 | 0.19     | 1.131   | 5.653            | 565.3                 | 25                      | 4.52              | 6.6                |
| <b>C5</b>     | 0.27 | 0.26 | 0.26     | 1.533   | 7.667            | 766.7                 | 25                      | 6.13              | 4.9                |
| <b>HP6H-5</b> | 0.28 | 0.29 | 0.28     | 1.683   | 8.413            | 841.3                 | 25                      | 6.73              | 4.5                |
| <b>HP1-5</b>  | 0.23 | 0.23 | 0.23     | 1.348   | 6.742            | 674.2                 | 25                      | 5.39              | 5.6                |
| <b>HP2-5</b>  | 0.31 | 0.31 | 0.31     | 1.805   | 9.024            | 902.4                 | 25                      | 7.22              | 4.2                |
| <b>HP3-5</b>  | 0.05 | 0.05 | 0.04     | 0.242   | 1.208            | 120.8                 | 25                      | 0.97              | 31.0               |
| <b>HP4-5</b>  | 0.18 | 0.18 | 0.18     | 1.068   | 5.340            | 534.0                 | 25                      | 4.27              | 7.0                |
| <b>HP5-5</b>  | 0.17 | 0.17 | 0.17     | 0.98    | 4.922            | 492.2                 | 25                      | 3.94              | 7.6                |
| <b>HP6-5</b>  | 0.25 | 0.25 | 0.25     | 1.47    | 7.369            | 736.9                 | 25                      | 5.89              | 5.1                |
| <b>HP7-5</b>  | 0.15 | 0.15 | 0.15     | 0.87    | 4.326            | 432.6                 | 25                      | 3.46              | 8.7                |
| <b>HP10-5</b> | 0.23 | 0.21 | 0.21     | 1.27    | 6.339            | 633.9                 | 25                      | 5.07              | 5.9                |