



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de un modelo de
hepatocarcinogénesis en el ratón**

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

Sergio Fuentes Hernandez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jaime Arellanes Robledo



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres Sergio Fuentes Zepeda y Lourdes Hernández Marín quienes con todo su esfuerzo me permitieron alcanzar esta meta. A mi padre por siempre enseñarme a no ponerme ninguna barrera y seguir mis sueños. A mi madre por inculcarme que la magnitud del esfuerzo se refleja en las victorias; entre más grande el esfuerzo más dulce la victoria. Muchas gracias por sus sacrificios y regaños; este y los futuros logros son y serán de ustedes porque todo lo que soy es por ustedes.

A toda mi familia, abuelos, tíos, primos Fuentes, Hernández, Marín y Zepeda por el apoyo que, aunque crean fue mínimo en verdad lo valoro y les agradezco, todos son parte de esto.

A mi hermana Jessica Lizbeth Fuentes Hernández por apoyarme cuando siempre que la necesite y para motivarla a alcanzar sus metas.

A mi compañera intelectual y de vida Alexia Viridiana Montes Aparicio, por su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, por siempre tener las palabras adecuadas para motivarme a seguir adelante y por las futuras metas juntos.

A mis amigos de laboratorio Areli, Brisa, Dafne, Javier y Viridiana por amenizar las horas de trabajo, por sus consejos y por las largas caminatas. A mis amigos de la licenciatura por compartir grandes ideas, alegrías y frustraciones.

Al Dr. Arellanes por confiar tanto en mí y demostrarme con ejemplo el valor de la humildad; por seguir creciendo juntos.

Agradecimientos institucionales

A mi alma máter, la Facultad de Ciencias de la UNAM, sobre todo al personal que con toda dedicación se encarga del buen funcionamiento de la biblioteca, centro de cómputo, laboratorios de prácticas y de la gestión administrativa. A todos los profesores que me inculcaron el razonamiento crítico, antirreduccionista y sociobiológico.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Institución donde se realizó esta tesis. En especial, al Laboratorio de Enfermedades Hepáticas a cargo del Dr. Julio Isael Pérez Carreón.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Institución que a través del Dr. Emérito Saúl Villa Treviño, me permitió el uso de animales de experimentación para desarrollar satisfactoriamente este proyecto.

Esta tesis fue realizada con los financiamientos No: 0114-14, (CINVESTAV-IPN) y 06-2017-I, (INMEGEN). Aprobados al Dr. Jaime Arellanes Robledo.

Agradecimientos

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo por brindarme la oportunidad y confianza de trabajar en sus proyectos, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. Sobre todo, por su humildad y paciencia.

Al Dr. Julio Isael Pérez, por permitirme realizar mi proyecto de tesis en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas a su cargo.

Al Dr. Emérito Saúl Villa Treviño por darme la confianza de trabajar en su laboratorio en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

A la QFB. Norma Areli López Hernández, técnico del laboratorio de Enfermedades hepáticas, por su asistencia técnica durante el desarrollo de esta tesis.

A los QFB. Sergio Hernández García y Eunice Romo; y a los Técnicos Leobardo Molina García y Alejandro Cruz Hernández, por su gran apoyo y asistencia técnica para la obtención del tejido de los animales de experimentación, realizada en el laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Adolfo Sierra Santoyo y a la Q.F.B. Ma. de Lourdes López González por su asistencia técnica para la determinación de parámetros del Cyp2e1, realizada en el laboratorio 17 del Departamento de Toxicología del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Jorge Fernández, a los MVZ. Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno, Benjamín E. Chávez Álvarez, María A. López López y Alberto Rojo García, y a la Srta. María T. Hernández Moreno, por el excelente trato y por su invaluable apoyo en el cuidado de los animales de laboratorio (Bioterio del CINVESTAV-IPN) utilizados en este proyecto de tesis.

Al personal de la Unidad de Histología del INMEGEN conformado por N. Belem Gabiño López y Ricardo Nava Monroy, por su apoyo y asistencia técnica durante el desarrollo de mis experimentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedades Hepáticas del INMEGEN Alexia, Areli, Brisa, Dafne, David, Dulce, Javier, Julia, Osiris y Paultete, por sus críticas constructivas realizadas a mi proyecto durante nuestros seminarios.

Índice

Resumen	7
Abstract	8
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Cáncer hepático	9
1.2. Carcinoma hepatocelular	9
1.3. Estrés oxidativo y carcinoma hepatocelular	10
1.4. Proliferación celular en la carcinogénesis	11
1.5. Apoptosis en la carcinogénesis	12
1.6. La glutatión S-transferasa Pi 1 como marcador de hepatocarcinogénesis	12
1.7. Modelos animales	13
1.8. Hepatocarcinogénesis experimental	13
1.9. Hepatocarcinogénesis inducida por la DEN	14
1.10. Metabolismo de la DEN	16
1.11. Hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en un modelo de ratón	17
Capítulo 2. Planteamiento del problema	
2.1 Hipótesis	19
2.2 Objetivo general	19
2.3 Objetivos particulares	20
Capítulo 3. Materiales y métodos	
3.1 Animales	21
3.2 Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN	21
3.2.1 Cinética de administración de la DEN	21
3.2.2 Eutanasia	22
3.2.3 Obtención y conservación del tejido hepático	22
3.3 Análisis de la arquitectura hepática mediante tinción tricrómica de Masson y H&E	23
3.4 Análisis del nivel de expresión proteica mediante Western Blot	24
3.4.1 Extracción de proteínas	24
3.4.2 Cuantificación de proteínas	24
3.4.3 Electroforesis	25
3.4.4 Transferencia de proteínas	26
3.4.5 Inmunodetección específica	26
3.5 Análisis por inmunohistoquímica	27
3.5.1 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67	28
3.6 Co-localización proteica por inmunofluorescencia	28
3.7 Determinación del daño oxidativo en el hígado del ratón	29
3.7.1 Niveles de especies EROs	30
3.7.2 Niveles de 4-HNE	31
3.8 Análisis estadísticos	31

Capítulo 4. Resultados	
4.1 Efecto de la DEN en el peso corporal	32
4.2 Variación en el peso relativo del hígado	32
4.3 Daño al tejido hepático	34
4.3.1 Daño en la arquitectura tisular	35
4.3.2 Efecto de la DEN en la fibrogénesis	37
4.4 Efecto de la DEN en la proliferación celular	39
4.4.1 Localización tisular del marcador de proliferación Ki67	39
4.4.2 Co-localización de los marcadores de proliferación Ki67 y PCNA	43
4.5 Efecto de la DEN sobre la expresión del marcador de hepatocarcinogénesis Gstp1	46
4.6 Efecto de la DEN sobre el proceso de apoptosis celular	49
4.7 Metabolismo de la DEN en el ratón	51
4.8 Producción de EROs	54
4.9 Efecto de la DEN en la producción de 4-HNE	55
Capítulo 5. Discusión	56
Capítulo 6. Conclusiones	64
Capítulo 7. Perspectivas	65
Referencias	68
Anexos	69

Resumen

Introducción: El carcinoma hepatocelular (CHC) es el segundo cáncer más letal a nivel mundial. Para reproducir su desarrollo cronológicamente, se han utilizado diferentes modelos en roedores, los cuales consisten en la administración de agentes hepatocarcinogénicos como la dietilnitrosamina (DEN). En el ser humano, esta enfermedad se desarrolla tras la exposición prolongada a pequeñas cantidades de diferentes agentes etiológicos, incluida la DEN. En esta investigación caracterizamos un modelo de CHC inducido por la administración constante de dosis bajas de DEN en el ratón; de utilidad para estudiar tanto el desarrollo del CHC como su promoción por el efecto sinérgico de la exposición a pequeñas cantidades de otros agentes hepatotóxicos.

Objetivo: Desarrollar un modelo experimental en el ratón, que reproduzca el desarrollo del CHC de una manera semejante a como ocurre en el ser humano.

Metodología: Ratones macho C57BL/6 fueron tratados con 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal, dos veces por semana, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Posteriormente, mediante análisis histopatológicos y de biología molecular determinamos el efecto de la DEN a través de marcadores de hepatocarcinogénesis, de proliferación celular y apoptosis; del metabolismo de la DEN y del daño oxidativo producido por este carcinógeno.

Resultados: La dosis de DEN de mayor efectividad para inducir la hepatocarcinogénesis fue la de 20 mg/kg ya que indujo la producción de fibras de colágeno, tumores hepáticos y metástasis pulmonar (en el 60% de los animales) a las 18 semanas de administración. Aunque, la expresión del marcador tumoral Gstp1 y de una de las enzimas que metaboliza la DEN, el Cyp2e1, fueron inducidas por las dosis de 2.5 y 5 mg/kg; éstos disminuyeron con la dosis de 20 mg/kg. Por su parte, mientras que la expresión de los marcadores de proliferación Ki67 y PCNA fue incrementada; la de la pro-caspasa 3 se observó disminuida en todas las dosis evaluadas. Estos parámetros estuvieron asociados a un incremento tanto de las especies reactivas (EROs) como de la producción de aductos del 4-hidroxinonanal (4-HNE), un marcador de daño oxidativo.

Conclusión: Nuestros resultados indican que mientras la dosis de 20 mg/kg de DEN reproduce la progresión del CHC, las de 2.5 y 5 mg/kg podrían ser útiles para determinar el efecto sinérgico de este carcinógeno con otros agentes hepatotóxicos como el etanol; con la finalidad de estudiar blancos terapéuticos antes o en un periodo no mayor a las dieciocho semanas de exposición a la DEN.

Abstract

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most lethal cancer worldwide. To chronologically reproduce its progression, several murine models have been developed using hepatocarcinogenic agents such as high diethylnitrosamine (DEN) doses. However, in human the HCC appears after a long exposition period to small amounts of different etiological agents including DEN. Thus, we characterized a HCC experimental model administering low DEN doses to determine the HCC induction by the synergic effect of low amounts of hepatotoxic agents.

Aim: To develop an experimental mouse model that better reproduces the HCC as occurs in humans.

Methods: C57BL/6 male mice were subjected to 2.5, 5, and 20 DEN mg/kg body weight (twice/week, i.p.), during 6, 10, 14 and 18 weeks. Then, we determined its effect on HCC markers, cell proliferation and apoptosis, DEN metabolism and oxidative damage, through molecular biology and histopathological analyses.

Results: DEN (20 mg/kg) induced collagen fibers production, tumors and lung metastasis (60% animals) after 18 weeks. Although the expression of the tumor marker Gstp1 and that of Cyp2e1, a DEN metabolizing enzyme, were induced by DEN at 2.5 and 5 mg/kg, both decreased with 20 mg/kg. Interestingly, their expression were mainly located in nodular areas. While the levels expression of proliferation markers Ki67 and PCNA were increased, procaspase-3 levels was decreased with all DEN doses. These results are associated to increased levels of both Reactive Oxygen Species (ROS) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) adducts, an oxidative injury marker.

Conclusion: Our results indicate that while DEN at 20 mg/kg reproduces the HCC progression, at 2.5, 5 mg/kg, it might be useful to determine the synergic effects of hepatotoxic agents such as DEN/ethanol. This in order to look for therapeutic targets either earlier or up to 18 weeks after DEN exposure.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cáncer hepático

Para el ser humano el principal problema de salud a nivel mundial es el cáncer; en países económicamente desarrollados es la principal causa de muerte y en países en desarrollo ocupa el segundo lugar. Además, la incidencia del cáncer está en constante incremento debido al envejecimiento y crecimiento de la población; así como también, por el estilo de vida y por los hábitos de algunas poblaciones los cuales favorecen el desarrollo del cáncer incluyendo el tabaquismo, el sedentarismo y las dietas no equilibradas¹.

El cáncer de hígado es el quinto más frecuente en hombres y el noveno en mujeres con aproximadamente 500,000 y 200,000 casos nuevos anuales respectivamente; sin embargo, éste escala a la segunda posición en muerte por año. En general, las personas diagnosticadas con cáncer de hígado tienen un pronóstico de vida poco alentador; la relación entre la incidencia y mortalidad es de 0.95; ésta es una buena razón para considerar que la comprensión detallada de esta enfermedad es importante tanto para detectar personas en riesgo como para brindarles un diagnóstico oportuno y así someterlas a una intervención médica anticipada².

1.2 Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) representa del 85% al 90% de los tumores malignos en el hígado; por lo tanto, está considerado como el principal tipo de tumor primario hepático. Dentro de los principales factores de riesgo para esta enfermedad se encuentran la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), el consumo crónico de alcohol, la obesidad y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas³. Casi todos los factores de riesgo ocasionan CHC mediante un proceso muy prolongado, en promedio 20 años, de necroinflamación crónica y proliferación de los hepatocitos que conlleva a la fibrosis y cirrosis hepática y que eventualmente puede culminar en CHC⁴.

Los factores de riesgo del CHC inicialmente ocasionan alteraciones crónicas que conducen al desarrollo de la cirrosis; una importante etapa precancerosa que puede promover el desarrollo del cáncer. El CHC se desarrolla en el 90% de los casos en pacientes con cirrosis y su incidencia aumenta con la gravedad de ésta. Sin embargo, en el 10% de los casos

restantes el CHC se ha observado en pacientes sin cirrosis relacionado principalmente con el síndrome metabólico, infección por VHB o con alguna etiología conocida. En estos últimos pacientes, se ha planteado la hipótesis de que la exposición a factores de riesgo adicionales y/o la predisposición genética podrían contribuir significativamente al desarrollo del CHC. En general, los factores de riesgo en conjunto pueden también influir de manera sinérgica y jugar un papel importante en el desarrollo del CHC⁵.

Adicionalmente, el CHC se caracteriza por ser una enfermedad altamente heterogénea por distintos factores. Primero, existen varios factores etiológicos como virus con genoma de RNA o DNA, agentes químicos (como alcohol y aflatoxinas), enfermedades metabólicas innatas y adquiridas los cuales incrementan la heterogeneidad de la enfermedad. Otro factor relevante es que el CHC puede originarse tanto a partir de hepatocitos maduros como de células progenitoras y así, dependiendo de su origen, el fenotipo de la enfermedad puede ser diferente. Además, como en otros tipos de cáncer, durante el desarrollo del CHC se puede llevar a cabo un proceso genético dinámico que puede influir y cambiar la morfología y las características moleculares en la medida que avanza la enfermedad que puede resultar en un genotipo único en una población celular determinada⁵.

1.3 Estrés oxidativo y carcinoma hepatocelular

El concepto de estrés oxidativo se utiliza para indicar el resultado del daño oxidativo a las principales biomoléculas como son ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, el cual ocurre cuando moléculas relacionadas con el estrés oxidativo, como las especies reactivas de oxígeno (EROs), exceden la capacidad de defensa antioxidante celular y con ello tener un efecto negativo por su papel en la mutagénesis y en las consecuentes aberraciones cromosomales. Esto altera las respuestas funcionales de la célula como la adhesión, el metabolismo, la muerte y el ciclo celular, así como varias vías de señalización. Las células pueden tolerar niveles bajos de estrés oxidativo por poco tiempo, pero en un estado crónico la capacidad de defensa antioxidante y los sistemas de reparación de las células pueden ser deficientes y así provocar una acumulación progresiva de EROs y otros radicales.

Las EROs son moléculas reactivas derivadas del oxígeno y son tanto degradadas como formadas por todos los organismos aerobios. Las EROs son necesarias en concentraciones fisiológicas para varias funciones celulares como la defensa contra organismos patógenos y

de células cancerosas⁶. Varios factores de riesgo asociados con la inflamación crónica, como la infección por virus de hepatitis o el hígado graso, pueden inducir estrés oxidativo en los hepatocitos; en parte esto se debe a que al activarse durante la inflamación, las células de Kupffer y los neutrófilos, producen EROs en exceso⁷. El estrés oxidativo y el incremento del nivel de EROs intracelular pueden generar alteraciones genéticas y epigenéticas con un papel central en la regulación de genes pro-inflamatorios, supresores de tumores y oncogenes involucrados en el desarrollo del CHC⁶.

1.4 Proliferación celular en la carcinogénesis

La proliferación celular tiene un papel importante en la progresión y desarrollo del cáncer; en gran parte debido a la expresión alterada y/o a la actividad de proteínas involucradas en el ciclo celular. Las etapas tempranas del desarrollo tumoral están asociadas con la respuesta fibrogénica, con lo cual se favorece la sobrevivencia y proliferación de células troncales cancerígenas. Mientras que el crecimiento y sobrevivencia de las células normales están bajo el control parcial de factores de crecimiento, las alteraciones en las vías de señalización, resultantes de mutaciones y/o cambios epigenéticos, hacen que las células cancerosas sean resistentes e independientes de estas vías. A su vez, estos cambios favorecen la estimulación constitutiva de las vías que promueven la proliferación celular alterada⁸.

La proteína nuclear Ki67 está asociada con la actividad proliferativa de poblaciones de células intrínsecas en tumores malignos; por esta razón es comúnmente utilizada como marcador de proliferación durante procesos de carcinogénesis. La proteína Ki67 se encuentra en las fases activas del ciclo celular G1, S, G2 y M; sin embargo, está ausente en la fase G0. Se ha observado una disminución en los niveles de su expresión durante la anafase y telofase; sin embargo, el pico de mayor expresión se ha reportado en las fases tempranas de la mitosis⁹. Por su parte, el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) se ha asociado con la promoción de la proliferación celular; la expresión máxima de PCNA se ha reportado durante la fase S y está ausente durante la mitosis y en células quiescentes¹⁰. PCNA también está involucrada en otros fenómenos celulares como la remodelación de la cromatina, la reparación del ADN y la cohesión de la cromátida hermana. PCNA ha sido utilizado frecuentemente como marcador del ciclo celular debido a su participación crucial durante la proliferación celular y su estrecha asociación en la transformación de una célula normal hacia

el cáncer; esto ha dado como resultado que sea de utilidad como marcador de diagnóstico y pronóstico de alteraciones en el ciclo celular¹¹.

1.5 Apoptosis en la carcinogénesis

La apoptosis es un fenómeno biológico selectivo, controlado y genéticamente programado de muerte celular. Ésta ocurre como un proceso normal en donde se eliminan células dañadas, infectadas o células que han llegado al final de su ciclo¹². Sin embargo, hay alteraciones en el proceso apoptótico que contribuyen al desarrollo de algunas enfermedades como el cáncer. Éste proceso es regulado por un mecanismo complejo que involucra proteasas, caspasas, activadores e inhibidores de proteasas. En el hígado, la apoptosis desempeña un papel central en la patogénesis de las lesiones hepáticas tóxicas que puede culminar en el CHC¹³.

Durante la apoptosis se activan las caspasas, una familia de proteínas cisteín-proteasas con especificidad por residuos de ácido aspártico. Las caspasas activadas cortan una variedad de proteínas blanco, lo cual deshabilita procesos celulares vitales y resulta en la descomposición de elementos estructurales de la célula¹⁴. La caspasa 8 recluta a la pro-caspasa 3 para activarla mediante un corte proteolítico en residuos de ácido aspártico específicos; con ello, se forman dos subunidades con masa molecular de 17 y 12 kDa. Esto ocasiona que ambas subunidades se asocien una con la otra y se genere la caspasa 3, la cual es la forma activa de esta caspasa. Además, se ha reportado que la caspasa 3 se expresa de manera ubicua en varios tejidos incluso en el hígado, aunque también su alteración ha sido asociada con algunas enfermedades incluido el CHC.¹³

1.6 La glutatión S-transferasa Pi 1 como marcador de hepatocarcinogénesis

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son una familia de enzimas que son conocidas por su rol citoprotector y por su participación en el desarrollo de la resistencia a medicamentos contra el cáncer. Las GSTs catalizan la conjugación del glutatión con diferentes moléculas y con ello la formación de conjugados del glutatión que son eliminados por la bilis o transportados al riñón¹⁵. La familia de las GSTs está conformada por ocho isoformas: alpha (GSTA), mu (GSTM), pi (GSTP), theta (GSTT), tau (GSTZ), sigma (GSTS), omicron (GSTO) y kappa (GSTK). Una de las isoformas más estudiadas es la GSTP, específicamente la glutatión S-transferasa pi 1 (GSTP1). Se ha reportado que el polimorfismo en Ile105Val de GSTP1 está

asociado como factor de riesgo en varios tipos de cáncer (cáncer colorectal y de esófago); también, en biopsias de CHC de seres humanos se ha encontrado que su expresión está alterada. Adicionalmente, la GSTP1 también ha sido caracterizada como un marcador de cáncer hepático¹⁶. En pacientes con CHC se ha detectado que la GSTP1 está metilada¹⁷, se ha sugerido que ésta metilación es un marcador prometedor para el diagnóstico de la enfermedad¹⁸.

1.7 Modelos animales

El estudio de la gran mayoría de los procesos biológicos tanto normales como patológicos se ha apoyado en el uso de modelos animales principalmente roedores. Éstos son considerados una herramienta crucial debido a las similitudes genéticas y fisiológicas con los seres humanos. Debido a su corto ciclo de vida, su capacidad reproductiva y la factibilidad de una variedad de métodos de manipulación tanto genética como de respuesta a la exposición a diferentes sustancias; el ratón se ha posicionado como uno de los modelos más utilizados. Aunque en la actualidad hay una variedad de modelos de ratones para estudiar el cáncer hepático, la universalidad de cada modelo está limitada debido a que, a diferencia de otros tipos de cáncer, el cáncer de hígado se puede desarrollar por diferentes etiologías y cada una puede afectar a un grupo distinto de genes, lo cual puede culminar en la heterogeneidad genética del cáncer hepático. Aunque los modelos pueden imitar la relación tumor huésped, realizar análisis de fármacos, experimentos terapéuticos y simular algunas etapas de la hepatocarcinogénesis, hasta la fecha no se cuenta con un modelo ideal para estudiar todos los propósitos; así, cada modelo reportado hasta ahora sólo puede recapitular algunos aspectos de la hepatocarcinogénesis. Por ello el modelo a utilizar dependerá de la pregunta de investigación que se pretenda contestar¹⁹.

1.8 Hepatocarcinogénesis experimental

La hepatocarcinogénesis experimental es un fenómeno donde se reproduce alguna etapa del desarrollo del CHC mediante la exposición a alguna sustancia cancerígena y/o hepatotóxica. Esta se puede inducir por varios agentes químicos como aminas aromáticas, colorantes azoicos, nitrosaminas y aflatoxinas²⁰. Existen dos tipos de compuestos carcinogénicos; el primero, el grupo de compuestos genotóxicos, los cuales se caracterizan por su capacidad

para inducir cambios estructurales en el ADN; y el segundo, el grupo de compuestos promotores, éstos carecen de la capacidad genotóxica directa, pero promueven la formación de tumores después de la iniciación por un compuesto hepatotóxico. La administración en cantidades y tiempo suficiente de éstos agentes químicos pueden inducir la formación de tumores hepáticos. La ventaja de los modelos de hepatocarcinogénesis inducida químicamente es que se puede imitar el ciclo de lesión-fibrosis-malignidad visto en seres humanos. Esto los convierte en los modelos más usados para la investigación del CHC²¹. Se han utilizado principalmente compuestos sintéticos como la dietilnitrosamina (DEN), dimetilnitrosamina, etilnitrosourea, 2-acetilaminofluoreno, tetracloruro de carbono y 1,2-dicloroetano; sin embargo, también se han utilizado sustancias naturales como las aflatoxinas para inducir la hepatocarcinogénesis²². Se ha demostrado en modelos animales que la DEN puede inducir en tiempos cortos (en pocas semanas) la formación de lesiones preneoplásicas que culminan en CHC. Por estas razones la DEN ha sido uno de los agentes hepatocarcinogénicos más empleados experimentalmente²⁰.

1.9 Hepatocarcinogénesis inducida por la DEN

La DEN es un líquido amarillento que puede ser disuelto en agua, etanol, dietil éter y otros solventes orgánicos. Se ha reportado que los seres humanos pueden estar expuestos de manera constante a la DEN. Al respecto, se ha reportado que esta sustancia se encuentra en el aire de algunas ciudades en cantidades de 200 mg/m³, se han encontrado hasta 8.3 ng de DEN por cigarro de tabaco comercial, en algunos tipos de quesos se ha encontrado hasta 1 µg/kg. en diferentes tipos de pescados ahumados se ha observado que pueden encontrarse hasta 4µg/kg de DEN, hasta 1µg/kg en el tocino frito y hasta 0.1 µg/kg en varias bebidas alcohólicas (brandy, coñac, ron, whisky y sidra)²³.

La DEN es considerada un agente carcinogénico debido principalmente a su capacidad alquilante, que permite la formación de aductos con el ADN. Para que esto ocurra, la DEN primeramente es hidroxilada a α -hidroxilnitrosamina, este primer paso de bioactivación es dependiente de oxígeno y NADPH, y se ha reportado que este proceso está mediado por enzimas de la familia de citocromo P450. Posteriormente, se produce la formación de un ión electrofílico de etildiazonio; éste último, es el causante del daño al ADN debido a su reactividad con las bases nitrogenadas, con las cuales forma los aductos.

También se ha reportado que la DEN es más eficiente de manera dosis dependiente; es decir, una única dosis baja no es suficiente para la formación de neoplasias; sin embargo, una sola dosis alta es suficiente para inducir el CHC después de un tiempo de latencia. Los mecanismos de reparación del ADN como la unión de extremos no homólogos, reparación por recombinación y reparación de escisión de base; son suficientes para prevenir la mutagenicidad de los aductos al ADN formados al administrar DEN en una única dosis baja. También, se ha reportado que la DEN puede contribuir en la hepatocarcinogénesis por medio de la inducción de estrés oxidativo, ya que hay una producción exacerbada de las EROs generadas por su metabolismo a través del sistema enzimático dependiente de citocromo P450, esto en gran parte genera estrés oxidativo por la formación de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido. La EROs causan daño al ADN, proteínas y lípidos; además, el estrés oxidativo tiene un rol importante en el proceso de carcinogénesis²¹.

Se ha observado que cuando se administra una sola dosis de DEN en ratones, el desarrollo del CHC también depende del sexo, la edad y la cepa del animal. En ratones jóvenes (de pocos días de nacidos) el CHC se desarrolla rápidamente, debido a la alta tasa de proliferación de los hepatocitos. Por otra parte, cuando la administración de la DEN es repetitiva y por periodos largos, el CHC se desarrolla al 100% en ratones macho y en 30% en hembras; la diferencia en la incidencia del CHC respecto al género se atribuye al efecto inhibitorio de los estrógenos y al efecto estimulante de los andrógenos en la hepatocarcinogénesis. La diferencia entre las cepas sensibles al desarrollo de tumores y las resistentes a éstos se debe principalmente a factores genéticos, uno de estos puede ser el estado de metilación de ciertos genes que contribuyen a la susceptibilidad de la hepatocarcinogénesis²¹. Tanto el tiempo como el porcentaje en el desarrollo de tumores es diferente entre las cepas; en ratones de la cepa C3H de 5 semanas de edad con una dosis de la DEN 90 mg/kg el CHC se desarrolla en el 100% de los animales después de 45 a 75 semanas²⁴; en ratones de la cepa C57BL6/J de 4 semanas de edad una dosis de 5 mg/kg de DEN es suficiente para inducir el CHC en el 84% de los animales después de 40 a 70 semanas²⁵. Por otra parte, en ratones BALB/c sometidos a una administración semanal de DEN durante tres semanas con una dosis de 75 mg/kg seguido de otras tres semanas de administración de DEN a 100 mg/kg, provoca la generación de tumores en el 100% de los animales después de la semana 30²⁶.

Otro modelo utilizado para inducir la hepatocarcinogénesis con DEN es el llamado modelo *two-stage*, el cual consiste en una fase de iniciación por un compuesto genotóxico y otra etapa de promoción del CHC. En este caso, la DEN funciona como un compuesto iniciador y el fenobarbital como el agente promotor; es decir, el fenobarbital incrementa la expresión del citocromo P450 y con ello el efecto de la DEN²¹.

Sin embargo, los modelos antes descritos sólo reproducen la etapa final del CHC, aunque se ha observado que en ratas Wistar macho se logra reproducir la etapa de la cirrosis y la formación del CHC al administrar una vez por semana y de manera intraperitoneal 50 mg/kg de DEN durante doce y dieciséis semanas. En los animales a los que se ha administrado DEN durante doce semanas se ha observado que presentan cirrosis a las catorce semanas, mientras que en el hígado de los animales expuestos al cancerígeno durante dieciséis semanas ya se observa el CHC²⁷. La **figura 1**, muestra el esquema de administración de este modelo.

1.10 Metabolismo de la DEN

Las enzimas del citocromo P450 (CYP) son una súper familia de hemoproteínas que principalmente actúan en la fase 1 de la eliminación metabólica de varios xenobióticos en el hígado²⁸. Además, los CYP se encargan de catalizar la biotransformación de químicos carcinogénicos. Muchos CYP también activan carcinógenos y los convierten en derivados electrofilicos, los cuales se unen a distintas macromoléculas como el ADN que como resultado inicia la carcinogénesis química. Los CYP se encuentran en los microsomas hepáticos y activan N-alquilnitrosaminas, en particular el CYP2E1 tiene un papel fundamental en la activación de éstas. El CYP2E1 también metaboliza muchas moléculas tóxicas de bajo peso molecular tales como nitrosaminas (entre ellas la DEN), benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo y cloruro de vinilo²⁹. El CYP2E1 también es conocido por su papel en la producción de radicales libres lo que sugiere que la enzima está involucrada en procesos carcinogénicos³⁰.

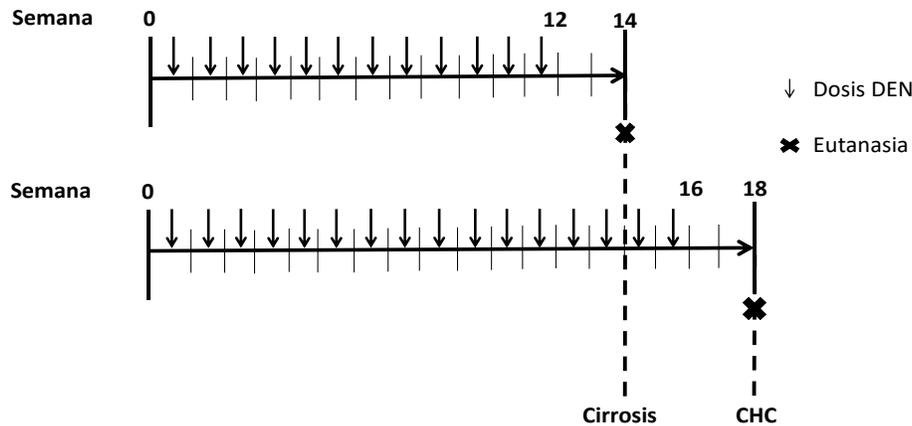


Figura 1. Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en la rata. Se muestra el esquema de administración en el modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en la rata. Bajo este esquema de administración se reporta que en la semana catorce (doce semanas de exposición a la DEN más dos de descanso) se desarrolla la cirrosis hepática y a las dieciocho semanas (dieciséis semanas de exposición al carcinógeno más dos de descanso) se observa el CHC en el 100% de los animales. La DEN es administrada a 50 mg/kg/semana. Figura modificada de Schiffer, *et al*, 2005.

1.11 Hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en un modelo de ratón

Previamente, en nuestro grupo de investigación hemos realizado un análisis dosis-respuesta de la DEN en el ratón a corto plazo, con la finalidad de tener un primer acercamiento a la respuesta a diferentes dosis de este carcinógeno y así, seleccionar las más adecuadas para utilizarlas por periodos prolongados como previamente ha sido reportado en un modelo de CHC en la rata²⁷. En nuestra investigación, se administró DEN a ratones macho de la cepa C57BL/6 de siete semanas de edad dos veces por semana por vía intraperitoneal durante seis semanas. Las dosis administradas de la DEN fueron las siguientes: 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg. Al analizar el efecto de la DEN sobre el peso corporal, la dosis de 40 mg/kg fue demasiado tóxica ya que provocó el deceso del 66 % de los ratones. La dosis de la DEN 20 mg/kg, aunque no fue letal, provocó que los animales se mantuvieran en un peso muy similar durante el tiempo de administración. En contraste, tanto los ratones control como los tratados con las dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg incrementaron su peso corporal (**figura 2**). Adicionalmente, en todos los ratones tratados con DEN se observó un determinado grado de daño de la arquitectura hepática directamente asociado con la dosis administrada³¹. Con base en estos resultados seleccionamos las dosis 2.5, 5 y 20 mg/kg para realizar el presente estudio. Mientras que, la dosis de 40 mg/kg fue descartada por su alta toxicidad, la de 20 mg/kg fue seleccionada. Por un lado, ya que fue la mayor dosis tolerada y sin cambios aparentes en el peso corporal tanto inicial como final de los animales; y por otro, como un control positivo

de daño hepático. Las dosis de 2.5 y 5 mg/kg fueron seleccionadas con la finalidad de utilizarlas y evaluar su efecto sinérgico en combinación con otros agentes hepatotóxicos en futuras investigaciones.

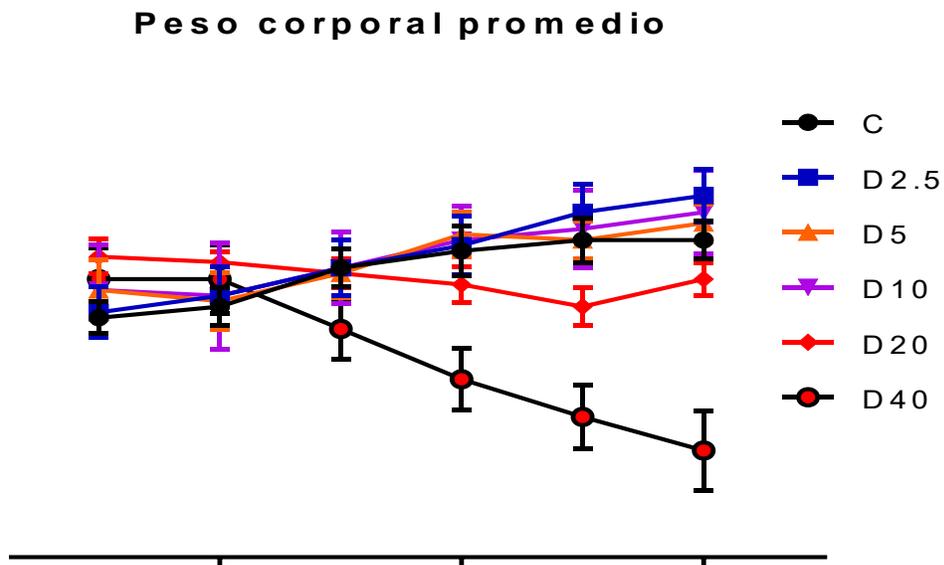


Figura 2. Efecto de la DEN en ratones de la cepa C57BL/6. En la gráfica se muestra la variación del peso corporal a través de seis semanas de administración de la DEN, cada línea representa una dosis diferente. C: animales no tratados, D2.5: animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con la DEN 5 mg/kg, D10: animales tratados con la DEN 10 mg/kg, D20: animales tratados con la DEN 20 mg/kg, D40: animales tratados con la DEN 40 mg/kg Imagen modificada de Alarcón-Sánchez, 2017.

Capítulo 2. Planteamiento del problema

Los modelos experimentales *in vivo* permiten tener un mejor acercamiento a los fenómenos biológicos que ocurren en el ser humano especialmente, cuando se plantea investigar etapas iniciales de enfermedades crónicas asintomáticas, como el cáncer hepático¹⁹. Los modelos experimentales utilizados para inducir la hepatocarcinogénesis en el ratón hasta ahora reportados, no reproducen la exposición continua a agentes carcinogénicos debido a que estos modelos, por un lado, utilizan dosis muy altas y por otro, los animales son sometidos a una exposición única del carcinógeno generalmente a los pocos días de nacido, condición que no ocurre en el ser humano. Es decir, el CHC en el ser humano se desarrolla después de un continuo y largo periodo de exposición, en promedio 20 años, a pequeñas cantidades de agentes hepatocarcinogénicos como la DEN la cual puede estar presente tanto en bebidas alcohólicas, embutidos, pescados ahumados, carnes rojas, algunos tipos de quesos, en el humo del tabaco, así como en la contaminación ambiental²³. La caracterización del presente modelo pretende proporcionar parámetros de referencia como dosis y tiempo de exposición a la DEN, para reproducir la hepatocarcinogénesis en el ratón y así utilizarlo en el estudio de mecanismos moleculares que se alteran en el desarrollo del cáncer hepático con una mayor aproximación a lo que ocurre en el ser humano. Adicionalmente y como perspectiva de este proyecto, en estudios futuros pretendemos utilizar estos parámetros de referencia para determinar el efecto sinérgico entre la DEN y otras sustancias hepatotóxicas como el etanol en la progresión de la enfermedad hepática alcohólica.

2.1 Hipótesis

La administración de dosis crecientes de la DEN inducirá alteraciones hepáticas y como resultado se podrán identificar las dosis y los tiempos más eficientes para inducir la progresión del cáncer hepático.

2.2 Objetivo general

Caracterizar un modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en ratones de la cepa C57BL/6 a nivel histopatológico y molecular.

2.3 Objetivos particulares

1. Analizar los cambios en la arquitectura del tejido hepático durante la hepatocarcinogénesis en el ratón.
2. Evaluar alteraciones moleculares sobre la proliferación, apoptosis y el metabolismo de la DEN en la hepatocarcinogénesis en el ratón.
3. Determinar la dosis de la DEN y el tiempo de administración más eficientes para inducir alteraciones hepáticas en el ratón que sirvan como parámetros de referencia para estudiar el efecto sinérgico de la DEN con otras sustancias hepatotóxicas.

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1. Animales

Para la caracterización del modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón, se realizó una cinética de administración de distintas dosis de este carcinógeno. Para dicha cinética utilizamos ratones (*Mus musculus*) macho de la cepa C57BL/6 de siete semanas de edad, los cuales fueron aclimatados y alimentados *ad libitum* en ambiente controlado con fotoperíodo de 12 horas de luz/oscuridad y a temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigaciones Avanzadas (CINVESTAV), de acuerdo con el proyecto número 011414, aprobado por la misma institución. Para todos los experimentos se siguieron los reglamentos del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales del CINVESTAV, considerando 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”. La caracterización del presente modelo se realizó mediante técnicas de biología molecular y celular como Western blot, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, ELISA, entre otras, mismas que serán descritas a continuación.

3.2 Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN

El presente modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón fue una propuesta de modificación al planteado por Schiffer y colaboradores en 2005²⁷, el cual consiste en administrar semanalmente 50 mg de DEN/kg de peso corporal vía intraperitoneal (i.p.) a ratas de la cepa *Wistar* durante catorce y dieciséis semanas. Sin embargo, en el presente trabajo la DEN fue administrada dos veces por semana incluyendo las siguientes dosis: 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas (**figura 3**). Durante ese periodo el peso corporal de los animales fue registrado semanalmente.

3.2.1 Cinética de administración de la DEN

Para realizar la cinética de administración se utilizaron ratones macho C57BL/6 de siete semanas de edad (de aproximadamente 20 g de peso corporal). Se utilizaron 80 animales, los cuales fueron divididos en 4 grupos de 20 animales correspondientes a las distintas

duraciones de la administración, a su vez, se subdividieron estos grupos en 4 grupos de 5 animales cada uno correspondientes a las tres diferentes dosis de DEN seleccionadas y un grupo control. Después de una semana a partir de la última administración del carcinógeno, los animales fueron sometidos al proceso de eutanasia y entonces el tejido hepático fue recuperado para su posterior análisis (**figura 3**).

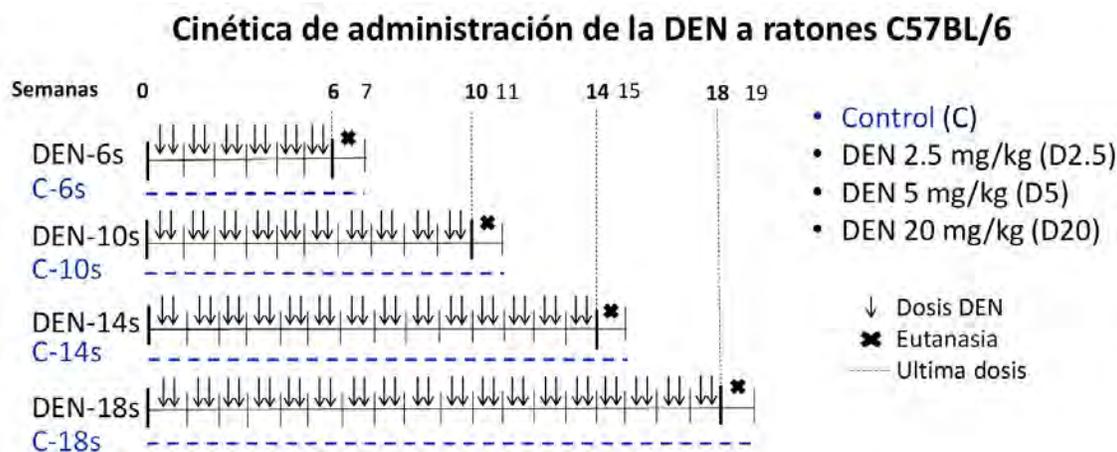


Figura 3. Cinética de administración de la DEN a ratones C57BL/6. Representación esquemática de la cinética de administración realizada con diferentes dosis de la DEN 2.5, 5, y 20 mg/kg vía i.p., dos dosis por semana (días lunes y jueves), durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Una semana posterior a la última administración de la DEN los animales fueron sometidos a la eutanasia. Los grupos controles sin tratamiento fueron sometidos al proceso de eutanasia al mismo tiempo que los grupos tratados con la DEN.

3.2.2 Eutanasia

La eutanasia se realizó por exanguinación bajo anestesia con isoflurano mediante una punción cardiaca con aguja estéril para insulina de 0.5 pulgadas de longitud. La sangre se recuperó en tubos de polipropileno con anticoagulante y el plasma se separó por centrifugación para su posterior análisis. La exanguinación se realizó conforme se describe en el protocolo original del laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

3.2.3 Obtención y conservación del tejido hepático

Después de que el tejido hepático fue disecado, éste se conservó en formaldehído al 4% para realizar las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson, pruebas de inmunohistoquímica (IHQ) y ensayos de inmunofluorescencia (IF). Otra parte del tejido hepático fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y almacenado a -70°C para análisis posteriores de proteínas mediante Western blot (WB), determinación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de 4-hidroxinonenal (4-HNE).

3.3 Análisis de la arquitectura hepática mediante tinción tricrómica de Masson y H&E

Para conocer las alteraciones estructurales inducidas por la administración de la DEN en el hígado del ratón; se realizó la tinción de H&E y para observar fenómenos fibrogénicos se utilizó la tinción tricrómica de Masson. Para ambas tinciones se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor, los cuales fueron desparafinados, rehidratados y teñidos. Ambas tinciones fueron realizadas en el laboratorio de Histología y Microscopía Confocal del INMEGEN. Posteriormente, se tomaron fotos representativas del efecto de la DEN sobre el tejido hepático de los diferentes grupos con una cámara *Canon EOS-1000D* acoplada a un microscopio *ZEISS Axio-A1*. El objetivo utilizado fue el 20x para obtener una magnificación final de 200x.

Para la H&E las laminillas fueron desparafinadas a 57 °C durante una hora y rehidratadas mediante el siguiente procedimiento: las laminillas fueron sumergidas y mantenidas en agitación por 3 min en cada punto de un tren de rehidratación, el cual estaba conformado por 2 veces xilol, xilol-etanol al 100%, 2 veces etanol al 100%, etanol al 70% y finalmente agua destilada. Una vez rehidratadas, las laminillas fueron teñidas con hematoxilina durante 7 min, lavadas con agua destilada, incubadas en etanol ácido, rápidamente lavadas nuevamente y sumergidas en agua amoniacal al 1% hasta que se observó basofilia. Después de lavarlas con agua destilada, las laminillas fueron sumergidas en etanol al 70% por 10 segundos para posteriormente teñirlas con eosina por 10 segundos más. Finalmente, las laminillas fueron sumergidas en etanol al 100% y después de dejarlas secar a temperatura ambiente, éstas fueron montadas con medio de montaje permanent EcoMount (BIOCARE MEDICAL, No. De Cat. EM897L) para su posterior análisis microscópico.

Para la tinción tricrómica de Masson se utilizó un kit comercial (Dako, No. De Cat. AR173). Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados de la misma manera que en la H&E, a las laminillas se les colocó solución de Bouin por una hora a 57°C, se lavaron con agua destilada y luego se les colocó Hematoxilina de Weigert por 10 min, posteriormente se lavaron con agua destilada y se les agregó Fucsina ácida escarlata de Biebrich, después de 15 min las laminillas fueron lavadas, luego se les colocó ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, después de 10 min se lavaron e inmediatamente se colocó azul de anilina. Después las laminillas se sometieron a un tren de deshidratación, el cual estaba conformado de 2 veces etanol al 96%

por 2 min, y 2 veces etanol al 100% durante 2 min, se secaron a 37 °C y, por último, se montaron las laminillas de la misma manera que en la H&E.

3.4 Análisis del nivel de expresión proteica mediante Western Blot

Los niveles de expresión proteica de Gstp1, pro-caspasa 3 y Cyp2e1, los cuales fueron utilizados como marcadores de carcinogénesis, apoptosis y metabolismo de la DEN, respectivamente, fueron evaluados mediante WB. La normalización de la expresión de la proteína de interés se realizó con la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) para todos los casos, la cual fue utilizada como control de carga.

3.4.1 Extracción de proteínas

Para macerar las muestras de tejido hepático se utilizó un homogeneizador (GLAS-COL, No. De Cat. 099C K54). Cien miligramos de tejido fueron homogeneizados en 1 ml de buffer de lisis no desnaturizante (**anexo 1A**). El homogeneizado permaneció en agitación constante por 20 minutos a 4°C en una plataforma oscilante (Labnet, No. De Cat, S0500). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga (ThermoFisher Scientific, No. De Cat, 75002401). Después de separar el sobrenadante y someterlo a otro ciclo de centrifugación por 10 min bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue separado y su contenido proteico fue cuantificado de acuerdo con el procedimiento descrito más adelante.

3.4.2 Cuantificación de proteínas

Las muestras de proteína se diluyeron con buffer de lisis no desnaturizante para ser cuantificadas. La cuantificación de proteína total se realizó con el protocolo del ácido bicinónico (ABC), véase **anexo 2**. La concentración de cada muestra se determinó con la ecuación de la **figura 4**.

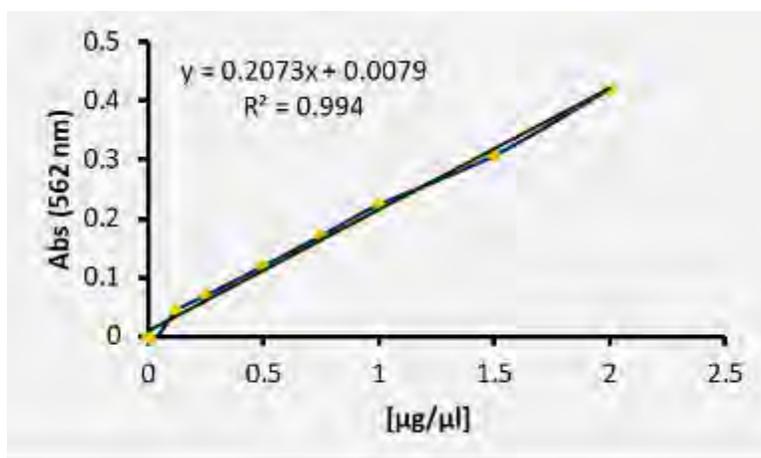


Figura 4. Curva estándar para la cuantificación de proteínas. La gráfica representa la regresión lineal de las absorbancias (Abs) de la curva estándar para determinar la concentración proteica del tejido hepático de los animales tratados con la DEN.

3.4.3 Electroforesis

Las proteínas fueron desnaturalizadas en un buffer de carga 5X específico (**anexo 1B**). Por cada 100 µl de proteína total, se agregaron 25 µl de Buffer de carga 5X fueron y se homogeneizó. Posteriormente, se calentaron las muestras durante 10 minutos a 95°C en un baño seco TermoStat Plus (Eppendorf, No. De Cat. 5352 000.010). Inmediatamente después, las muestras se colocaron en hielo por 10 min y se almacenaron a -70°C para su posterior análisis. Para todos los casos, las electroforesis se realizaron utilizando geles desnaturizantes de 1.5 mm/10 pozos al 10% o 12% de poliacrilamida (**anexo 1C**) en un sistema *MiniProtean Tetracell* (BioRad, No. De Cat. 1658003EDU). Los geles fueron cargados con el volumen correspondiente a 30 µg de proteína de acuerdo con los valores obtenidos en su respectiva cuantificación (**anexo 3**). Se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Xtra Standards* (Bio-Rad, No. De Cat. 161-0377). La corrida electroforética se realizó en una cámara *Mini Protean Tetracell* (Bio-Rad, No. De Cat. 16558005EDU) con una fuente de poder *PowerPac HC* (Bio-Rad, No. De Cat.1645050), en primera instancia a 70 V, una vez que el frente de corrida de las proteínas había alcanzado el gel separador, la corriente fue incrementada a 120 V. Las electroforesis se realizaron en un buffer de corrida 1x (**anexo 1D**) y tuvieron una duración aproximada de dos horas.

3.4.4 Transferencia de proteínas

Se utilizaron membranas de polifluoruro de vinilideno (Merck Millipore, No. de Cat. IPVH00010), las cuales previamente fueron activadas en metanol durante 2 min; posteriormente, los casetes de transferencia fueron ensamblados en el orden siguiente: lado del ánodo – esponja – filtro – membrana – gel con proteínas – filtro – esponja – lado del cátodo. Para evitar la deshidratación de los geles, todos los componentes se sumergieron en buffer de transferencia 1x (BT1x), véase **anexo 1E**. El sistema utilizado fue el de electrotransferencia húmeda *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad, No. De Cat. 1703930) con la fuente de poder *PowerPac HC*, a 300 mA durante 3 horas. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche libre de grasa disuelta en *Buffer-tris* salino al 0.1% *tween 20* (TBST 1x), véase **anexo 1F**.

3.4.5 Inmunodetección específica

Las membranas se incubaron con un anticuerpo primario en agitación constante durante una noche a 4°C. Éste se diluyó en TBST 1x al 5% leche libre de grasa y la dilución fue dependiente de la especificidad de cada anticuerpo (**tabla 1**). Al término de la incubación, se retiró el anticuerpo y se lavaron las membranas tres veces durante 5 min con TBST 1x. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente al isotipo del anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente, el cual fue diluido en TBST 1x al 5% leche libre de grasa (**tabla 1**). Luego de la incubación, el anticuerpo se retiró y las membranas se lavaron tres veces por 5 min con TBST 1x. Para determinar la expresión de la proteína de interés, de acuerdo con su peso molecular reportado, se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Merck Millipore, No. De Cat. WBKLS0500). Las membranas se revelaron en un fotodocumentador mini HG9 (Uvitec Cambridge). Finalmente, las imágenes se obtuvieron de manera serial a tiempos de exposición entre 5 segundos y 5 min. Posteriormente, las bandas proteicas se cuantificarán mediante un análisis densitométrico, éste se realizó con el software para procesamiento de imágenes *Image J* desarrollado por el *National Institutes of Health (NIH)*, versión 1.5.

Anticuerpos primarios					
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
Gstp1	Conejo	1:200	TBST1X/5%leche	Sigma-Aldrich	SAB3500265
Cyp2e1	Conejo	1:4000	TBST1X/5%leche	GeneTex	GTX 32546
Pro-caspasa3	Conejo	1:500	TBST1X/5%leche	Cell signaling	9662
Gapdh	Ratón	1:1000	TBST1X/3%leche	Millipore	MAB374
Anticuerpos secundarios					
Anti-ratón-HRP	Ratón	1:10000	TBST1X/5%leche	Jackson	315-035-003
Anti-conejo-HRP	Conejo	1:10000	TBST1X/5%leche	Jackson	111-035-003

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el análisis por western blot. En la tabla se muestran las condiciones de dilución de cada uno de los anticuerpos utilizados, así como su información comercial.

3.5 Análisis por inmunohistoquímica

Para la caracterización del modelo de hepatocarcinogénesis experimental a nivel histológico, se empleó la técnica de IHQ conocer la localización estructural de las proteínas: Ki67, Gstp1 y Cyp2e1. Se utilizaron cortes de 2 μm de espesor de tejido hepático embebido en parafina, los cuales fueron adheridos a portaobjetos de acuerdo con las dosis y duración correspondiente. Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados; posteriormente, se sumergieron en Buffer *rodent decloaker* (BIOCARE MEDICAL, No. De Cat. 071417) durante 30 min en baño maría en una olla de presión. Después se colocaron las laminillas en un soporte para portaobjetos vertical, el cual es un soporte que permite la distribución homogénea de las soluciones que se agregan a las laminillas, los tejidos fueron lavados con 1 ml de agua destilada y después con 1 ml de TBST 1x. Posteriormente, se incubaron las laminillas con un bloqueador de peroxidasa endógena del Kit Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP/DAB (Bio SB, No. De Cat. BSB 0005) durante 30 min, seguido de tres lavados con 1 ml de TBST 1x. Los tejidos se bloquearon con albúmina al 1% en TBST 1x por 30 min, y se incubaron 100 μl de anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C (**tabla 2**). Al término de la incubación, los tejidos se lavaron con TBST 1x en tres ocasiones; posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo durante 30 min a temperatura ambiente (DAKO, No. De Cat. K4003), por último, se lavaron las laminillas con TBST 1x. La inmunodetección se realizó con 100 μl de *DAB-Chromogen* por cada mililitro de *DAB-Substrate* del kit Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP/DAB de Bio SB. Posteriormente, los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina para después ser montados con medio de montaje Eco Mount de BIOCARE MEDICAL. Por último, se tomaron las fotografías representativas de cada

grupo de animales tratados con la DEN con una cámara (*Canon EOS-1000D*) acoplada a el microscopio *ZEISS Axio-A1*; el objetivo utilizado fue el 20x para obtener una magnificación final de 200x.

3.5.1 Cuantificación del marcador de proliferación Ki67

Se cuantificaron los núcleos con marca positiva a Ki67 observados en fotografías de la IHQ tomadas de manera aleatoria con una magnificación 200x, mediante el software *Image J*, el cual tiene la capacidad de detectar gradientes de colores específicos y así poder seleccionar exclusivamente los núcleos teñidos en café en la IHQ de Ki67. Se analizaron en total trescientas veinte fotos (ochenta por cada cinética y cuatro por animal) para su posterior representación gráfica y análisis estadístico.

Anticuerpos primarios					
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
Ki67	Ratón	1:300	TBST1x-BSA1%	GeneTex	GTX 16667
Gstp1	Conejo	1:300	TBST1X/5%leche	Sigma-Aldrich	SAB3500265
Cyp2e1	Conejo	1:500	TBST1X/5%leche	GeneTex	GTX 32546

Tabla 2 Anticuerpos utilizados en la IHQ. Se muestran las condiciones de las diluciones de cada anticuerpo y su información comercial.

3.6 Co-localización proteica por inmunofluorescencia

Para continuar con la descripción del modelo de hepatocarcinogénesis en ratón se dio seguimiento a la detección de los marcadores de proliferación celular Ki67 y PCNA, para conocer si se alteró la co-localización de estos marcadores. Después de desparafinar y rehidratar los tejidos, éstos se sometieron a un proceso de exposición de antígenos en baño maría en una olla de presión durante 30 min en *Buffer rodent deloacker* del *kit mouse-on-mouse-HRP-polymer Bundle* (BIOCARE MEDICAL No. De Cat. MM510). Las laminillas se lavaron con agua destilada y posteriormente se montaron en un soporte para cubreobjetos vertical; éstas se lavaron con agua destilada y con TBST 1x. Se realizó el bloqueo con 1 ml de TBST 1x al 1% de BSA durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se prepararon los anticuerpos primarios como se describe en la **tabla 3**. Se agregaron 100 µl de una mezcla de los dos anticuerpos a cada laminilla, éstas fueron incubadas durante una noche a 4°C. Después, las laminillas se lavaron con 1 ml de TBST 1x y se incubaron 200 µl del anticuerpo secundario por una hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Después de lavar las

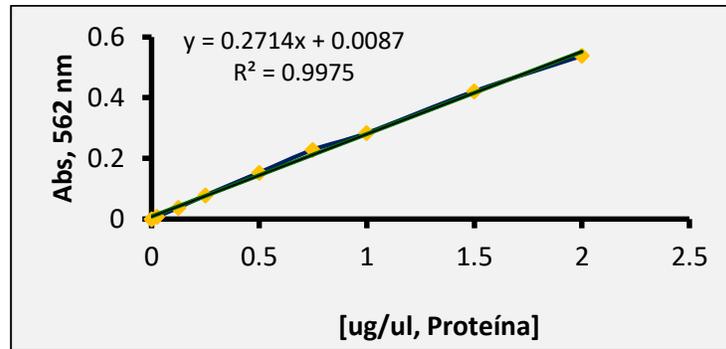
laminillas con TBST 1x, se incubaron durante 5 min con 100 µl de DAPI, un agente intercalante del ADN, diluido como se describe en la **tabla 3** y se lavaron con TBST 1x. Por último, las laminillas se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Abcam, No. De Cat. ab104137), protegidas de la luz a 4°C. Para su visualización se utilizó un microscopio *ZEISS Axio-A1* utilizando el objetivo 40x. Se tomaron las fotografías representativas con una cámara *Canon EOS-1000D*, para tener una magnificación final 400x. Se realizó la transposición de las imágenes (*merge*) con el software *Image J* desarrollado por el *National Institutes of Health (NIH)*, versión 1.5.

Anticuerpo primario					
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
Ki67	Ratón	1:100	TBST1x-BSA1%	GeneTex	GTX 16667
PCNA	Ratón	1:100	TBST1x-BSA1%	Thermo Scientific	13-3900
Anticuerpo secundario					
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
Anti-ratón-Alexa fluor 594	Ratón	1:300	TBST1x-BSA1%	Abcam	ab150112
Anti-conejo-Alexa Fluor 488	Conejo	1:300	TBST1x-BSA1%	Abcam	ab150077
DAPI					
Nombre		Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato		1:1000	PBS1x	Thermo Scientific	62247

Tabla 3. Reactivos para inmunofluorescencia. Se muestran las condiciones de las diluciones de cada reactivo utilizado en la inmunofluorescencia y su información comercial.

3.7 Determinación del daño oxidativo en el hígado del ratón

Para determinar el estrés oxidativo generado por la administración de la DEN en el ratón, se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de 4-hidroxinonenal (HNE) mediante ensayos de espectrofluorimetría y de ELISA, respectivamente. En ambos casos se cuantificó la proteína para equiparar todas las muestras a una concentración final igual mediante una proporción volumétrica específica para cada una (**figura 5**).



Muestras	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl para 500 μg	Para llevar a 100 μl con PBS 1x	[Final] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
C1	13.74	36.4	63.6	5.0
C2	17.98	27.8	72.2	5.0
C3	18.94	26.4	73.6	5.0
C4	18.50	27.0	73.0	5.0
C5	16.06	31.1	68.9	5.0
D2.5-1	14.81	33.8	66.2	5.0
D2.5-2	18.28	27.4	72.6	5.0
D2.5-3	18.90	26.5	73.5	5.0
D2.5-4	15.92	31.4	68.6	5.0
D2.5-5	19.93	25.1	74.9	5.0
D5-1	15.36	32.5	67.5	5.0
D5-2	17.94	27.9	72.1	5.0
D5-3	20.15	24.8	75.2	5.0
D5-4	18.64	26.8	73.2	5.0
D5-5	17.43	28.7	71.3	5.0
D20-1	10.72	46.6	53.4	5.0
D20-2	10.17	49.2	50.8	5.0
D20-3	13.41	37.3	62.7	5.0
D20-4	10.46	47.8	52.2	5.0

Figura 5. Curva estándar para la cuantificación de proteínas y tabla para ajuste de concentración de las muestras. La gráfica representa las absorbancias de la curva estándar y muestra la ecuación utilizada para determinar la concentración de proteína en cada muestra. Además, la tabla muestra la proporción volumétrica de cada muestra para equiparar su concentración a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La gráfica ejemplifica las muestras de la cinética de administración de la DEN por catorce semanas. Procedimientos similares fueron utilizados para las cinéticas restantes. C: Control, D2.5: DEN 2.5 mg/kg, D5: DEN 5 mg/kg, D20: DEN 20 mg/kg.

3.7.1 Niveles de EROs

Para determinar los niveles de EROs se realizó una medición de espectrofluorimetría mediante el kit *Oxiselect TM In Vitro ROS/RNS* (Cell BioLabs Inc., No. De Cat. STA-347). Éste se fundamenta en el uso de una sonda fluorogénica de 2',7' diclorodihidrofluorescina

diacetato (DCFH-DA); la cual se difunde en las células y se desacetila por las acetilasas celulares para formar 2',7' diclorodihidrofluorescina (DCFH) no fluorescente, que se oxida rápidamente por las EROs a 2',7' diclorodihidrofluorescina (DCF), el cual es altamente fluorescente. La intensidad de fluorescencia es proporcional a los niveles de EROs dentro del citoplasma. Se homogeneizaron 100 mg de tejido hepático a 4°C en 800 µl de Buffer de fosfato salino (PBS 1x, **anexo 1G**) sin inhibidores de proteasas; posteriormente se cuantificó la proteína con el protocolo del ácido bicinonínico para finalmente, equiparar todas las muestras a una concentración final de 5 µg/µl con PBS 1x como se muestra en el **anexo 3**. Posteriormente, se mezclaron los componentes del kit con 0.75 mg de proteína total contenida en 150 µl de proteína a [5 µg/µl] en tubos de polipropileno oscuros. A partir de la mezcla, se colocaron 190 µl por triplicado en una microplaca de 96 pozos para fluorescencia (Invitrogen, No. De Cat. M3389) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min; por último, se midió la fluorescencia en *pool* de proteínas de cada tratamiento a 480 nm de excitación y 530 nm de emisión en un lector de placas *Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector*.

3.7.2 Niveles de 4-HNE

Los niveles de 4-HNE se determinaron de acuerdo con las instrucciones del kit *Oxiselect HNE Adduct Competitive ELISA* (Cell BioLabs Inc., No. De Cat. STA-838). Se homogeneizaron 100 mg de tejido en 800 µl de PBS 1x 4°C sin inhibidores, se tomaron 300 µl de proteína total y se agregaron 300 µl de PBS 1x al 0.2% de albúmina. Se cuantificó la proteína con el protocolo del ácido bicinonínico y se igualaron todas las muestras a una concentración final de 4 µg/µl con PBS 1x al 0.2% de albúmina como se muestra en el **anexo 3**. Finalmente, se realizaron las determinaciones de 4-HNE en *pool* de proteínas de cada tratamiento y se obtuvieron los valores de las absorbancias a 450 nm en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch* de *BioTek*.

3.8 Análisis estadísticos

Se utilizó el *software Graphpad Prism V 7.0* para realizar las gráficas y el análisis estadístico. La prueba paramétrica *t* de *Student* fue utilizada cuando sólo dos grupos experimentales fueron comparados, mientras que la ANOVA (análisis unidireccional de la varianza) fue utilizada para comparaciones múltiples con una prueba *post-hoc* de Sidak. Para ambos casos, se consideró que las comparaciones fueron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Efecto de la DEN en el peso corporal

Para conocer el efecto de la DEN en el peso corporal de los ratones se realizó un registro semanal del peso de cada uno de los animales. Como se puede observar en la **figura 6**, los ratones control y los tratados con la DEN en dosis de 2.5 mg/kg y 5 mg/kg durante dieciocho semanas, incrementaron su peso respecto al que tenían en el inicio del tratamiento ($p=0.0001$, $p=0.0001$ y $p=0.0002$, respectivamente). En los animales tratados con la dosis de la DEN 20 mg/kg no se observó tal incremento. Al final de la cinética de administración los animales tratados con DEN a 20 mg/kg fueron los que registraron el menor peso corporal comparados con los controles ($p<0.0001$).

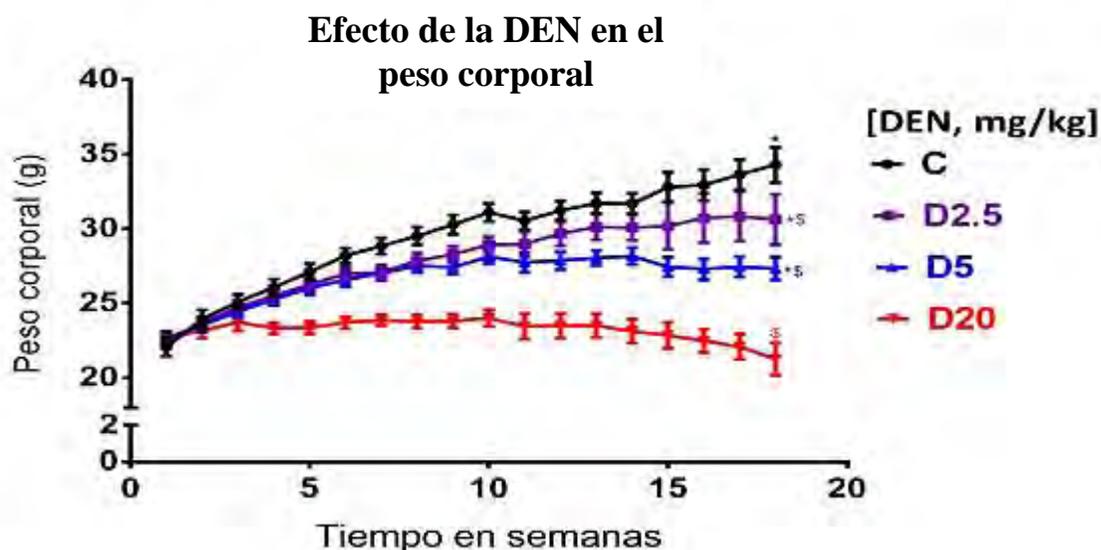


Figura 6. Efecto de la DEN en el peso corporal. El peso corporal de los ratones tratados con la DEN fueron registrados una vez por semana. La gráfica representa el peso promedio en gramos \pm error estándar. C: Control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. *Diferencia estadísticamente significativa entre la primera y última semana de tratamiento, \$ diferencia estadísticamente significativa al comparar el peso corporal registrado en la última semana de administración de cada una de las dosis respecto al control. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa cuando $p<0.05$. $n=5$ animales por grupo.

4.2 Variación en el peso relativo del hígado

Para conocer si la DEN provocó un cambio en el peso del hígado se calculó el peso relativo de éste por medio del cociente entre el peso corporal y el peso del hígado. Para los animales sometidos al tratamiento durante seis semanas se observó que los ratones tratados con la DEN

a 2.5 mg/kg presentaron un incremento en el peso relativo del hígado ($p=0.0396$), mientras que los ratones tratados con DEN a 20 mg/kg presentaron un decremento en este peso ($p=0.0094$), respecto al control. En contraste con los animales tratados durante seis semanas, aquellos tratados por diez, catorce y dieciocho semanas presentaron una tendencia al incremento del peso relativo del hígado; además, los animales tratados durante dieciocho semanas con la dosis de 20 mg/kg presentaron un incremento significativo ($p=0.0110$) del peso relativo del hígado (**figura 7**).

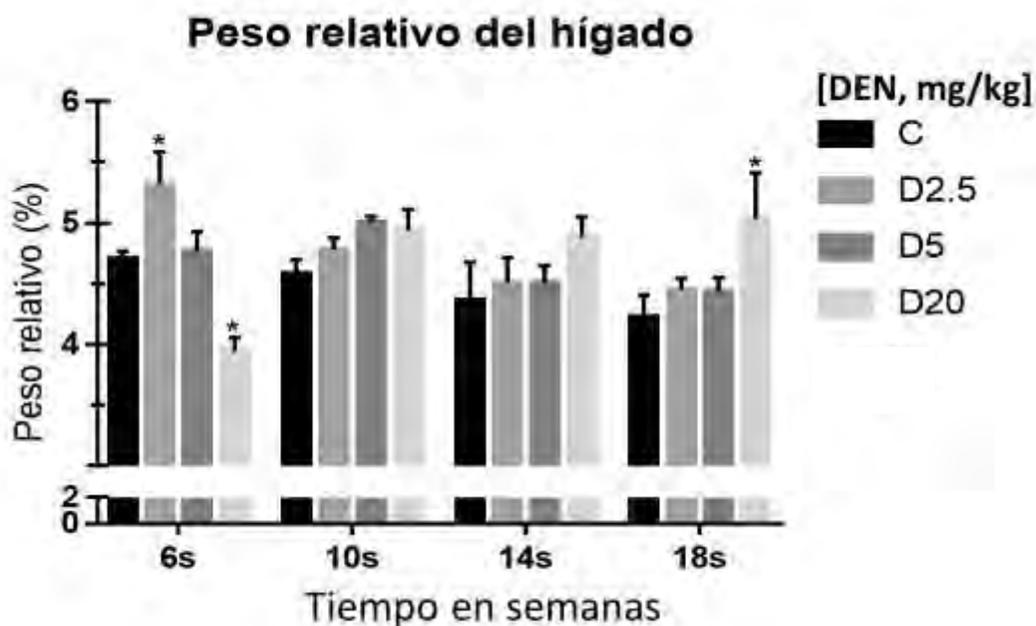


Figura 7. Análisis de la variación del peso relativo del hígado. Se obtuvo el cociente entre el peso del hígado y el peso corporal de cada animal multiplicado por cien para obtener el porcentaje final; así, cada barra representa el promedio de estos porcentajes \pm error estándar. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p<0.05$). $n=5$ animales.

4.3 Daño al tejido hepático

Para lograr la caracterización del modelo propuesto en este trabajo, primero se observó el daño a nivel macroscópico y posteriormente el daño en la arquitectura tisular. Para esto se realizó la tinción de H&E, que permitió describir el daño al arreglo hepático. Se analizó el infiltrado de fibras de colágena dentro del parénquima hepático mediante la tinción tricrómica de Masson.

A nivel macroscópico observamos que el daño hepático mayor fue ocasionado con la DEN administrada a 20 mg/kg. A las seis semanas de administración (**figura 8B**), el hígado presentó una superficie rugosa, ligeramente café rojiza con respecto a la del hígado de los animales control. A las diez semanas (**figura 8C**), la superficie hepática se tornó más rugosa y pálida, a las catorce semanas (**figura 8D**), el hígado se apreciaba aún más rugoso, pálido y con nódulos pequeños difusos. Esto fue más evidente a las dieciocho semanas (**figura 8E**), el hígado era totalmente nodular, con un color rojizo pálido y con nódulos abundantes, en algunos de estos animales se observaron nódulos pulmonares de aspecto metastásico (**figura 8F**).

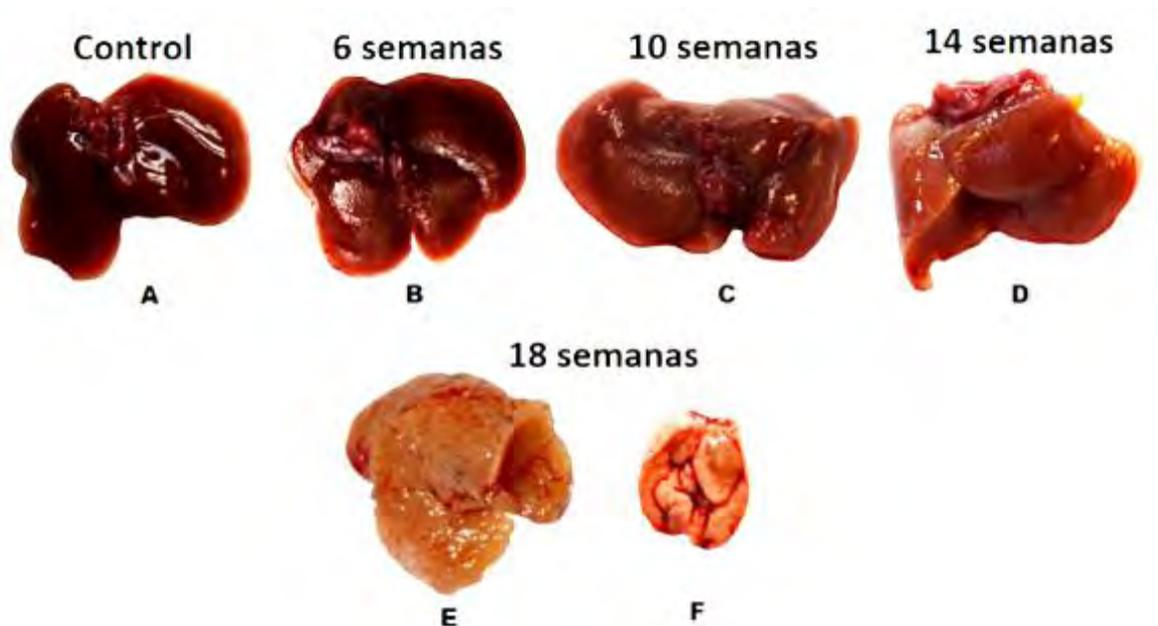


Figura 8. Lesiones hepáticas a nivel macroscópico. Se realizó un registro fotográfico de los hígados extraídos. En la figura se muestran fotos representativas de los hígados de los animales tratados por 6, 10, 14 y 18 semanas a una dosis de DEN 20 mg/kg. **A:** control de animales sin tratamiento, **B:** DEN 20 mg/kg durante 6 semanas, **C:** DEN 20 mg/kg durante 10 semanas, **D:** DEN 20 mg/kg durante 14 semanas, **E:** DEN 20 mg/kg durante 18 semanas, **F:** pulmón con nodulos de aspecto metastásico encontrado en algunos de los animales tratados con DEN 20 mg/kg durante 18 semanas.

4.3.1 Daño en la arquitectura tisular

Con base en lo observado en los tejidos teñidos con H&E se lograron analizar las alteraciones de la arquitectura hepática generadas con el presente modelo de hepatocarcinogénesis experimental. El grado de las lesiones hepáticas estuvo relacionado con el incremento de la dosis y el tiempo de exposición al carcinógeno, es decir, las lesiones aumentaron de manera dosis y tiempo dependiente. Al administrar DEN a los ratones durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas con dosis de 2.5 y 5 mg/kg, se apreció que la DEN indujo una pérdida inicial en la organización de los cordones de hepatocitos, así como también, presencia de infiltrado inflamatorio moderado en el parénquima hepático. Aunque a las diez y catorce semanas se observaron algunos nódulos inflamatorios, la arquitectura hepática aún estaba relativamente homogénea, es decir, en esos tiempos no se apreció la pérdida total de la arquitectura hepática. Las lesiones hepáticas se observaron marcadamente en los animales tratados con la DEN a 20 mg/kg. Desde las seis semanas de tratamiento se pudo observar algunos hepatocitos de gran tamaño, así como la pérdida de la alineación de los cordones hepáticos. A las diez semanas de tratamiento se apreció claramente la pérdida total de los cordones de hepatocitos, así como presencia de abundante de infiltrado inflamatorio conformado por linfocitos maduros, hepatocitos de gran tamaño con citoplasma mal definido y otros sin núcleo, además de proliferación anormal de células de tipo colangiolar. Para las catorce semanas de exposición al carcinógeno, además de las alteraciones antes descritas; se observó una mayor proliferación colangiolar aunado a una pérdida en la integridad de los vasos sanguíneos. Por último, a las dieciocho semanas de tratamiento con DEN a 20 mg/kg se observó claramente la pérdida total de la arquitectura hepática, la cual estuvo acompañada de proliferación colangiolar exacerbada, asociada a inflamación crónica perivascular e intraparenquimatosas, formada por linfocitos maduros, nucleomegalia y necrosis, también observamos células gigantes con citoplasma amplio eosinófilo, dilatación sinusoidal y presencia de nódulos bien definidos (**figura 9**).

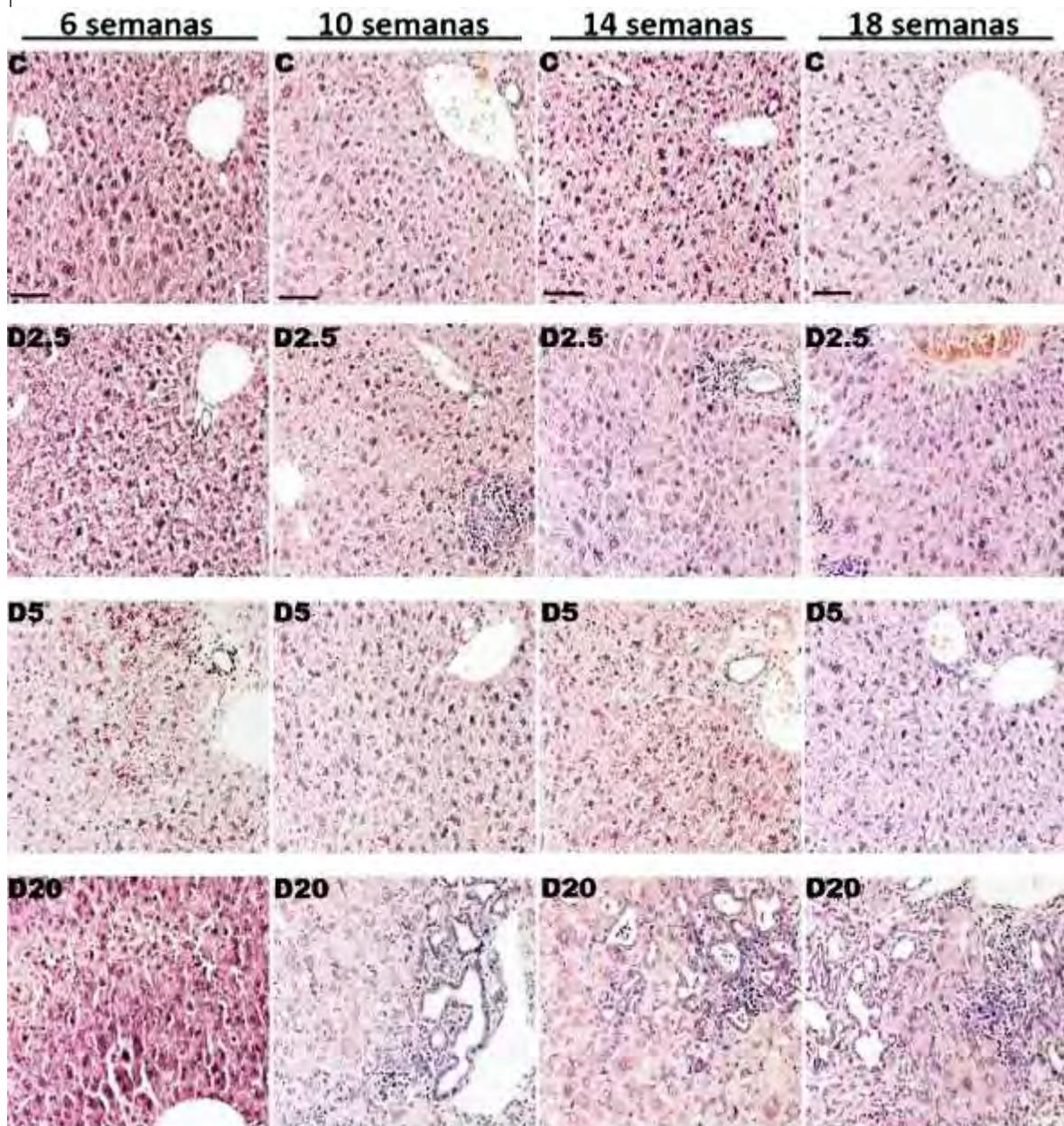


Figura 9. Arquitectura hepática de ratones tratados con la DEN. La integridad del tejido hepático se evaluó por medio de la tinción de H&E. Las fotos son imágenes representativas de cortes histológicos de 2 μ m de espesor. Se observan los núcleos basófilos y citoplasma eosinófilo. C: control, DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μ m. n=5.

4.3.2 Efecto de la DEN en la fibrogénesis

Para evaluar si la DEN activó el proceso de fibrogénesis, un fenómeno recurrente en alteraciones hepáticas, se realizó la tinción tricrómica de Masson para observar la deposición de fibras de colágeno en el hígado de los ratones tratados. Como se puede apreciar en la **figura 10**, en los animales control observamos que la presencia de fibras de colágeno se limitaba a conductos biliares, venas, arterias hepáticas y ausencia de éstas en el parénquima hepático, como se espera en una condición normal. De la misma forma, en el hígado de los ratones tratados con DEN a 2.5 y 5 mg/kg no se observaron cambios. Sin embargo, la dosis de DEN a 20 mg/kg indujo levemente la deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático desde las 10 semanas de administración, la cual incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición al carcinógeno.

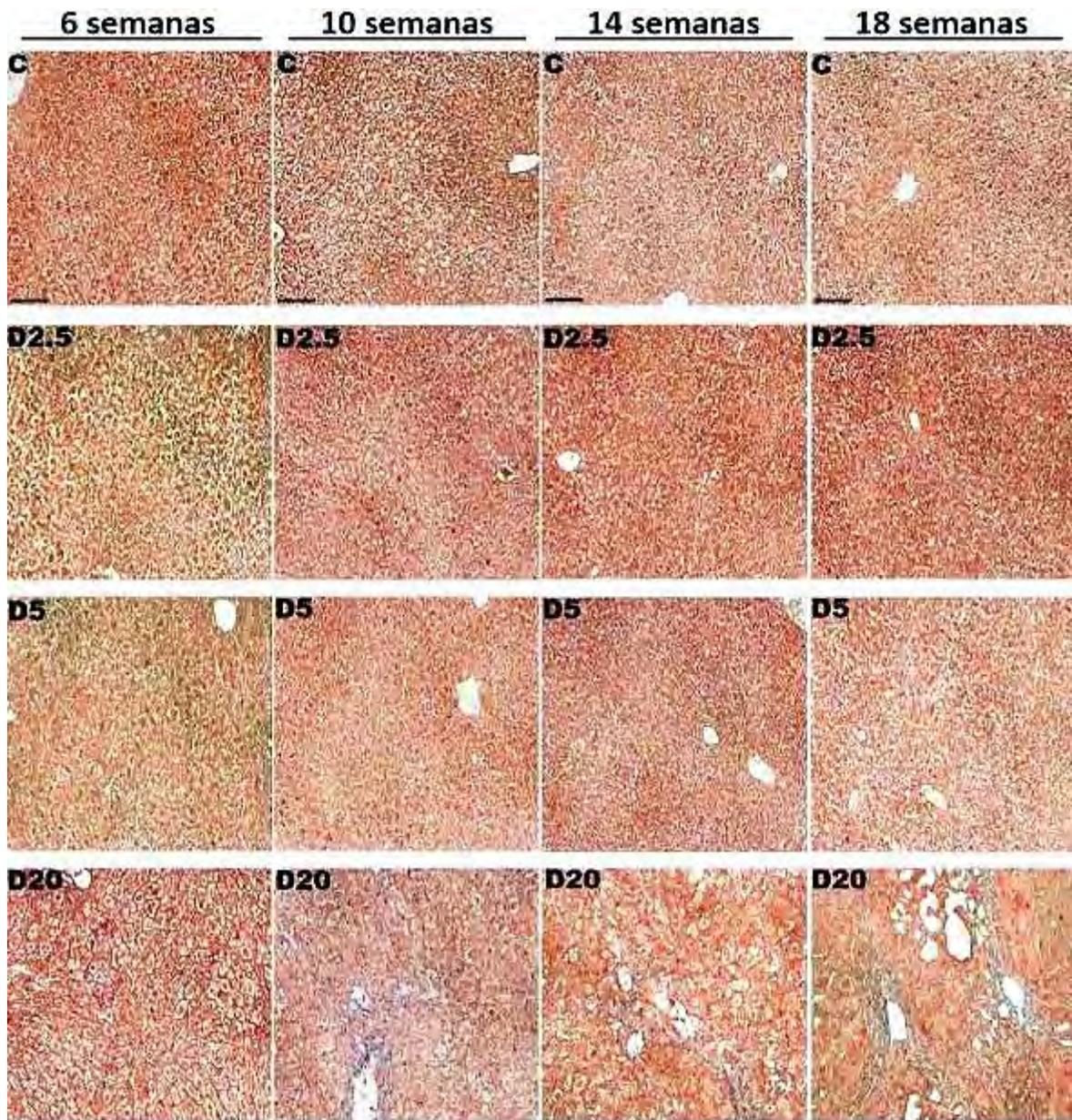


Figura 10. Deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático del ratón. Se realizó una tinción tricrómica de Masson para determinar la presencia de fibras de colágeno en el parénquima hepático de ratones tratados con DEN. Las fotos son imágenes representativas de cortes histológicos de 2 μ m de espesor. Se observan las fibras de colágeno teñidas en color azul. C: control, DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μ m. n=5.

4.4 Efecto de la DEN en la proliferación celular

Ki67 es una proteína que se ha utilizado como marcador de proliferación celular⁹, en éste estudio se evaluó la presencia y localización de Ki67 mediante análisis inmunohistoquímicos. Además, se conoce que PCNA se encuentra principalmente expresada en la fase S del ciclo celular¹⁰, por lo que la presencia de este marcador de proliferación fue evaluado para identificar células proliferantes mediante una co-inmunofluorescencia para detectar tanto Ki67 como PCNA.

4.4.1 Localización tisular del marcador de proliferación Ki67

Nuestros resultados muestran que la presencia de la marca positiva para Ki67 fue mayor en los animales tratados con la DEN comparado con el grupo control. De manera interesante, observamos una disminución de este marcador en el hígado de los ratones tratados con las dosis de DEN a 2.5 y 5 mg/kg durante catorce y dieciocho semanas respecto a aquellos tratados con las mismas dosis, pero por seis y diez semanas. Sin embargo, la mayor inducción de este marcador de proliferación fue promovida por la dosis de 20 mg/kg; además, con esta dosis se observó un incremento dosis-dependiente en la marca de Ki67 con una localización perinodular o circundando preferencialmente los tumores (**figura 11**).

Para corroborar las tendencias de la expresión del marcador Ki67 observadas mediante análisis inmunohistoquímicos, los núcleos que presentaron marca positiva para Ki67 fueron cuantificados. Los resultados demostraron que la DEN a 2.5 y 5 mg/kg incrementó significativamente en el número de núcleos positivos cuando fue administrada durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas ($p < 0.0001$ en todos los casos), respecto a los grupos control. Además, un mayor incremento fue cuantificado al administrar la DEN a 20 mg/kg durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas ($p < 0.0001$ en todos los casos); asimismo, el tratamiento por dieciocho semanas con DEN a esta dosis provocó la mayor inducción de Ki67, ya que al compararlo con los tratamientos de seis, diez y catorce semanas, el número de núcleos Ki67 positivos fue significativamente mayor al compararlo con los tiempos previos ($p < 0.0001$ para todos los casos). Lo anterior se muestra en la **figura 12A**. Para demostrar el impacto de las diferentes dosis de la DEN, cuantificamos las veces de cambio de la expresión de Ki67 respecto de sus controles. Encontramos que a las seis semanas de tratamiento las dosis de 2.5 y 5 mg/kg indujeron 4.2 y 4.1 veces más aparición de núcleos Ki67 positivos respectivamente, mientras que la dosis de 20 mg/kg provocó 11 veces más

esta inducción. Después de diez semanas de tratamiento la marca se observó 4.1 veces más en la dosis de 2.5 y 5 mg/kg; mientras que la dosis de 20 mg/kg indujo 18.1 más veces más la presencia de núcleos Ki67 positivos. A las catorce semanas de tratamiento, observamos que la dosis de 2.5 mg/kg incrementó 2.5 veces el número de núcleos Ki67 positivo, mientras que la de 5 mg/kg la incrementó 2.8 veces y la de 20 mg/kg la incrementó 15.7 veces más. Finalmente, en los tratamientos realizados durante dieciocho semanas se observó un incremento de 2.9, 4.2 y 28 veces más núcleos Ki67 positivos en las dosis de 2.5, 5 y 20 mg/kg respectivamente, para todos los casos, comparado con sus respectivos controles **(figura 12B)**.

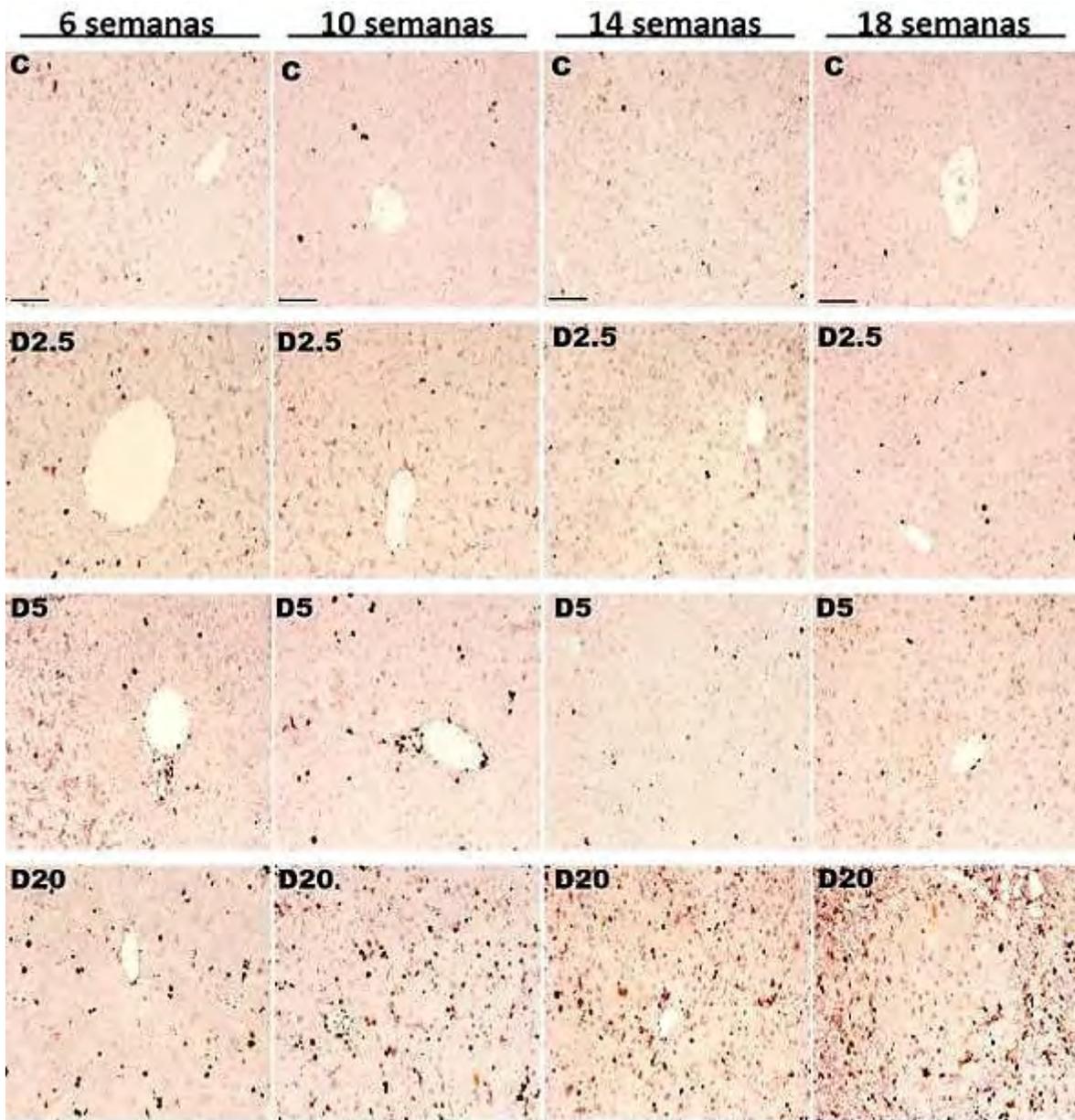
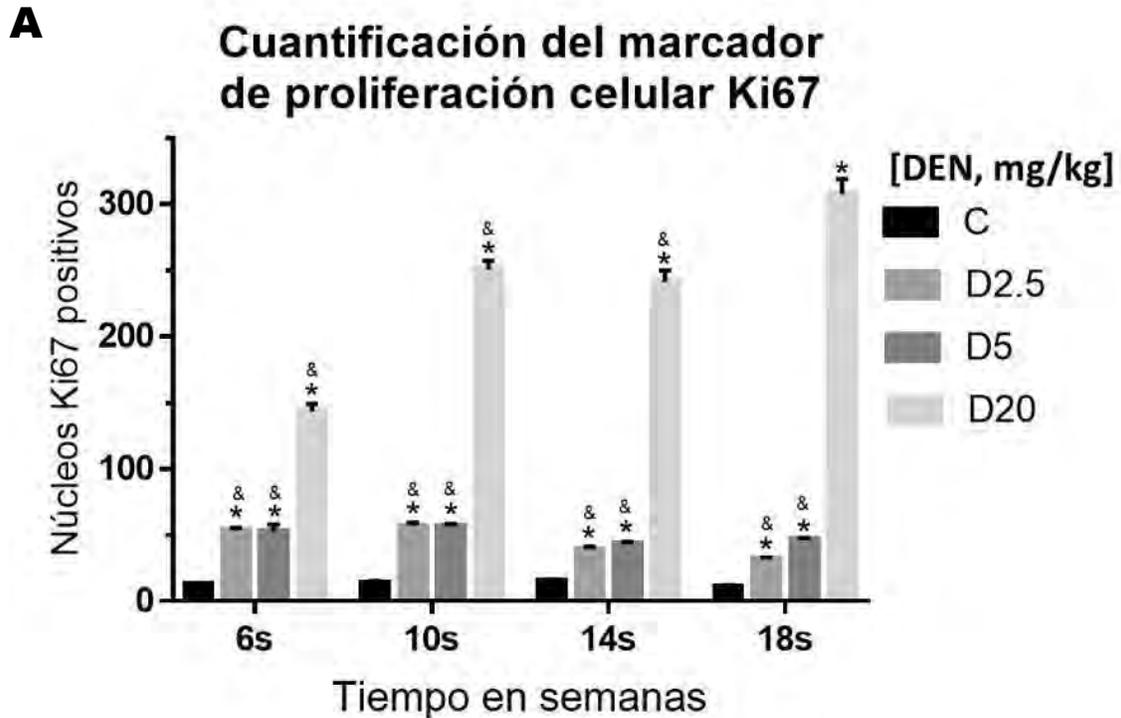


Figura 11. Efecto de la DEN sobre la inducción del marcador de proliferación Ki67 en hígado del ratón. La expresión de Ki67 fue determinada mediante análisis inmunohistoquímicos. Se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor. La marca positiva a Ki67 se puede apreciar en áreas o núcleos celulares teñidas en diferentes gradientes de color café. C: control, D2.5: animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con la DEN 20 mg/kg. $n = 5$ animales. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μm .



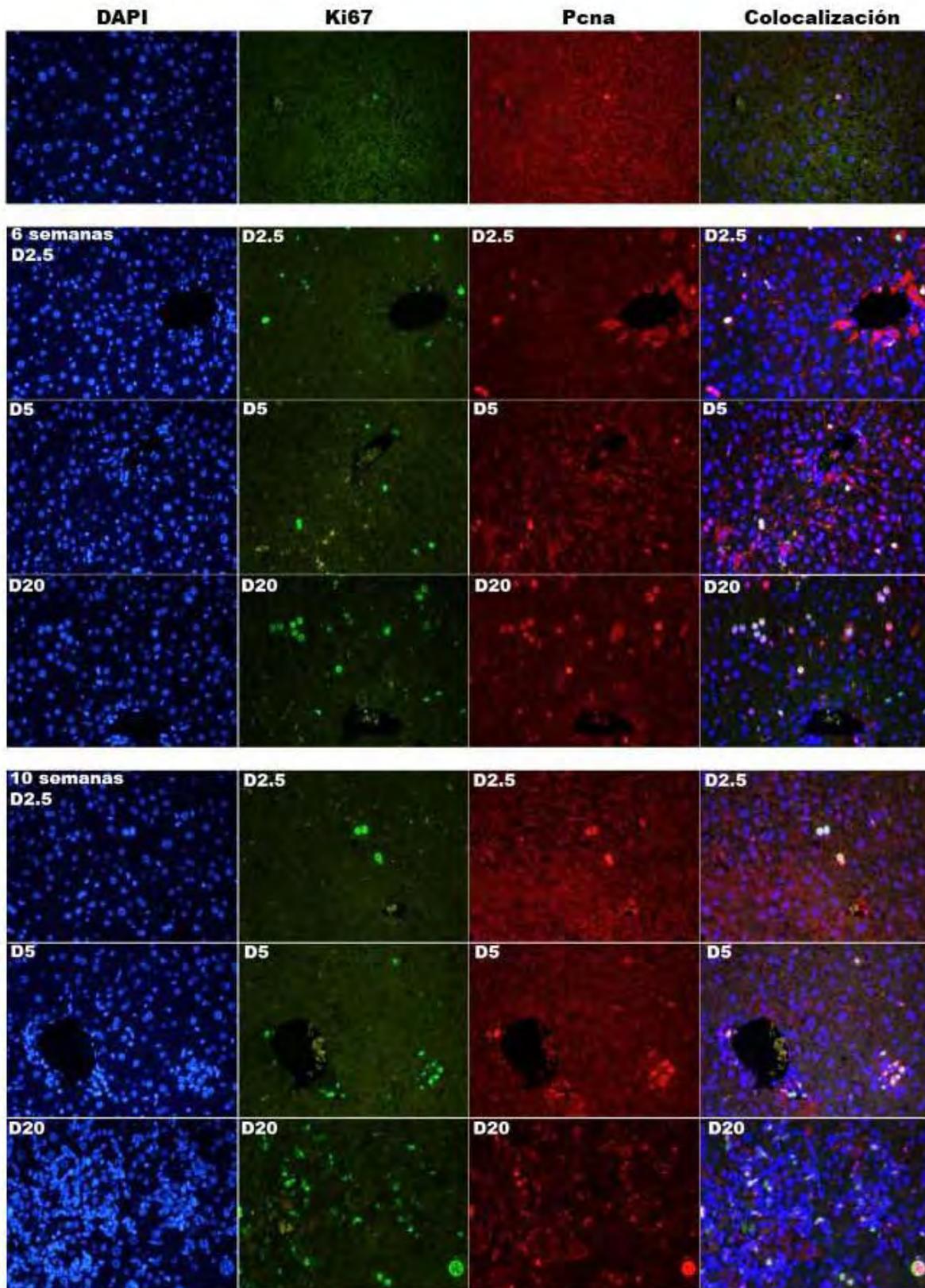
B

Núcleos Ki67 + (veces de cambio/control)				
Tratamiento	6 semanas	10 semanas	14 semanas	18 semanas
	Promedio ± E.E.	Promedio ± E.E.	Promedio ± E.E.	Promedio ± E.E.
Control	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.5
DEN 2.5 mg/kg	4.2 ± 0.9	4.1 ± 1.0	2.5 ± 0.8	2.9 ± 0.7
DEN 5 mg/kg	4.1 ± 1.5	4.1 ± 0.8	2.8 ± 0.7	4.2 ± 0.8
DEN 20 mg/kg	11.2 ± 1.5	18.1 ± 1.4	15.7 ± 1.5	28.0 ± 2.1

Figura 12. Impacto de la DEN sobre la inducción del marcador de proliferación Ki67. Después de cuantificar el número de núcleos Ki67 positivos por campo (magnificación microscópica 200x) a partir de los análisis inmunohistoquímicos, los valores obtenidos fueron representados como sigue: **A:** Las barras representan el número promedio de núcleos positivos para Ki67 ± el error estándar. *Diferencia respecto al control, &: Diferencia respecto a DEN 20 mg/kg de 18s. $p < 0.05$, $n = 5$. **B:** La tabla muestra el número de veces de cambio de los núcleos Ki67 positivos respecto a sus controles. Para tal finalidad, los valores obtenidos de los grupos controles fueron igualados a 1; así, aquellos obtenidos de los grupos tratados obtuvieron su valor proporcional. $n = 5$ por cada grupo.

4.4.2 Co-localización de los marcadores Ki67 y Pcn

Con la finalidad de conocer la expresión diferencial de los marcadores de proliferación Ki67 y Pcn, evaluamos su expresión mediante análisis de inmunofluorescencia en el hígado del ratón. Como se esperaba, observamos una co-localización de éstos marcadores en el grupo control, la cual indica que su expresión fue basal; sin embargo, en el hígado de los ratones tratados con DEN a 2.5 y 5 mg/kg se observó una mayor co-localización especialmente a las seis y diez semanas de tratamiento. De manera interesante, ésta fue menor en el hígado de los animales tratados con la misma dosis, pero por catorce y dieciocho semanas. Sin embargo, el fenómeno de co-localización se observó muy marcado en los tejidos de los ratones tratados con 20 mg/kg durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas; misma que fue dosis dependiente (**figura 13**). Es importante señalar que mientras la expresión de Ki67 fue localizada exclusivamente en los núcleos, la de Pcn se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo celular; además, este último se observó en un mayor número de células que la marca de Ki67.



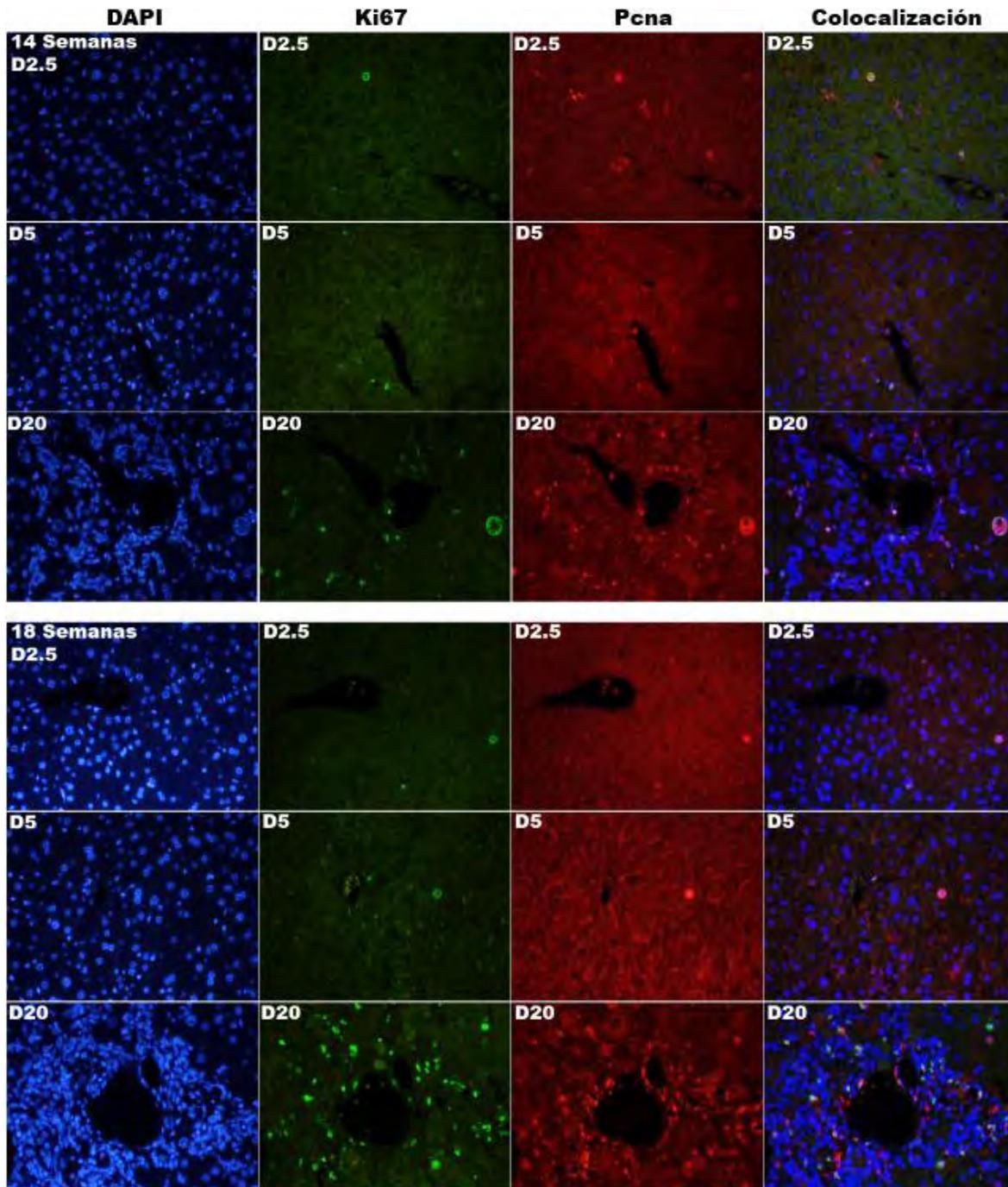


Figura 13. Efecto de la DEN en la inducción del ciclo celular. Fotografías representativas de co-inmunofluorescencia. Ki67 en verde, Pcna en rojo. En la primera columna se muestran las imágenes de DAPI. En la siguiente columna se muestran imágenes de la marca positiva para Ki67, en la tercera columna se observa la marca positiva a Pcna; mientras que, en la última columna se muestra la co-localización de Ki67 y Pcna. El grado de co-localización se puede apreciar en gradientes de color amarillo y blanco. Cada fila de imágenes corresponde a un tratamiento distinto; asimismo, las imágenes fueron agrupadas de acuerdo con la duración del tratamiento (6, 10, 14 y 18 semanas). C: control, D2.5: animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con la DEN 20 mg/kg. n= 5 animales por grupo. Se utilizaron cortes de 2µm embebidos en parafina. Magnificación de las imágenes 400x.

4.5 Efecto de la DEN sobre la expresión del marcador de hepatocarcinogénesis Gstp1

Se conoce que Gstp1 es una proteína que se induce durante la hepatocarcinogénesis experimental³². En esta investigación Gstp1 fue utilizada como un marcador de carcinogénesis a nivel de localización tisular y expresión proteica. Mediante análisis de inmunohistoquímica observamos que en el hígado de los animales control con el carcinógeno la enzima Gstp1 se encontró preferencialmente en áreas circundantes a las venas hepáticas, éste fenómeno no fue alterado por la DEN a 2.5 y 5 mg/kg; sin embargo, se apreció un aumento cualitativo de su expresión y localización a las seis y catorce semanas, respectivamente. En contraste, la dosis de 20 mg/kg indujo una disminución cualitativa de la expresión de Gstp1. Esta dosis provocó que Gstp1 se localizara dispersa en el tejido hepático; en consecuencia, a las diez y catorce semanas, su expresión se observó muy disminuida en áreas próximas a las venas hepáticas. Además, esta misma dosis administrada durante dieciocho semanas confinó su expresión a las áreas tumorales, preferencialmente intratumorales (**figura 14**).

En cuanto a los niveles de expresión proteica, se observó que la Gstp1 tuvo una tendencia de incremento inducida por las dosis de 2.5 y 5 mg/kg durante seis, diez, catorce, y dieciocho semanas; sin embargo, la dosis de 5 mg/kg administrada por catorce y dieciocho semanas provocó un incremento de su expresión el cual fue estadísticamente significativo ($p=0.0026$ y $p=0.0011$, respectivamente). Por otra parte, mientras que el efecto de la dosis de 20 mg/kg a las seis semanas fue nulo, a las diez semanas se observó una tendencia de disminución de su expresión, la cual no mostró cambios significativos a las catorce ni dieciocho semanas (**figura 15**).

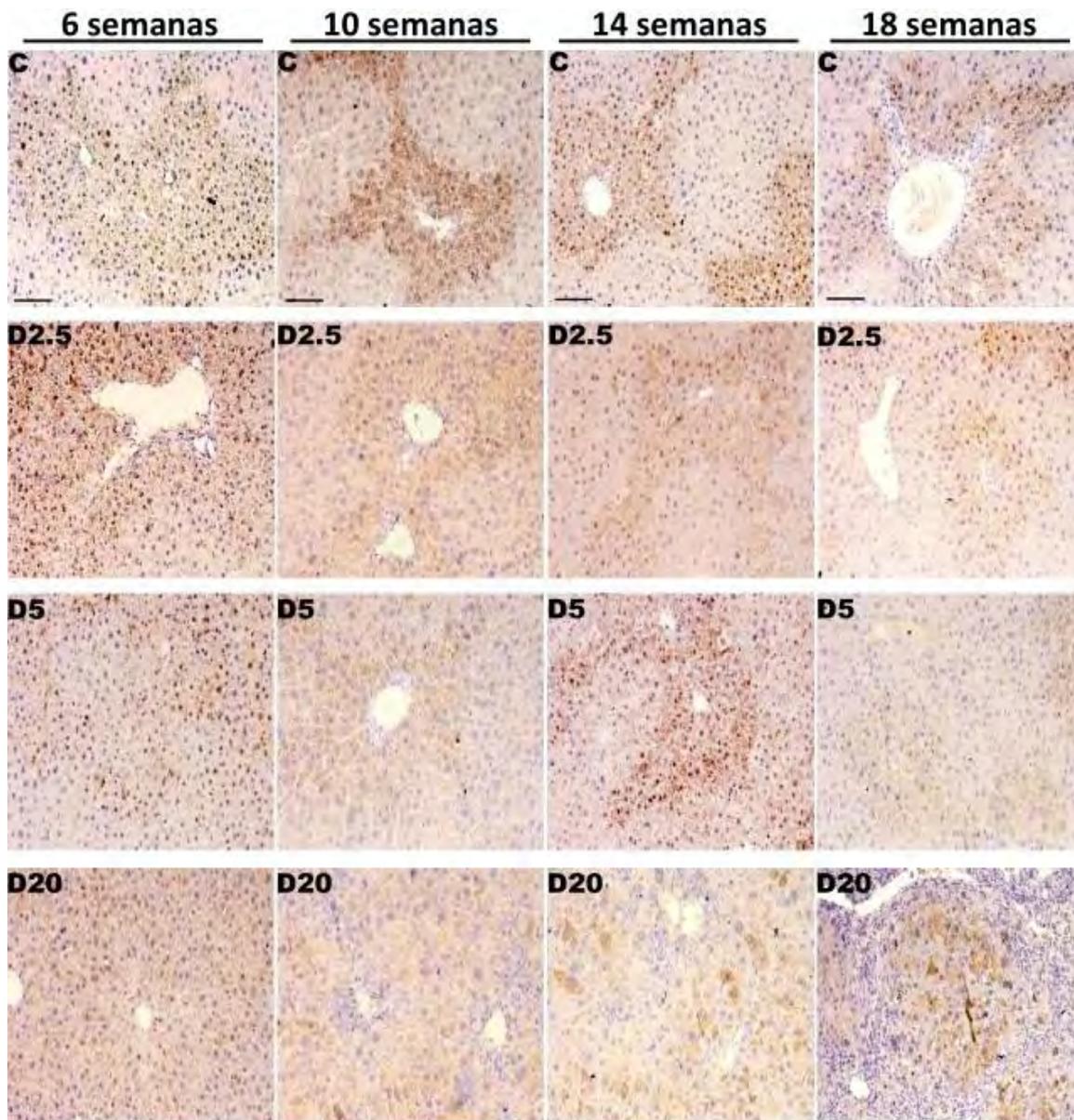


Figura 14. Efecto de la DEN sobre la expresión de la enzima Gstp1 en el hígado del ratón. La localización tisular de Gstp1 fue determinada mediante análisis de inmunohistoquímica. Se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor. La marca positiva a Gstp1 se puede apreciar en áreas o estructuras celulares teñidas en diferentes gradientes de color café. C: control, D2.5: animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con la DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μm . n=5.

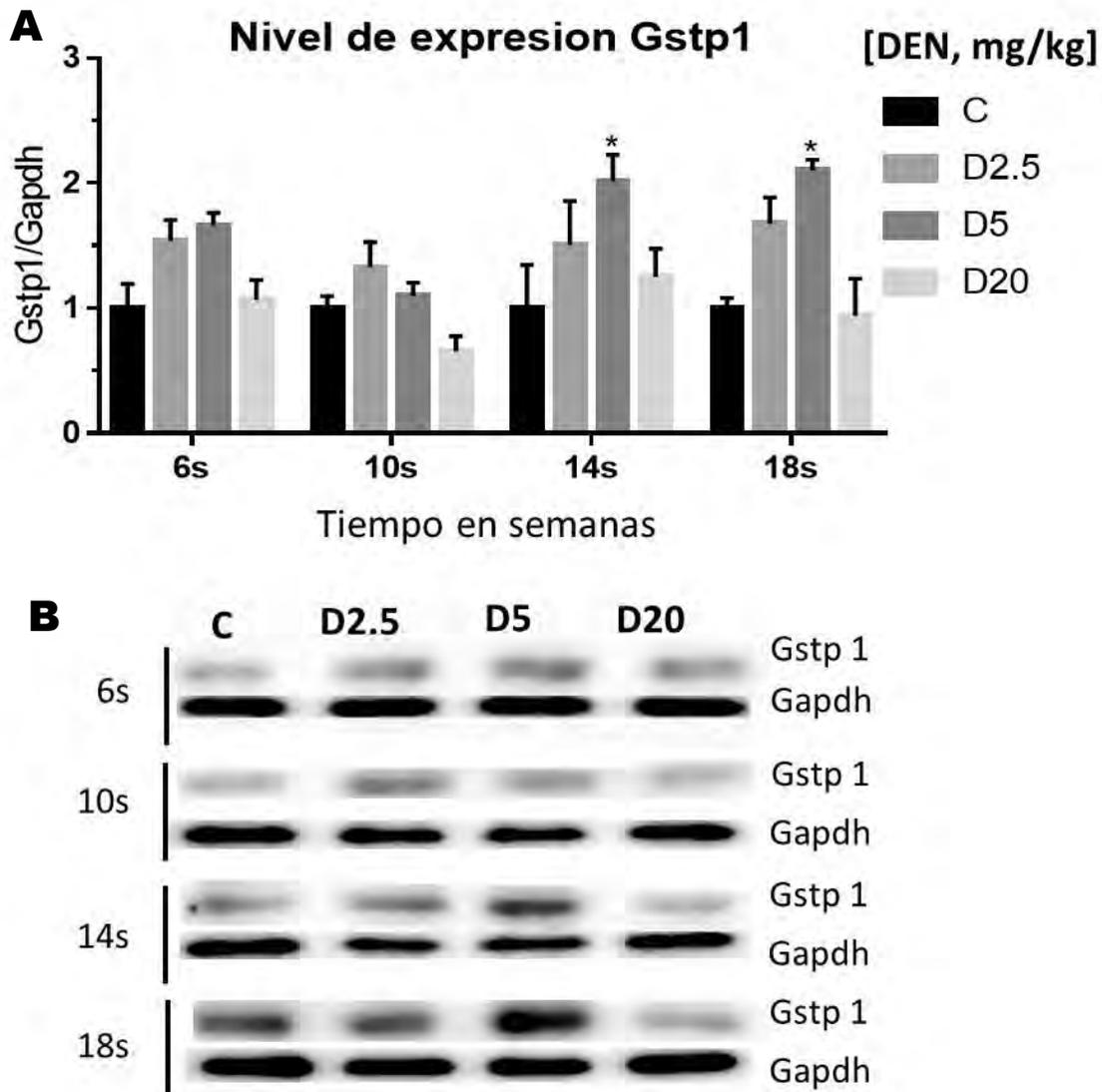


Figura 15. Expresión proteica de Gstp1 en ratones tratados con DEN. **A:** La gráfica representa el análisis densitométrico de la expresión de Gstp1, ésta expresión fue normalizada con la proteína constitutiva Gapdh. Cada barra representa el promedio de la expresión de Gstp1 igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de la DEN. **B:** Las imágenes representan la expresión de Gstp1 mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Gapdh como control de carga. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n = 4$.

4.6 Efecto de la DEN sobre el proceso de apoptosis celular

La caspasa 3 es una de las principales proteínas utilizadas como marcadores de apoptosis¹³, en este trabajo se evaluaron los niveles de la pro-caspasa 3, la forma inactiva de la caspasa 3. Se observó una tendencia a la disminución en la expresión de la pro-caspasa 3 en el hígado de los ratones tratados con DEN a 2.5, 5 y 20 mg/kg durante seis semanas. También, se observó una disminución estadísticamente significativa en su expresión inducida por la dosis de 5 mg/kg durante diez semanas ($p=0.0127$); por otra parte, una tendencia de incremento de su expresión fue promovida por la dosis de 20 mg/kg durante diez y dieciocho semanas, mientras que el tratamiento por catorce semanas provocó un incremento significativo de su expresión ($p=0.0358$), véase **figura 16**.

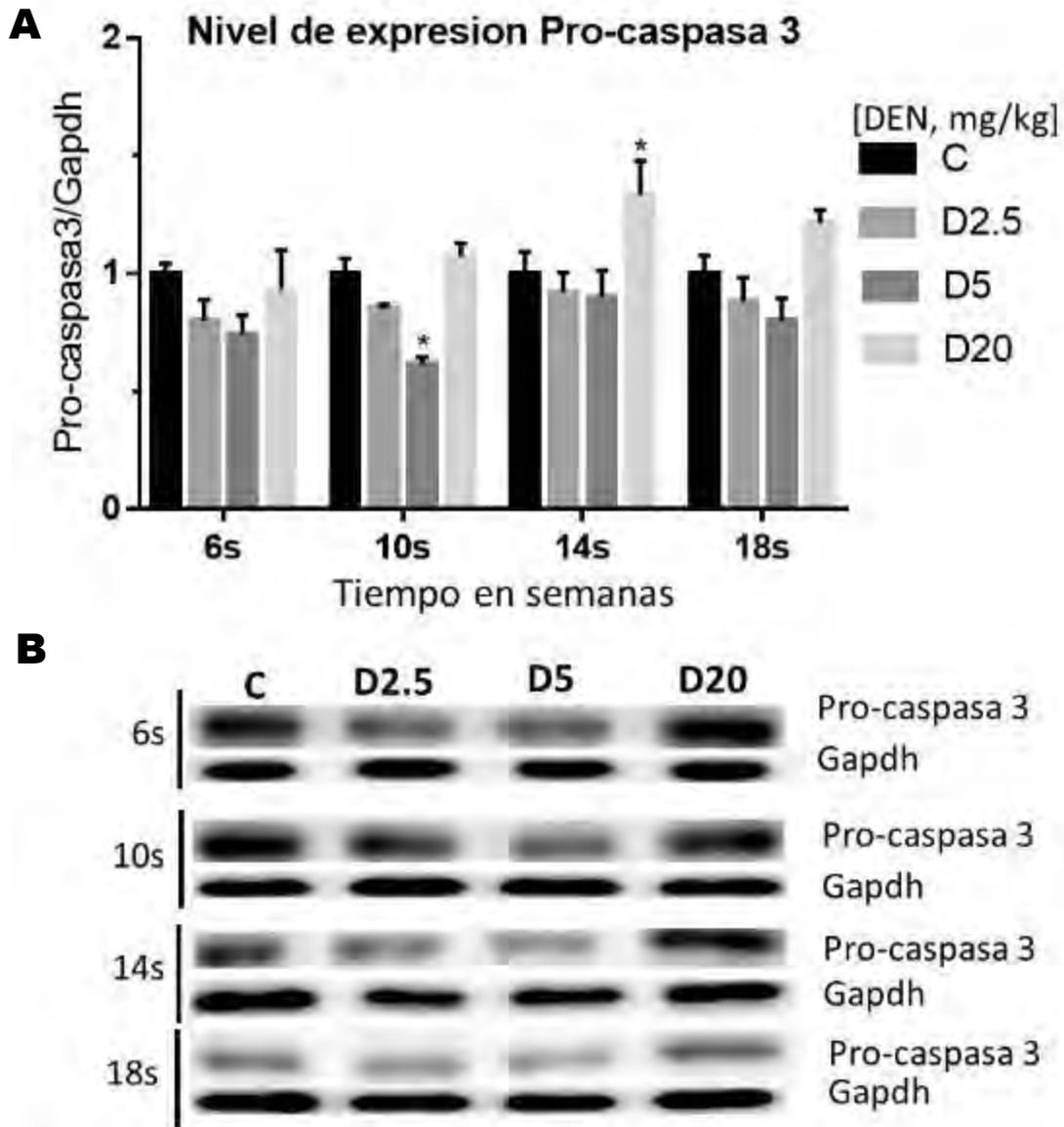


Figura 16. Expresión de Pro-caspasa 3 en ratones tratados con distintas dosis de DEN. **A:** La gráfica representa el análisis densitométrico de la expresión proteica de pro-caspasa 3, dicha expresión fue normalizada respecto a la proteína Gapdh. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de la expresión de pro-caspasa 3 igualada a 1 respecto de cada grupo control; con la finalidad de analizar las veces de cambio entre los diferentes tratamientos. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta del tratamiento con DEN. **B:** Las imágenes representan la expresión de pro-caspasa 3 mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Gapdh como control de carga. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n = 4$ animales por grupo.

4.7 Metabolismo de la DEN en el ratón

Se ha reportado que la enzima Cyp2e1 es una de las principales enzimas que metaboliza la DEN en la rata²⁹. Así, para conocer la localización tisular y la expresión de ésta enzima, determinamos su presencia en el hígado de los ratones tratados con DEN y sus controles mediante análisis de inmunohistoquímica y Western blot, respectivamente. Nuestros resultados demostraron que, en el hígado de los animales no tratados, el Cyp2e1 se localizó principalmente rodeando las venas hepáticas, un resultado similar al observado en aquellos animales tratados con 2.5 y 5 mg/kg durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas, así como con 20 mg/kg por seis semanas. Sin embargo, a las diez y catorce semanas observamos su expresión redistribuida en el parénquima; es decir, en zonas alejadas a las venas hepáticas, esto fue más evidente a las dieciocho semanas de administración con la dosis más elevada, 20 mg/kg. De manera interesante, la expresión del Cyp2e1 se localizó con mayor intensidad de predominio peritumoral. Como resultado podemos concluir que la expresión de ésta enzima disminuyó dosis y tiempo dependiente (**figura 17**).

Al analizar la expresión proteica de la enzima Cyp2e1 en el tejido hepático de los animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg durante seis semanas, encontramos una tendencia de incremento en su expresión; sin embargo, ésta disminuyó en los tiempos subsecuentes. Por su parte, con la dosis de 5 mg/kg observamos una tendencia de disminución en su expresión a partir de la semana diez hasta la dieciocho. Es importante resaltar que la dosis de 20 mg/kg disminuyó significativamente la expresión de esta enzima desde la semana seis, hasta la dieciocho ($p=0.0035$, $p=0.0006$, $p=0.0004$ y $p=0.0001$ respectivamente). Con estos resultados confirmamos que la DEN disminuyó la expresión de la enzima Cyp2e1 y que este efecto fue dosis y tiempo dependiente, congruente con lo que se apreció a través de los análisis de IHQ (**figura 18**).

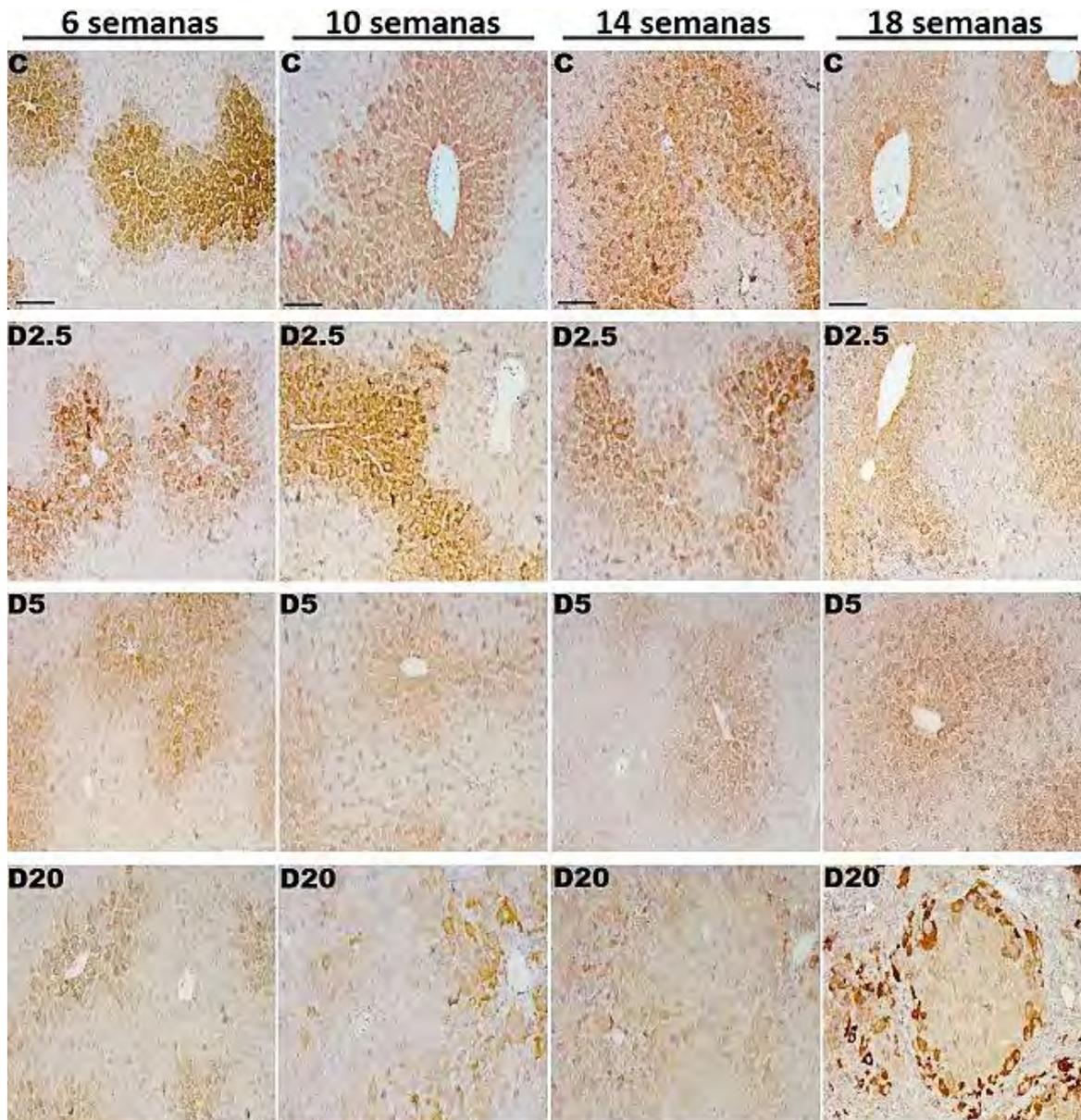


Figura 17. Efecto de la DEN sobre la localización estructural de la enzima Cyp2e1 en hígado del ratón. Se determinó la localización tisular de Cyp2e1 mediante análisis de IHQ. Se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor. La marca positiva a Cyp2e1 se puede apreciar en áreas o estructuras celulares teñidas en diferentes gradientes de color café. C: control, D2.5: animales tratados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con la DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μm . n=5 por grupo.

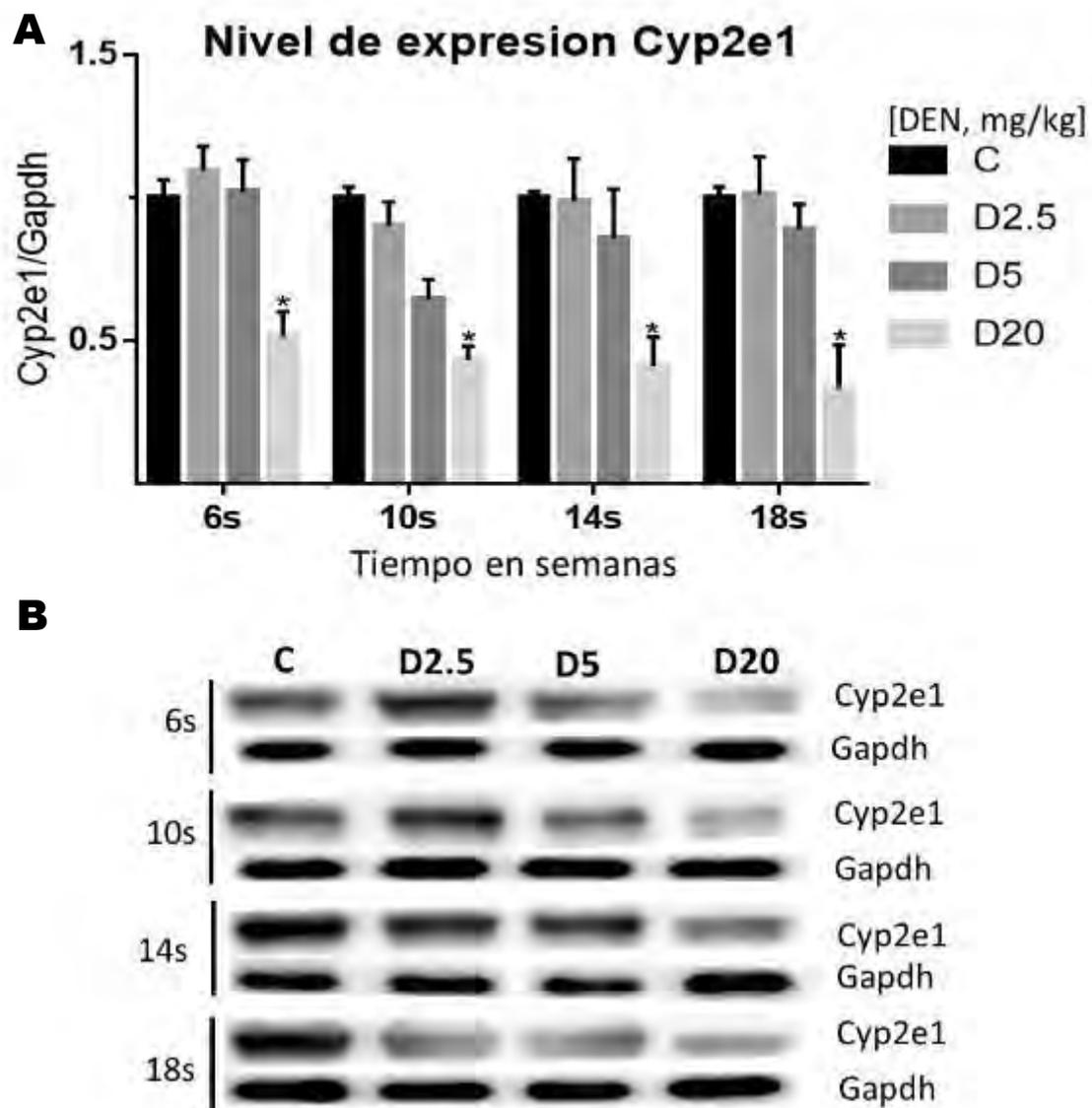


Figura 18. Expresión proteica de Cyp2e1 en hígados de ratones tratados con DEN. **A:** La gráfica representa el análisis densitométrico de la expresión proteica de Cyp2e1 determinada por WB, dicha expresión fue normalizada respecto a la proteína Gapdh. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de la expresión de Cyp2e1 igualada a 1 respecto de su control; con la finalidad de analizar las veces de cambio entre los diferentes tratamientos. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta del tratamiento con la DEN. **B:** Se muestra la imagen representativa de la expresión de Cyp2e1 obtenida por la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Gapdh como control de carga. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n = 4$.

4.9 Producción de EROs

El daño oxidativo provocado por la DEN en el hígado del ratón se evaluó mediante la medición de las EROs con un ensayo de espectrofluorimetría. El incremento en los niveles de EROs lo observamos en todas las dosis y tiempos evaluados ($p < 0.005$ para todos los casos), como se observa en la **figura 19**. Cabe resaltar que la administración durante seis semanas con la dosis de 2.5 mg/kg provocó el mayor incremento de EROs así como la dosis de 20 mg/kg administrada por dieciocho semanas.

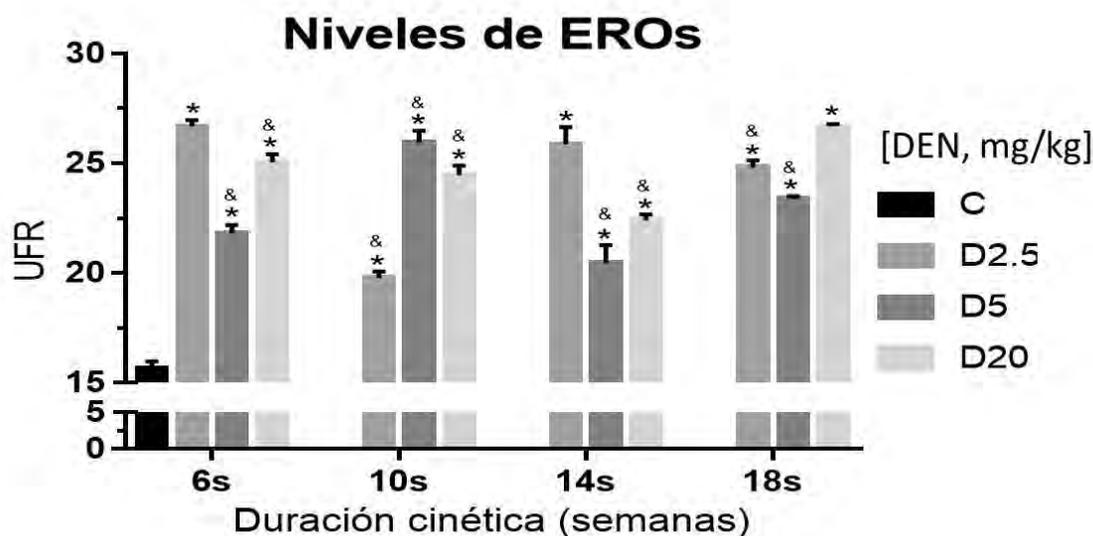


Figura 19. Efecto de la DEN sobre la producción de EROs. Mediante un ensayo de espectrofluorimetría se determinaron los niveles de EROs en el hígado de los animales tratados con la DEN. Las unidades de fluorescencia relativas (UFR) son directamente proporcionales a la cantidad de EROs. Las barras en la gráfica representan el promedio de las UFRs llevadas a 1; con la finalidad de analizar las veces de cambio, \pm el error estándar. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). &: Diferencia estadísticamente significativa respecto a D20 de 18s ($p < 0.05$). Se realizó un *pool* por grupo. $n=3$ mediciones por *pool*.

4.10 Efecto de la DEN en la producción de 4-HNE

Evaluamos los niveles del 4-HNE con una prueba de ELISA para conocer el efecto de la DEN sobre la producción de este aducto; debido a que, el 4-HNE es un potente agente alquilante producto de la lipoperoxidación que juega un papel central en la señalización inducida por el estrés oxidativo y toxicidad oxidante³³. Observamos que la dosis 20 mg/kg incrementó los niveles de 4-HNE a las diez y dieciocho semanas de administración ($p < 0.05$). También, observamos una tendencia de incremento de los niveles de 4-HNE en el resto de los tratamientos, excepto por la dosis de 2.5 mg/kg a las 14 semanas de exposición al carcinógeno (figura 15).

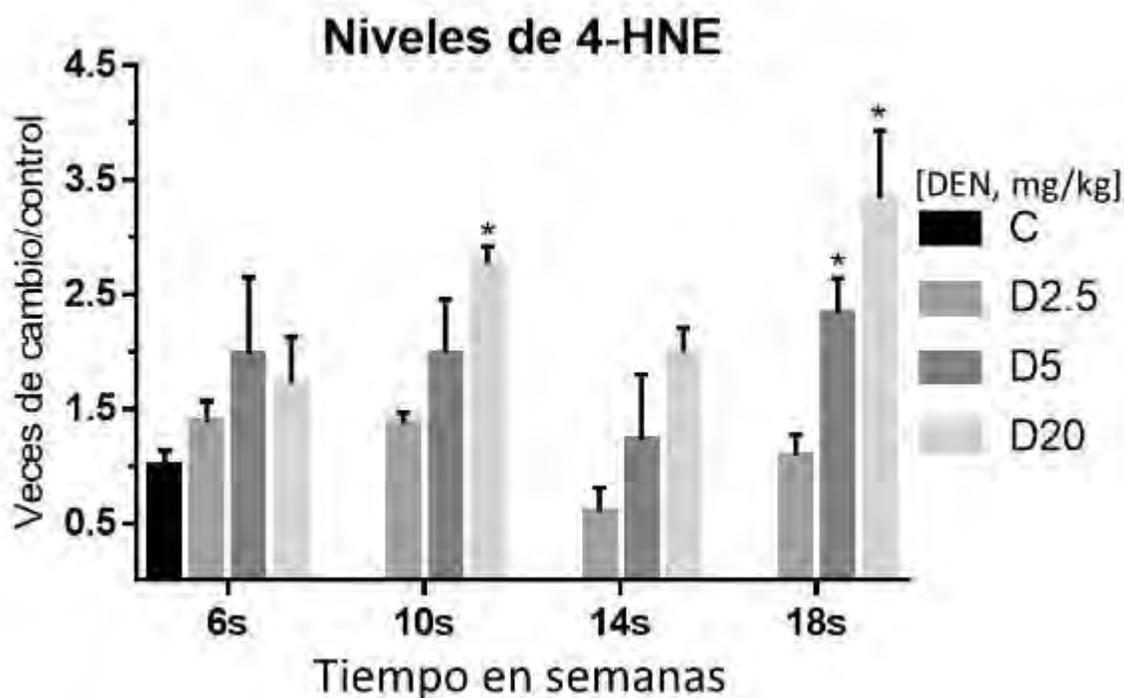


Figura 20. Efecto de la DEN sobre los niveles de 4-HNE en el ratón. Se realizó un análisis de ELISA para medir los niveles de 4-HNE. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de la absorbancia de la ELISA igualada a 1 respecto al grupo control; con la finalidad de analizar las veces de cambio de los niveles de 4-HNE entre los diferentes tratamientos. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta del tratamiento con la DEN. C: control, D2.5: animales tratados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). &: Diferencia estadísticamente significativa respecto a D20 de 18s ($p < 0.05$). Se realizó un pool por grupo. $n=3$ mediciones por pool.

Capítulo 5. Discusión

El CHC está considerado como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, ya que es el segundo cáncer más letal a nivel mundial³⁴. Debido a que su aparición en el ser humano requiere de un largo periodo de exposición a pequeñas cantidades de diferentes agentes etiológicos, se han desarrollado modelos experimentales que reproducen su progresión en periodos muy cortos y que permiten estudiar y entender su comportamiento en roedores³⁵. Sin embargo, los mejores modelos de hepatocarcinogénesis experimental hasta ahora descritos; por un lado, utilizan dosis carcinogénicas muy elevadas, a las cuales el ser humano no está expuesto normalmente, y por otro, el roedor más utilizado en estos modelos es la rata²¹. Otra limitante de estos modelos, es que en comparación con la rata, el ratón tiene una relación más estrecha con algunos genes relacionados con el desarrollo del cáncer, como son p53, c-Myc y ciclooxigenasa-2³⁶. Por lo tanto, con la finalidad de contar con una herramienta para estudiar con mayor aproximación a lo que ocurre en el ser humano, caracterizar un modelo de hepatocarcinogénesis experimental en el ratón puede ser de gran utilidad para el estudio de la progresión del CHC y así extrapolar su comportamiento al ser humano como una herramienta que eventualmente, contribuya en un mejor diagnóstico de la enfermedad. Así, en este trabajo realizamos la caracterización a nivel histopatológico y molecular de un modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón, que paralelamente, nos permita determinar el efecto sinérgico de compuestos hepatotóxicos a los que comúnmente se expone el ser humano.

Uno de los parámetros utilizados como referencia para estimar el daño provocado por determinado agente tóxico en roedores, es el registro y comparación de su peso corporal durante el tiempo que dure la exposición a esos agentes^{27,31}. Con este parámetro se puede inferir de manera preliminar el efecto dosis-respuesta de una sustancia con la finalidad de obtener la relación más eficiente, sobre todo cuando se desconoce la mejor dosis y el tiempo en que se debe exponer al animal del modelo experimental en cuestión. Previamente, en nuestro grupo de investigación determinamos el efecto dosis-respuesta de la DEN a 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg de DEN/kg de peso corporal durante seis semanas. Encontramos que mientras la dosis de 40 mg/kg disminuyó significativamente el peso corporal de los ratones e incluso, sólo el 30% de los animales sobrevivieron al tratamiento, la de 20 mg/kg impidió la ganancia

del peso corporal, es decir, el peso corporal se mantuvo a lo largo del tratamiento. De manera interesante, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg, no modificaron la ganancia del peso corporal; es decir, ésta fue similar a los animales control. Con base en estos resultados, en este estudio se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 los cuales fueron tratados con 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal dos veces por semana vía intraperitoneal, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Observamos que, aunque las dosis bajas (2.5 y 5 mg/kg) disminuyeron el peso corporal de los animales tratados comparado con los controles a las dieciocho semanas, no hubo variación en la tendencia de su incremento a lo largo del tiempo, mientras que, la dosis de 20 mg/kg impidió este incremento e indujo una tendencia a la disminución del peso corporal principalmente a las dieciocho semanas de su administración. Con esto podemos concluir que las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de DEN no fueron lo suficientemente perjudiciales para provocar una disminución importante del peso corporal de los animales y que la dosis 20 mg/kg, aunque no permitió el incremento del peso corporal, éste se mantuvo hasta el término del tratamiento comparado con su peso inicial. Además, al analizar el peso relativo del hígado, las dosis de 2.5 mg/kg a las seis semanas, y 20 mg/kg a las dieciocho semanas indujeron un incremento significativo en el peso del hígado comparado con sus respectivos controles. Estos resultados sugieren que las dosis seleccionadas de la DEN a pesar de no provocar un daño radical al animal, sí indujeron alteraciones en el tejido hepático y afectaron la masa de este órgano. Adicionalmente, de manera macroscópica apreciamos una pérdida de la integridad del hígado de los animales tratados con la DEN, el hígado perdió su textura y color característico. Finalmente, nódulos de regeneración fueron apreciados en los animales expuestos durante dieciocho semanas a la DEN 20 mg/kg.

En modelos de hepatocarcinogénesis experimental se ha reportado que la DEN provoca alteraciones en la arquitectura hepática así como desarrollo de tumores³⁷. Esto ha sido analizado mediante distintos métodos, uno de los más utilizados es la tinción de H&E, la cual permite tener una primera perspectiva de las alteraciones que se inducen sobre la arquitectura del tejido. Se ha reportado que, en ratones C57BL/6 de catorce días de edad tratados con una única dosis de 10 mg/kg de la DEN, se induce una pérdida de la arquitectura hepática, hay pleomorfismo celular, pérdida de cordones de hepatocitos y presencia de nódulos a las treinta y seis semanas²⁹. En este trabajo observamos que en los ratones tratados con las dosis 2.5 y

5 mg/kg durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas, la DEN indujo una pérdida en la definición de los cordones de hepatocitos, de espacios sinusoidales y presencia de células inflamatorias, lo cual se acentuó conforme incrementó el tiempo de exposición al carcinógeno. Además, en los ratones tratados con DEN a 20 mg/kg, a partir de las diez semanas de tratamiento, observamos hepatocitos de gran tamaño, anisonucleosis, proliferación de células tipo colangiolar y la formación de tumores bien definidos los observamos a las dieciocho semanas. Con estos resultados podemos concluir que el modelo de hepatocarcinogénesis experimental aquí propuesto, indujo alteraciones en la arquitectura hepática las cuales incrementaron conforme al aumento de la dosis y tiempo de exposición a la DEN. Los resultados indican de manera contundente que la administración durante dieciocho semanas con la dosis 20 mg/kg ocasionó la pérdida de la arquitectura del tejido hepático y la formación de tumores.

La arquitectura normal del hígado puede ser perturbada por la inducción de procesos fibrogénicos que resultan en la acumulación progresiva de fibras de colágena y en la escasa remodelación de la matriz extracelular³⁸. La fibrosis hepática es consecuencia de la respuesta sostenida de cicatrización de heridas a diversas lesiones hepáticas crónicas y se caracteriza por la sustitución progresiva del tejido hepático funcional con matriz extracelular rica en colágena. Como resultado, la fibrosis se observa como un incremento y presencia de fibras de colágena en el parénquima hepático las cuales, en condiciones normales sólo se localizan en las células endoteliales hepáticas³⁹. Una de las técnicas utilizadas para observar fibras de colágena en el tejido hepático es la tinción tricrómica de Masson, la cual detecta su presencia en tonalidades de color azul. Se ha reportado que en ratas administradas con 50 mg/kg de la DEN durante catorce semanas, se induce una gran cantidad de fibras de colágeno en el parénquima hepático⁴⁰. Bajo el esquema de administración propuesto en el presente modelo de hepatocarcinogénesis experimental observamos que, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de DEN no alteraron la deposición de fibras de colágeno. Los septos de fibra se observaron en el parénquima hepático de los animales tratados con DEN 20 mg/kg a las dieciocho semanas. Estos resultados sugieren que, nuestro modelo de hepatocarcinogénesis experimental reproduce etapas tempranas del proceso de fibrosis, principalmente con la dosis de 20 mg/kg a las dieciocho semanas. Esto sugiere que el proceso de fibrosis inducido por la DEN contribuyó en la pérdida de la arquitectura del tejido hepático, un fenómeno comúnmente

encontrado en procesos fibróticos crónicos inducidos por diferentes agentes etiológicos en el ser humano. La fibrosis en un estado avanzado concluye en cirrosis, insuficiencia hepática e hipertensión portal, y se estima que entre el 60% y 80% de los casos de CHC son resultado de la cirrosis crónica, la cual se considera como una etapa pre-cancerígena⁴¹. Así, podemos concluir que el modelo de hepatocarcinogénesis propuesto tiene el potencial de inducir la fibrosis como un proceso previo y/o simultáneo a la aparición del CHC, como ocurre en el ser humano.

El fenómeno de la fibrosis crónica está asociado con las etapas tempranas del desarrollo de tumores debido a que favorece la supervivencia y proliferación de células cancerígenas. La proliferación celular es considerada un fenómeno importante en el desarrollo y progresión del cáncer; debido a que en este proceso se alteran la actividad y expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular. Hay una activación constitutiva de rutas de transducción de señales de la proliferación durante la progresión del cáncer⁸. Una de las proteínas relacionadas con el ciclo celular que ha sido utilizada como marcador de proliferación celular es Ki67, la cual mediante análisis de IHQ se ha encontrado incrementada en diferentes tejidos, incluido el hígado de ratas administradas con DEN⁴⁰. En este trabajo determinamos el efecto de la DEN sobre la expresión de Ki67 mediante análisis de IHQ. Nuestros resultados muestran que Ki67 respondió a la DEN de manera similar a la respuesta que ha tenido en trabajos ya reportados; es decir, desde las dosis menores (2.5 y 5 mg/kg) hubo un incremento de hasta cuatro veces más núcleos Ki67 positivos. De manera interesante, dieciocho semanas después de administrar 20 mg/kg de DEN observamos un incremento aún más evidente el cual se reflejó como un cociente de 28 veces más núcleos Ki67 positivos respecto a los animales control. Otra de las proteínas relacionadas con la proliferación celular es la proteína nuclear PCNA, esta es un componente de la maquinaria de replicación y reparación del ADN⁴². PCNA es utilizado como marcador de proliferación celular; además, mediante diferentes técnicas de biología molecular se ha observado que en el CHC de la rata hay un incremento significativo de su expresión⁴³. En este sentido, decidimos evaluar el grado de co-localización entre Ki67 y PcnA para identificar células proliferantes y a la vez, la proporción cualitativa entre ambos marcadores lo cual lo realizamos mediante análisis de inmunofluorescencia. Observamos que su co-localización fue dosis-dependiente, el mayor grado de co-localización lo apreciamos con la dosis de 20 mg/kg respecto a las otras dosis y

el grupo control; además, con las dosis 2.5 y 5 mg/kg observamos que a las catorce y dieciocho semanas la co-localización fue menor incluso que a las seis y diez semanas, pero en ambos casos se apreció una mayor co-localización que en sus respectivos controles. Es importante resaltar que mientras Ki67 estuvo localizada únicamente en los núcleos celulares, Pcn también se observó en el citoplasma de las células en proliferación, lo cual permitió observar un mayor número de células Pcn que de Ki67 positivas. Estos resultados nos permitieron concluir que nuestro modelo de hepatocarcinogénesis experimental provocó la inducción de la proliferación celular, incluso en las dosis más bajas. En conjunto, estos resultados también indican que la inducción de la hepatocarcinogénesis experimental estuvo acompañada de un fenómeno característico del cáncer, la exacerbada proliferación celular en el hígado del ratón.

Además de los parámetros de proliferación, y para corroborar la inducción del cáncer hepático, decidimos evaluar un marcador de hepatocarcinogénesis ampliamente utilizado, la expresión de Gstp1. Mediante varios análisis en modelos de hepatocarcinogénesis se ha reportado que esta proteína marca de manera específica las lesiones precancerosas y los tumores hepáticos^{32,43}. La detección de GSTP1 metilada en sangre se ha propuesto como un marcador del CHC; debido a que, mientras la GSTP1 en sangre de pacientes con CHC se encuentra metilada,¹⁷ en las biopsias de éstos, su expresión depende del grado de metilación de la enzima. Mediante análisis de IHQ se ha observado que si GSTP1 no está metilada, se encuentra preferencialmente en lesiones preneoplásicas hepáticas, mientras que si está metilada, se encuentra ausente en las biopsias de CHC⁴⁴. De esta manera, en este trabajo decidimos evaluar la localización tisular y la expresión proteica de la Gstp1 en los hígados de los animales expuestos a la DEN. En el caso de los animales tratados con 2.5 y 5 mg/kg, así como en los ratones control, la Gstp1 se localizó preferencialmente perivascular; sin embargo, con la dosis de 20 mg/kg no apreciamos una localización específica. A las dieciocho semanas de tratamiento con la misma dosis su expresión se observó en zonas internodulares, lo cual es congruente con lo reportado previamente en el CHC de la rata³², en nuestro estudio observamos que la marca positiva para Gstp1, se fue perdiendo conforme incrementó la dosis y tiempo de exposición a la DEN. En cuanto a la expresión proteica, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas, así como la de 20 mg/kg a las catorce semanas de tratamiento, indujo una tendencia al incremento de su

expresión; sin embargo, al administrar la dosis 20 mg/kg durante seis diez y dieciocho semanas no se observó cambio significativo en su expresión. Es importante resaltar que el comportamiento de la *Gstp1* con las dosis 2.5 y 5 mg/kg concuerda con lo reportado en el CHC de la rata⁴⁰. De acuerdo con lo previamente encontrado en seres humanos⁴⁴, la ausencia en el cambio de expresión de *Gstp1* observado con la dosis 20 mg/kg, nos podría sugerir que muy probablemente el grado de metilación de esta enzima se incrementa respecto a las demás dosis indicando que en la sangre de estos animales podríamos encontrarla metilada, como marcador de la presencia de tumores en el hígado de los ratones sometidos a 20 mg/kg de DEN. Análisis posteriores serán necesarios para corroborar esta propuesta.

Las GSTs han sido reportadas como moduladores de la vía de señalización de la apoptosis; se ha demostrado que *GSTP1* está implicada en la regulación negativa de la vía apoptótica mediante la inhibición de JNK1 a través de interacciones proteína-proteína¹⁵. La apoptosis puede ser medida por varios métodos; la activación de las caspasas es uno de los marcadores bioquímicos más conocidos, esta activación se puede medir por la detección inmuno-específica de la proporción entre procaspasa-3 y/o su forma activa, la caspasa-3. Debido a que la apoptosis es uno de los procesos biológicos que se alteran durante el desarrollo del cáncer decidimos evaluar la expresión de la procaspasa-3; la forma inactiva de la caspasa-3⁴⁵. Encontramos que las dosis de 2.5 y 5 mg/kg indujeron una tendencia a la disminución de la expresión de procaspasa-3; mientras que con la dosis 20 mg/kg, observamos una tendencia de incremento de esta proteína. Con base en estos resultados podemos concluir que la mayor expresión de procaspasa-3 observada por efecto de la dosis de 20 mg/kg es indicativo de una disminución de la apoptosis, esto debido a que su forma activa, la caspasa-3, se forma por un corte proteolítico de la procaspasa-3, lo cual no sucedió¹². Con esto, además podemos sugerir que si hay una subexpresión de la caspasa-3, proteína efectora de la vía apoptótica¹², que posiblemente este proceso se encuentre inhibido por efecto de la dosis 20 mg/kg, sin embargo, para las dosis más bajas la apoptosis podría estar activa. Este fenómeno es congruente con el proceso de evasión de la apoptosis que las células cancerosas promueven principalmente, en etapas avanzadas del desarrollo del cáncer.

La CYP2E1 es una enzima perteneciente a la familia de los citocromos P450 (CYP), éstas enzimas tienen un rol importante en el metabolismo de xenobióticos como el etanol, acetonas, drogas y procarcinógenos⁴⁶. Se ha demostrado que en la rata, la DEN incrementa la expresión

del CYP2E1 para metabolizarla mediante procesos de oxidación y como resultado forma productos altamente reactivos los cuales pueden promover la hepatocarcinogénesis. Adicionalmente, está reportado que la depleción del CYP2E1 provoca una disminución en la incidencia y multiplicidad tumoral en la hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón²⁹. Es por esto que evaluamos el comportamiento del CYP2E1 mediante IHQ y WB como un marcador del metabolismo de la DEN. Nuestros resultados demostraron que la DEN disminuyó la expresión proteica de esta enzima conforme incrementó el tiempo de exposición al carcinógeno; aunque, incrementó su expresión y localización preferencialmente perinodular/tumoral en el hígado de los ratones tratados con DEN a 20 mg/kg durante dieciocho semanas. Esto concuerda con lo reportado en biopsias de pacientes con CHC donde se encontró una disminución de su expresión en tumores pobremente diferenciados⁴⁷. Aunque nuestros resultados sugieren que la DEN disminuye la expresión del CYP2E1, una enzima que puede ser indispensable en su metabolismo en el hígado del ratón, otras enzimas de la misma familia pudieran ser activadas para metabolizar la DEN y en consecuencia inducir la hepatocarcinogénesis en el ratón; esto debido a que el CYP2E1 no es la única enzima que puede metabolizar la DEN. Se ha reportado a las veinticuatro horas después de administrar 200 mg/kg de DEN, que la actividad del CYP2B1/2 esta incrementada en el hígado de la rata⁴⁸. Este antecedente sugiere que un posible candidato alternativo del metabolismo de la DEN en el hígado del ratón podría ser el CYP2B1/2.

Adicionalmente, el estrés oxidativo tiene un papel fundamental en la progresión y desarrollo del cáncer incluido el CHC. El estrés oxidativo se define como la pérdida de la homeostasis óxido-reducción (redox); es decir, cuando la respuesta de la maquinaria antioxidante es superada por la producción de EROs, los niveles de EROs incrementan y puede generar un estrés oxidativo en el microambiente celular⁴⁹. Así, en este trabajo determinamos los niveles de EROs inducidos por efecto de la DEN en el hígado del ratón⁵⁰. Para determinar los niveles de EROs en nuestro modelo de hepatocarcinogénesis experimental utilizamos el kit de análisis de EROs intracelular de Cell BioLabs Inc., el cual determina de manera indirecta las EROs en muestras tisulares. Observamos que todas las dosis de DEN (2.5, 5 y 20 mg/kg), durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas incrementaron los niveles de EROs. Cabe resaltar que el incremento entre la dosis 2.5 mg/kg por 6 semanas y la de 20 mg/kg durante 18 semanas fueron muy similar. Para el caso de la menor dosis, estos resultados se puede

atribuir a que la bioactivación de la DEN induce la producción de EROs³⁵, sin embargo, el incremento observado con la dosis 20 mg/kg podría ser causado por la ineficiencia de la maquinaria antioxidante para eliminar las EROs producidas.

Las EROs inician la lipoperoxidación autocatalítica que da como resultado la formación de moléculas electrofílicas tóxicas y radicales libres. El 4-HNE es uno de los productos electrófilos de esta lipoperoxidación, este producto forma aductos con proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos los cuales juegan un papel importante en el proceso de carcinogénesis. Se ha reportado que el 4-HNE está aumentado en enfermedades relacionadas con estrés oxidativo como en el caso del cáncer³³. El 4-HNE es utilizado como un marcador para medir el aumento del estrés oxidativo⁵¹, por lo tanto, la información anterior nos indica que la determinación de los niveles de esta molécula podría confirmar el efecto de la DEN sobre la producción de EROs en el hígado del ratón. Nuestros resultados demuestran una tendencia de incremento de los niveles del 4-HNE en los animales tratados con DEN. Este incremento fue significativo cuando administramos la dosis de 20 mg/kg durante diez y dieciocho semanas. Estos resultados indican que la inducción del estrés oxidativo, sobre todo utilizando la dosis de 20 mg/kg, fue dosis y tiempo dependiente, especialmente durante el mayor tiempo de exposición al carcinógeno. Los resultados nos permiten sugerir que el incremento del 4-HNE en el hígado de los ratones tratados con DEN, podría estar alterando la vía de señalización de la apoptosis, debido a que esta molécula funciona como un segundo mensajero de esta vía³³.

Capítulo 6. Conclusiones

En esta investigación, realizamos la caracterización de un modelo de hepatocarcinogénesis experimental en el ratón, a través de la descripción de las alteraciones histopatológicas y moleculares que ocurren en el hígado del ratón expuesto a diferentes dosis de DEN, en consecuencia, proponemos parámetros de dosis y tiempo de la administración de la DEN que pudieran ser óptimos tanto para inducir de manera crónica la hepatocarcinogénesis en el ratón como para administrarla de manera sinérgica con otros agentes hepatotóxicos como el etanol. En este sentido, las dosis seleccionadas y utilizadas de DEN para este proyecto (2.5, 5 y 20 mg/kg) provocaron distintas alteraciones en el tejido hepático, las cuales afectaron la arquitectura del tejido hepático; la presencia de las proteínas del ciclo celular Ki67 y PCNA; la expresión y localización del marcador de hepatocarcinogénesis GSTP1; la expresión del marcador de apoptosis procaspasa-3, la expresión y localización de la enzima CYP2E1; la producción de EROs y la del 4-HNE. Demostramos que el daño hepático incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición a la DEN, aunque las dosis más bajas (2.5 y 5 mg/kg) no provocaron un daño hepático importante, sí indujeron la proliferación celular, el incremento de las EROs y del 4-HNE. La dosis 5 mg/kg incrementó la expresión de GSTP1 a las catorce semanas de tratamiento; la misma dosis, pero a las diez semanas de tratamiento provocó disminución de la expresión de la procaspasa-3. La dosis de DEN 20 mg/kg administrada durante dieciocho semanas ocasionó el mayor daño, provocó la pérdida total de la arquitectura hepática e incluso la formación de tumores y/o nódulos preneoplásicos, el desarrollo de etapas tempranas de fibrosis, incrementó la presencia de las proteínas de proliferación celular Ki67 y PCNA, aunque no se observó alteración en la expresión proteica de la GSTP1 provocó el incremento de la procaspasa-3, el decremento de la expresión del CYP2E1 y además el incremento de los niveles de EROs y del 4-HNE. En conjunto, concluimos que la dosis óptima para inducir la hepatocarcinogénesis en el ratón es la dosis de 20 mg/kg de DEN durante dieciocho semanas. Además, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de DEN pueden ser útiles para evaluar el efecto sinérgico entre la DEN y otras sustancias hepatotóxicas.

Capítulo 7. Perspectivas

Con base en nuestros resultados, en primera instancia, el protocolo experimental de este modelo de hepatocarcinogénesis, resulta atractivo y de utilidad como una herramienta para el estudio del efecto sinérgico de la DEN con otras sustancias hepatotóxicas. En particular en nuestro equipo de investigación buscamos utilizar este modelo para determinar el efecto sinérgico entre la DEN y el consumo crónico de etanol en la progresión de la enfermedad hepática alcohólica y eventualmente en el desarrollo del CHC. Así como también, para describir los mecanismos moleculares asociados a estas enfermedades. Nuestros resultados han generado inquietudes interesantes que nos permitirán tener una caracterización más completa del modelo. Por mencionar algunas, nos inquieta saber: ¿Cómo afectan las diferentes dosis de DEN el perfil de expresión génica global? ¿Cuál es el estatus de la actividad enzimática del Cyp2e1? ¿Podría el Cyp2b 1/2 estar participando en el metabolismo de la DEN en el hígado del ratón? Al respecto; hemos planteado una estrategia experimental que nos permitirá abordar cada una de las preguntas y así explicar la progresión de enfermedades hepáticas crónicas en un modelo que no sólo reproduce enfermedades hepáticas, sino también, que la enfermedad propiamente dicha, es inducida como podría ocurrir en el ser humano, es decir, sometidos a pequeñas dosis de los agentes hepatotóxicos por periodos prolongados.

Referencias

1. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin* **49**, 1,33-64 (2011).
2. Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **127**, 2893–2917 (2010).
3. Lafaro, K. J., Demirjian, A. N. & Pawlik, T. M. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **24**, 1–17 (2015).
4. Dhanasekaran, R., Bandoh, S. & Roberts, L. R. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research* **5**, 879 (2016).
5. Carr, B. I. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and treatment. Hepatocellular Carcinoma* (Springer International Publishing, 2016). doi:DOI 10.1007/978-3-319-34214-6
6. Muriel, P. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. (Mica Haley, 2017).
7. Beasley, R. P., Hwang, L.-Y., Lin, C.-C. & Chien, C.-S. Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B Virus: A Prospective Study of 22,707 Men in Taiwan. *Lancet* 1129–1133 (1981). doi:10.1016/S0140-6736(81)90585-7
8. Feitelson, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: mechanism and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* **35**, 25–54 (2015).
9. Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q. & Zheng, J. N. Predict Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* **11**, 1566–1572 (2015).
10. 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.* **9**, 5655–5665 (2016).
11. Stoimenov, I. & Helleday, T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 605–613 (2009).
12. Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742–58 (2014).
13. Persad, R. *et al.* Overexpression of caspase-3 hepatocellular carcinomas. *Mod. Pathol.* **17**, 861–867 (2004).
14. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–489 (1997).
15. Singh, S. Cytoprotective and regulatory functions of glutathione S-transferases in cancer cell proliferation and cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **75**, 1–15 (2015).
16. Li, T. *et al.* Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 683–690 (2013).
17. Jain, S. *et al.* Impact of the location of CpG methylation within the GSTP1 gene on its specificity as a DNA marker for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **7**, (2012).
18. Koch, A. *et al.* Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2003). doi:10.1038/s41571-018-0004-4
19. He, L., Tian, D.-A., Li, P.-Y. & He, X.-X. Mouse models of liver cancer: Progress and recommendations. *Oncotarget* **6**, 23306–23322 (2015).
20. Glauert, H. P., Calfee-Mason, K., Stemm, D. N., Tharappel, J. C. & Spear, B. T. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol. Nutr.*

- Food Res.* **54**, 875–896 (2010).
21. Heindryckx, F., Colle, I. & Van Vlierberghe, H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 367–386 (2009).
 22. Santos, N. P. *et al.* Histology, Bioenergetics and Oxidative Stress in Mouse Liver Exposed to N -Diethylnitrosamine. **930**, 921–929 (2012).
 23. IARC. Some N-nitroso Compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum.* **17**, 327–335 (1978).
 24. Frey, S., Buchmann, A., Bursch, W., Schulte-hermann, R. & Schwarz, M. Suppression of apoptosis in C3H mouse liver tumors by activated Ha- ras oncogene Liver tumors were induced in male C3H mice by a single injection of N -nitrosodiethylamine and characterized with respect to the presence of base substitutions in the hot-spo. **21**, 161–166 (2000).
 25. Zimmers, T. A. *et al.* Effect of in vivo loss of GDF-15 on hepatocellular carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 753–759 (2008).
 26. Shiota, G. *et al.* Inhibition of hepatocellular carcinoma by glycyrrhizin in diethylnitrosamine-treated mice. *Carcinogenesis* **20**, 59–63 (1999).
 27. Schiffer, E. *et al.* Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* **41**, 307–314 (2005).
 28. Jin, M., Ande, A., Kumar, A. & Kumar, S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: Role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell Death Dis.* **4**, e554-10 (2013).
 29. Jin, S. K., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F. J. & Fukushima, S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res.* **67**, 11141–11146 (2007).
 30. Hirose, Y., Naito, Z., Kato, S., Onda, M. & Sugisaki, Y. Immunohistochemical Study of CYP2E1 in Hepatocellular Carcinoma Carcinogenesis: Examination with Newly Prepared Anti-human Cyp2E1 Antibody. *J. Nippon Med. Sch.* **69**, 243–251 (2002).
 31. Alarcón-Sánchez, B. R. Respuesta de la nucleorredoxina, una enzima redox sensible, a estímulos oxidantes patológicos y no patológicos en el hígado del ratón. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2017).
 32. Sánchez-Rodríguez, R. *et al.* Increased expression of prostaglandin reductase 1 in hepatocellular carcinomas from clinical cases and experimental tumors in rats. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**, 186–194 (2014).
 33. Singhal, S. S. *et al.* Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **289**, 361–370 (2015).
 34. Marquardt, J. U., Andersen, J. B. & Thorgeirsson, S. S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 653–667 (2015).
 35. Bakiri, L. & Wagner, E. F. Mouse models for liver cancer. *Mol. Oncol.* **7**, 206–223 (2013).
 36. Cekanova, M. & Rathore, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Des. Devel. Ther.* **8**, 1911–1922 (2014).
 37. Verna, L., Whysner, J. & Williams, G. M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* **71**, 57–81 (1996).
 38. Elpek, G. Ö. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis:

- An update. *World J. Gastroenterol.* **20**, 7260–7276 (2014).
39. Jia, D. *et al.* Pyrroloquinoline-quinone suppresses liver fibrogenesis in mice. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
 40. Gao, J. *et al.* From hepatofibrosis to hepatocarcinogenesis : higher cytochrome P450 2E1 activity is a potential risk factor †. 1–35 doi:10.1002/mc.22851
 41. Chang, J. *et al.* Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis. *J. Hepatol.* **63**, 1413–1420 (2015).
 42. Kelman, Z. PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629–640 (1997).
 43. Arellanes-Robledo, J. *et al.* Celecoxib induces regression of putative preneoplastic lesions in rat liver. *Anticancer Res.* **26**, 1271–1280 (2006).
 44. Zhang, Y. J. *et al.* Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **221**, 135–143 (2005).
 45. Mor, G. & Walker, J. M. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols.* (Humana Press, 2015). doi:10.100097/978-1-4939-1661-0
 46. Liu, H. *et al.* HBx inhibits CYP2E1 gene expression via downregulating HNF4 α in human hepatoma cells. *PLoS One* **9**, (2014).
 47. Ho, J. C., Cheung, S. T., Leung, K. L., Ng, I. O. & Fan, S. T. Decreased expression of cytochrome P450 2E1 is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **111**, 494–500 (2004).
 48. Salcido-Neyoy, M. E., Sierra-Santoyo, A., Beltrán-Ramírez, O., Macías-Pérez, J. R. & Villa-Treviño, S. Celecoxib enhances the detoxification of diethylnitrosamine in rat liver cancer. *World J. Gastroenterol.* **15**, 2345–2350 (2009).
 49. Marra, M. *et al.* Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: An overview. *J. Transl. Med.* **9**, 171 (2011).
 50. Qu, K. *et al.* Reactive oxygen species generation is essential for cisplatin-induced accelerated senescence in hepatocellular carcinoma. *Front. Med. China* **8**, 227–235 (2014).
 51. Shearn, C. T., Reigan, P. & Petersen, D. R. Inhibition of Hydrogen peroxide signaling by 4-hydroxynonenal due to differential regulation of Akt1 and Akt2 contributes to decreases in cell survival and proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1–11 (2012).

Anexos

Anexo 1A. Buffer de lisis no desnaturizante: Para preparar buffer de lisis no desnaturizante se disolvieron todos los componentes en el mismo orden que aparecen en la **tabla 1A** en 40 ml de agua destilada y se disolvió con ayuda de un agitador magnético. Al final se agregó el volumen restante para aforar a 50 ml. Los inhibidores se agregaron al instante de utilizar el buffer.

Buffer de lisis no desnaturizante		
Reactivo	Concentración	Para 50 ml
Tris HCl pH 8 1M	20 mM	1 ml
NaCl 4M	120 mM	1.5 ml
EDTA 500mM	2 mM	0.2 ml
Substituto de nonidet-P40	10%	5 ml
Glicerol	1%	0.5 ml
Inhibidores		
PMSF (Fenil metil sulfonil) 100 mM	1 mM	0.5 ml
Na ₃ VO ₄ 200mM	2 mM	0.5 ml
PhosStop 20X	1X	2.5 ml
Complete Protease Inhibitor Cocktail 25X	1X	2 ml

Tabla 1A. Reactivos necesarios para preparar buffer de lisis no desnaturizante.

Anexo 1B. Buffer de carga 5X: El buffer de carga se realizó con la mezcla de los reactivos de la **tabla 1B**, el 2-mercaptoetanol se agregó al momento de utilizar el buffer. Por cada 85 µl de buffer de carga 5X se agregaron 25 µl de 2-mercaptoetanol.

Buffer de carga 5X		
Reactivo	Concentración	Para 50 ml
Agua destilada	n/a	1.5 ml
Tris HCl pH 6.8 1.5M	300 mM	2 ml
Azul de bromofenol 1%	0.05%	0.5 ml
Glicerol	50%	5 ml
SDS	10%	1g
2-mercaptoetanol	25%	2.5 ml

Tabla 1B. Reactivos utilizados para preparar buffer de carga 5X.

Anexo 1C. Gel de poliacrilamida: Los geles de poliacrilamida se realizaron con los reactivos y cantidades de la **tabla 1C**, para todos los casos primero se preparó el gel separador y después de haber polimerizado se agregó el gel concentrador.

Gel desnaturante de poliacrilamida		
Reactivo	Para 20 ml	
Gel separador	10%	12%
Agua mili-Q	7.9 ml	6.6 ml
Acrilamida/bis-acrilamida mix 30%	6.7 ml	8 ml
Tris base pH 8.8 1.5 M	5 ml	5 ml
SDS (Sulfato duodecil de sodio)	0.2 ml	0.4 ml
APS (Persulfato de amonio)	0.2 ml	0.4 ml
TEMED (tetrametiletildiamina)	0.008 ml	0.016 ml
Gel concentrador		
Reactivo	Para 5 ml	
Agua mili-Q	4.1 ml	
Acrilamida/bis-acrilamida mix 30%	1 ml	
Tris base pH 6.8 1 M	0.75 ml	
SDS (Sulfato duodecil de sodio)	0.06 ml	
APS (Persulfato de amonio)	0.06 ml	
TEMED (tetrametiletildiamina)	0.006 ml	

Tabla 1C. Lista de reactivos para realizar geles de poliacrilamida

Anexo 1D. Buffer de corrida 1X (BC 1x): Para preparar BC 10x cada uno de los reactivos de la **tabla 1D** fueron pesados y después disueltos en 800 ml de agua destilada y posteriormente se aforó a 1000 ml. Para preparar BC 1x, 100 ml de BC 10x fueron diluidos en 800 ml de agua destilada y se agregó el volumen suficiente para 1000 ml.

Buffer de corrida 10x (BC 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris base	30 g
Glicina	144g
SDS*	10g

Tabla 1D. Reactivos necesarios para preparar un litro de BC 10x

Anexo 1E. Buffer de transferencia 1x (BT 1x): Para preparar BT 10x cada uno de los reactivos de la **tabla 1E** fueron pesados y disueltos en 800 ml de agua destilada y posteriormente se aforó a 1000 ml. Para preparar BT 1x, 100 ml de BT 10x fueron disueltos en 800 ml de agua destilada y se aforó 1000 ml.

Buffer de transferencia 10x (BT 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris-base	30.2 g
Glicina	144.2 g

Tabla 1E. Reactivos necesarios para preparar un litro de BT 10x

Anexo 1F. Buffer-tris salino al 0.1% Tween20 (TBST 1x): Para preparar TBST 1x, primero se preparó TBS 10x con los reactivos que se indican en la **tabla 1F**; posteriormente, 100 ml de TBS 10x fueron diluidos en 800 ml de agua destilada y luego se aforó a 1000 ml, al final se agregó 1 ml de Tween 20.

Buffer-tris salino 10x (TBS 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris-HCl	24.23 g
NaCl	80.06 g

Tabla 1F. Reactivos necesarios para preparar un litro de TBS 10x, todos los reactivos fueron disueltos en agua destilada.

Anexo 1G. Buffer de fosfatos salino (PBS 1x): Para preparar PBS 1x primero se preparó PBS 10x conforme a lo especificado en la **tabla 1G**; posteriormente, 100 ml de PBS 10x fueron disueltos en 800 ml de agua destilada y luego se aforó a 1000 ml.

Buffer-fosfato salino 10x (PBS 10x)	
Reactivo	Para 1L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

Tabla 1G. Reactivos necesarios para preparar un litro de PBS 10x, todos los reactivos fueron disueltos en agua destilada.

Anexo 2. Protocolo de cuantificación de proteínas ABC

Primero se realizó la curva estándar de referencia, la cual se obtuvo mediante nueve diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (ASB) con una concentración inicial de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (**tabla 1A**). Posteriormente se mezclaron todos los elementos especificados en la **tabla 2A** en tubos eppendorf de 0.6 ml, con lo cual se obtuvo un volumen final de 50 μl ; después se agregaron 200 μl de una disolución 50:1 de ácido bicinónico con sulfato de cobre. Ésta mezcla se dejó incubar durante 30 minutos a 37°C. Después se colocaron 110 μl de cada mezcla en los pozos de una microplaca de fondo plano por duplicado. Por último se obtuvieron las absorbancias con los reactivos necesarios (**tabla 2B**) a 562 nm en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch* de *BioTek*.

Preparación de las soluciones estándar a partir de albúmina [2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$]			
Dilución	Volumen de agua (μl)	Volumen de disolución (stock BSA 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Concentración final [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
A	0	300 del stock	2
B	125	375 del stock	1.5
C	325	325 del stock	1
D	175	175 de la dilución B	0.75
E	325	325 de la dilución C	0.5
F	325	325 de la dilución E	0.25
G	325	325 de la dilución F	0.125
H	400	100 de la dilución G	0.025
I	400	0	0 (blanco)

Tabla 2A. Diluciones seriadas para preparar la curva estándar. Se muestran las diluciones que se realizaron para obtener la curva de referencia. Se utilizó agua destilada.

Para preparar curva estándar	
Reactivos	Volumen (μl)
Agua	30
Buffer de lisis	10
Solución estándar	10
Total	50

Para preparar muestras	
Reactivos	Volumen (μl)
Agua	40
Muestra	10
Total	50

Tabla 2B. Reactivos necesarios para obtener absorbancias. Para poder leer en el espectrofotómetro y obtener las absorbancias tanto de la curva estándar como de las muestra de proteína extraída del hígado de los animales tratados se mezclaron estos reactivos.

Anexo 3A. Cuantificación de proteínas de la cinética de seis semanas

Grupos	Abs1	Abs2	Abs	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Factor dil 1:30	μg en alícuota de 40 μl	Para 30 μg tomar μl :
C1	0.14	0.13	0.14	0.75	22.60	904.09	1.7
C2	0.15	0.15	0.15	0.83	25.01	1000.39	1.5
C3	0.20	0.22	0.21	1.10	33.11	1324.32	1.1
C4	0.18	0.17	0.18	0.96	28.73	1149.22	1.3
C5	0.25	0.24	0.24	1.28	38.43	1537.35	1.0
D-2.5-1	0.11	0.10	0.10	0.61	18.15	726.07	2.1
D-2.5-2	0.11	0.12	0.12	0.68	20.27	810.70	1.9
D-2.5-3	0.20	0.22	0.21	1.11	33.33	1333.07	1.1
D-2.5-4	0.15	0.14	0.14	0.79	23.77	950.78	1.6
D-2.5-5	0.20	0.19	0.19	1.03	30.85	1233.85	1.2
D-5-1	0.11	0.11	0.11	0.65	19.39	775.68	1.9
D-5-2	0.15	0.15	0.15	0.83	25.01	1000.39	1.5
D-5-3	0.12	0.14	0.13	0.72	21.51	860.31	1.7
D-5-4	0.17	0.15	0.16	0.87	26.18	1047.08	1.4
D-5-5	0.20	0.19	0.20	1.06	31.72	1268.87	1.2
D-20-1	0.10	0.10	0.10	0.60	17.86	714.40	2.1
D-20-2	0.15	0.16	0.16	0.86	25.67	1026.65	1.5
D-20-3	0.17	0.17	0.17	0.94	28.07	1122.96	1.3
D-20-4	0.15	0.16	0.16	0.85	25.59	1023.74	1.5
D-20-5	0.20	0.20	0.20	1.06	31.87	1274.71	1.2

Anexo 3B. Cuantificación de proteínas de la cinética de diez semanas

Grupos	Abs1	Abs2	Abs Prom	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Factor de dil. 1:15	μg en alícuota de 100 μl	Para 30 μg tomar μl :
C1	0.19	0.18	0.18	1.05	15.82	1581.67	2.4
C2	0.23	0.21	0.22	1.27	18.98	1897.83	2.0
C3	0.14	0.13	0.14	0.78	11.73	1173.30	3.2
C4	0.19	0.19	0.19	1.08	16.21	1621.19	2.3
C5	0.18	0.18	0.18	1.03	15.38	1537.76	2.4
D2.5-1	0.19	0.19	0.19	1.09	16.39	1638.76	2.3
D2.5-2	0.21	0.20	0.21	1.19	17.84	1783.67	2.1
D2.5-3	0.21	0.22	0.21	1.22	18.28	1827.58	2.1
D2.5-4	0.20	0.20	0.20	1.15	17.27	1726.58	2.2
D2.5-5	0.21	0.21	0.21	1.22	18.32	1831.97	2.0
D5-1	0.22	0.21	0.22	1.26	18.85	1884.66	2.0
D5-2	0.26	0.26	0.26	1.51	22.67	2266.69	1.7
D5-3	0.24	0.25	0.25	1.43	21.44	2143.74	1.7
D5-4	0.31	0.30	0.31	1.79	26.79	2679.45	1.4
D5-5	0.23	0.23	0.23	1.33	19.90	1990.05	1.9
D20-1	0.16	0.18	0.17	0.98	14.76	1476.29	2.5
D20-2	0.17	0.20	0.19	1.07	15.99	1599.24	2.3
D20-3	0.18	0.17	0.18	1.01	15.11	1511.42	2.5
D20-4	0.22	0.23	0.23	1.31	19.72	1972.48	1.9
D20-5	0.19	0.19	0.19	1.11	16.69	1669.50	2.2

Anexo 3C. Cuantificación de proteínas de la cinética de catorce semanas

Grupos	Abs1	Abs2	Abs Prom	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Factor de dil. 1:15	μg en alícuota de 40 μl	Para 30 μg tomar μl :
C1	0.18	0.18	0.18	0.87	13.11	524.23	2.9
C2	0.12	0.11	0.11	0.56	8.44	337.74	4.4
C3	0.18	0.18	0.18	0.90	13.55	541.85	2.8
C4	0.27	0.24	0.26	1.26	18.83	753.30	2.0
C5	0.21	0.21	0.21	1.04	15.64	625.55	2.4
D2.5-1	0.17	0.14	0.15	0.75	11.31	452.28	3.3
D2.5-2	0.17	0.16	0.17	0.83	12.41	496.33	3.0
D2.5-3	0.19	0.17	0.18	0.88	13.22	528.63	2.8
D2.5-4	0.21	0.20	0.20	1.00	14.94	597.65	2.5
D2.5-5	0.17	0.16	0.17	0.81	12.19	487.52	3.1
D5-1	0.20	0.20	0.20	0.99	14.83	593.25	2.5
D5-2	0.22	0.22	0.22	1.10	16.45	657.86	2.3
D5-3	0.20	0.20	0.20	0.97	14.50	580.03	2.6
D5-4	0.20	0.19	0.20	0.97	14.54	581.50	2.6
D5-5	0.18	0.19	0.18	0.90	13.44	537.44	2.8
D20-1	0.07	0.09	0.08	0.41	6.09	243.76	6.2
D20-2	0.13	0.14	0.14	0.68	10.17	406.75	3.7
D20-3	0.13	0.12	0.13	0.63	9.40	375.92	4.0
D20-4	0.13	0.13	0.13	0.65	9.73	389.13	3.9

Anexo 3D. Cuantificación de proteínas de la cinética de dieciocho semanas

Grupos	Abs1	Abs2	Abs Prom	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Factor de dil. 1:15	μg en alícuota de 40 μl	Para 30 μg tomar μl :
C1	0.22	0.21	0.21	0.99	14.91	596.53	2.5
C2	0.22	0.22	0.22	1.03	15.38	615.34	2.4
C3	0.19	0.19	0.19	0.88	13.21	528.51	2.8
C4	0.22	0.22	0.22	1.01	15.20	608.10	2.5
C5	0.14	0.16	0.15	0.67	9.99	399.71	3.8
D2.5-1	0.14	0.15	0.15	0.68	10.14	405.50	3.7
D2.5-2	0.19	0.19	0.19	0.89	13.36	534.30	2.8
D2.5-3	0.23	0.21	0.22	1.02	15.35	613.89	2.4
D2.5-4	0.26	0.24	0.25	1.19	17.84	713.75	2.1
D2.5-5	0.24	0.23	0.23	1.09	16.29	651.52	2.3
D5-1	0.22	0.21	0.22	1.00	15.02	600.87	2.5
D5-2	0.23	0.22	0.23	1.05	15.71	628.36	2.4
D5-3	0.20	0.22	0.21	0.98	14.73	589.29	2.5
D5-4	0.21	0.21	0.21	0.97	14.52	580.61	2.6
D5-5	0.22	0.22	0.22	1.03	15.42	616.79	2.4
D20-1	0.15	0.16	0.16	0.71	10.64	425.76	3.5
D20-2	0.16	0.15	0.16	0.72	10.75	430.10	3.5
D20-3	0.14	0.16	0.15	0.68	10.25	409.84	3.7
D20-4	0.17	0.16	0.16	0.76	11.33	453.26	3.3
D20-5	0.15	0.15	0.15	0.69	10.28	411.29	3.6

Anexo 3E. Cuantificación de la cinética de seis semanas para la medición de EROs y 4-HNE

Grupos	Abs promedio	EROs				4-HNE		
		[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl para 500 μg	Para llevar a 100 μl de PBS1x	[Final] [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	μl para 400 μg	Para llevar a 100 μl de PBS1x/0.2%ASB	[Final] [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
C1	0.21	15.59	32.08	67.92	5	51.32	48.68	4
C2	0.19	13.66	36.60	63.40	5	58.57	41.43	4
C3	0.37	27.23	18.36	81.64	5	29.37	70.63	4
C4	0.27	19.60	25.51	74.49	5	40.82	59.18	4
C5	0.22	16.32	30.64	69.36	5	49.02	50.98	4
D2.5-1	0.24	17.75	28.17	71.83	5	45.08	54.92	4
D2.5-2	0.17	11.81	42.34	57.66	5	67.75	32.25	4
D2.5-3	0.16	11.69	42.76	57.24	5	68.42	31.58	4
D2.5-4	0.16	11.46	43.62	56.38	5	69.80	30.20	4
D2.5-5	0.25	18.17	27.51	72.49	5	44.02	55.98	4
D5-1	0.16	11.46	43.62	56.38	5	69.80	30.20	4
D5-2	0.20	14.59	34.28	65.72	5	54.85	45.15	4
D5-3	0.20	14.12	35.40	64.60	5	56.65	43.35	4
D5-4	0.14	10.00	50.02	49.98	5	80.03	19.97	4
D5-5	0.14	10.07	49.64	50.36	5	79.42	20.58	4
D20-1	0.18	13.16	38.00	62.00	5	60.80	39.20	4
D20-2	0.19	11.88	42.10	57.90	5	67.36	32.64	4
D20-3	0.17	11.96	41.80	58.20	5	66.87	33.13	4
D20-4	0.17	12.00	41.66	58.34	5	66.66	33.34	4
D20-5	0.18	12.70	39.38	60.62	5	63.01	36.99	4

Anexo 3F. Cuantificación de la cinética de diez semanas para la medición de EROs y 4-HNE

Grupos	Abs promedio	EROs				4-HNE		
		[µg/µl]	µl para 500 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x	[Final] [µg/µl]	µl para 400 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x/0.2%ASB	[Final] [µg/µl]
C1	0.19	11.61	43.05	56.95	5	68.88	31.12	4
C2	0.28	17.73	28.19	71.81	5	45.11	54.89	4
C3	0.23	14.69	34.04	65.96	5	54.46	45.54	4
C4	0.22	13.77	36.30	63.70	5	58.08	41.92	4
C5	0.22	14.13	35.38	64.62	5	56.60	43.40	4
D2.5-1	0.23	14.72	33.96	66.04	5	54.34	45.66	4
D2.5-2	0.22	13.74	36.39	63.61	5	58.22	41.78	4
D2.5-3	0.20	12.79	39.09	60.91	5	62.54	37.46	4
D2.5-4	0.18	11.02	45.35	54.65	5	72.57	27.43	4
D2.5-5	0.21	12.86	38.89	61.11	5	62.22	37.78	4
D5-1	0.16	9.98	50.11	49.89	5	80.18	19.82	4
D5-2	0.21	12.89	38.79	61.21	5	62.06	37.94	4
D5-3	0.23	14.59	34.26	65.74	5	54.82	45.18	4
D5-4	0.22	13.81	36.21	63.79	5	57.94	42.06	4
D5-5	0.25	15.67	31.90	68.10	5	51.04	48.96	4
D20-1	0.18	10.89	45.90	54.10	5	73.44	26.56	4
D20-2	0.18	11.02	45.35	54.65	5	72.57	27.43	4
D20-3	0.27	17.18	29.11	70.89	5	46.57	53.43	4
D20-4	0.18	11.35	44.05	55.95	5	70.47	29.53	4
D20-5	0.17	10.34	48.37	51.63	5	77.39	22.61	4

Anexo 3G. Cuantificación de la cinética de catorce semanas para la medición de EROs y 4-HNE

Grupos	Abs promedio	EROs				4-HNE		
		[µg/µl]	µl para 500 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x	[Final] [µg/µl]	µl para 400 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x/0.2%ASB	[Final] [µg/µl]
C1	0.27	13.74	36.38	63.62	5	58.21	41.79	4
C2	0.33	17.98	27.81	72.19	5	44.49	55.51	4
C3	0.34	18.94	26.40	73.60	5	42.24	57.76	4
C4	0.34	18.50	27.03	72.97	5	43.25	56.75	4
C5	0.31	16.06	31.12	68.88	5	49.80	50.20	4
D2.5-1	0.29	14.81	33.76	66.24	5	54.01	45.99	4
D2.5-2	0.34	18.28	27.36	72.64	5	43.77	56.23	4
D2.5-3	0.34	18.90	26.45	73.55	5	42.32	57.68	4
D2.5-4	0.30	15.92	31.41	68.59	5	50.26	49.74	4
D2.5-5	0.36	19.93	25.08	74.92	5	40.13	59.87	4
D5-1	0.30	15.36	32.54	67.46	5	52.07	47.93	4
D5-2	0.33	17.94	27.86	72.14	5	44.58	55.42	4
D5-3	0.36	20.15	24.81	75.19	5	39.69	60.31	4
D5-4	0.34	18.64	26.82	73.18	5	42.91	57.09	4
D5-5	0.32	17.43	28.69	71.31	5	45.90	54.10	4
D20-1	0.23	10.72	46.63	53.37	5	74.61	25.39	4
D20-2	0.23	10.17	49.17	50.83	5	78.67	21.33	4
D20-3	0.27	13.41	37.28	62.72	5	59.65	40.35	4
D20-4	0.23	10.46	47.78	52.22	5	76.45	23.55	4

Anexo 3G. Cuantificación de la cinética de dieciocho semanas para la medición de EROs y 4-HNE

Grupos	Abs promedio	EROs				4-HNE		
		[µg/µl]	µl para 500 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x	[Final] [µg/µl]	µl para 400 µg	Para llevar a 100 µl de PBS1x/0.2%ASB	[Final] [µg/µl]
C1	0.25	16.58	30.16	69.84	5	48.25	51.75	4
C2	0.26	17.13	29.19	70.81	5	46.71	53.29	4
C3	0.28	18.46	27.09	72.91	5	43.34	56.66	4
C4	0.29	19.62	25.49	74.51	5	40.78	59.22	4
C5	0.26	17.33	28.85	71.15	5	46.16	53.84	4
D2.5-1	0.25	16.61	30.09	69.91	5	48.15	51.85	4
D2.5-2	0.27	18.15	27.55	72.45	5	44.08	55.92	4
D2.5-3	0.26	17.67	28.29	71.71	5	45.27	54.73	4
D2.5-4	0.25	16.92	29.55	70.45	5	47.28	52.72	4
D2.5-5	0.31	20.74	24.10	75.90	5	38.57	61.43	4
D5-1	0.23	15.28	32.72	67.28	5	52.34	47.66	4
D5-2	0.24	15.86	31.52	68.48	5	50.43	49.57	4
D5-3	0.24	15.76	31.72	68.28	5	50.76	49.24	4
D5-4	0.26	17.54	28.51	71.49	5	45.62	54.38	4
D5-5	0.26	17.71	28.24	71.76	5	45.18	54.82	4
D20-1	0.16	10.71	46.69	53.31	5	74.70	25.30	4
D20-2	0.17	11.56	43.24	56.76	5	69.19	30.81	4
D20-3	0.16	10.85	46.10	53.90	5	73.76	26.24	4
D20-4	0.12	8.05	62.13	37.87	5	99.41	0.59	4
D20-5	0.12	8.01	62.39	37.61	5	99.83	0.17	4