



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE CÉLULAS PRETUMORALES  
OBTENIDAS DE LA HEPATOCARCINOGENÉISIS QUÍMICA EN LA RATA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA PAULETTE CASTRO GIL**

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. JULIO ISRAEL PÉREZ CARREÓN  
FACULTAD DE MEDICINA

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. , ENERO 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El trabajo realizado en esta tesis contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) apoyos: CB- 182450, 85552; y el financiamiento del Instituto Nacional de Medicina Genómica: #403.

“La vida busca el crecimiento, no la compensación de la nada.”

A mi Padre, que me ha dado todo y más.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<i>Hígado .....</i>	<i>10</i>
<i>Lobulillo Hepático: Unidad funcional.....</i>	<i>11</i>
<i>Células parenquimales.....</i>	<i>13</i>
Hepatocitos .....	13
Colangiocitos.....	14
<i>Células estromales.....</i>	<i>14</i>
Células endoteliales del sinusoides hepático .....	14
Células estelares o células estrelladas hepáticas.....	15
Células progenitoras hepáticas (CPH) o células ovasles.....	15
<i>Regeneración hepática .....</i>	<i>16</i>
<i>Cáncer.....</i>	<i>17</i>
<i>Datos epidemiológicos recientes del cáncer .....</i>	<i>19</i>
<i>Cáncer de hígado: Carcinoma hepatocelular.....</i>	<i>19</i>
<i>Factores de riesgo para el desarrollo del CHC .....</i>	<i>20</i>
<i>Desarrollo del CHC.....</i>	<i>20</i>
<i>Diagnóstico y tratamiento del CHC.....</i>	<i>22</i>
<i>Biomarcadores para el estudio y diagnóstico del CHC.....</i>	<i>24</i>
Gamma-glutamyl transferasa (GGT).....	25
Citoqueratina 19 (KRT19) .....	26
<i>Secuenciación del transcriptoma como herramienta para el estudio del CHC .....</i>	<i>26</i>
<i>Modelos experimentales como herramientas para el estudio del CHC .....</i>	<i>28</i>
Modelo de Cirrosis y Cáncer o Modelo de Schiffer .....	30
<i>Justificación .....</i>	<i>30</i>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<i>Objetivo General.....</i>	<i>31</i>
<i>Objetivos Particulares.....</i>	<i>31</i>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<i>Animales de laboratorio .....</i>	<i>32</i>
Modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.....	32
Modelo de inducción de células progenitoras hepáticas .....	33
Banco de tejidos hepáticos .....	33
<i>Métodos Histológicos .....</i>	<i>34</i>
Análisis Histopatológicos.....	34
Histoquímica para GGT .....	34

Doble tinción; histoquímica para GGT y tinción de colágenas tipo I y III (Tinción de Herovici).....	35
Análisis de Inmunofluorescencia .....	35
Detección de nódulos GGT/KRT19-positivos .....	35
Histoquímica de GGT con protección de ARN para obtener nódulos KRT19 y GGT positivos mediante microdissección láser.....	36
<i>Microdissección Láser .....</i>	<i>36</i>
<i>Extracción del ARN total del tejido obtenido mediante Microdissección Láser.....</i>	<i>37</i>
<i>Análisis de integridad del ARN obtenido después de la microdissección láser.....</i>	<i>37</i>
<i>Construcción de bibliotecas de cDNA y secuenciación de ARN.....</i>	<i>39</i>
<i>Análisis de datos de secuenciación de ARN .....</i>	<i>39</i>
<i>Analisis por RT-qPCR.....</i>	<i>39</i>
<i>Análisis de vías metabólicas enriquecidas mediante Ingenuity Pathway Analysis .....</i>	<i>40</i>
<i>Análisis de co-expresión o expresión mutuamente excluyente.....</i>	<i>40</i>
<i>Extracción de ARN de tejido total para análisis de expresión de microRNAs .....</i>	<i>41</i>
<i>Análisis de datos de microarreglos de expresión de microRNAs.....</i>	<i>41</i>
<i>Búsqueda de genes blanco de microRNAs diferencialmente expresados.....</i>	<i>42</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<i>La fibrosis y el CHC multinodular incrementan significativamente a las 18 semanas de tratamiento del modelo de cirrosis y cáncer.....</i>	<i>43</i>
<i>La expresión de marcadores progenitores aumenta a lo largo del desarrollo del CHC .....</i>	<i>46</i>
<i>La proporción de nódulos GGT/KRT19 positivos persiste desde la etapa displásica hasta la etapa neoplásica en el modelo de cirrosis y cáncer .....</i>	<i>47</i>
<i>Nódulos 12 W y 18 W GGT/KRT19-positivos comparten un alto porcentaje de genes diferencialmente expresados.....</i>	<i>49</i>
<i>Los perfiles de expresión de nódulos GGT/KRT19-positivos son comparables con CHC de origen humano</i>	<i>51</i>
<i>Comparación del impacto clinicopatológico de los genes de interés utilizando datos de transcriptoma de CHC del TCGA.....</i>	<i>54</i>
<i>Los nódulos GGT/KRT19-positivos muestran desregulación en los genes asociados a la función del RXR y en la vía NRF2 .....</i>	<i>56</i>
<i>En nódulos con un fenotipo GGT/KRT19-positivo, las vías de NRF2 y RXR<math>\alpha</math> están desreguladas .....</i>	<i>62</i>
<i>Los CHCs de origen humano con sobrerregulación de KRT19, tienden a expresar niveles bajos de SLC27A5, ACSL1, CYP2E1, y RXR<math>\alpha</math>.....</i>	<i>64</i>
<i>Regulación de la función de RXR<math>\alpha</math> mediada por microRNAs: análisis de expresión de microRNAs en el modelo de cirrosis y cáncer.....</i>	<i>67</i>
<i>La expresión diferencial de microRNAs aumenta a lo largo del modelo de cirrosis y cáncer .....</i>	<i>68</i>
<i>Acs1 y Cyp2e1 son blancos de microRNAs diferencialmente expresados en el modelo de Cirrosis y Cáncer .....</i>	<i>72</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>

RELEVANCIA DEL ESTUDIO .....	88
PERSPECTIVAS.....	89
REFERENCIAS .....	90

## RESUMEN

Los tumores hepáticos están entre los cinco tipos de tumor más letales a nivel mundial y la mayoría de estos tumores corresponden al tipo carcinoma hepatocelular (CHC). Los CHCs que expresan marcadores biliares y progenitores, como la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) y la citoqueratina 19 (KRT19) son tumores agresivos y con altas tasas de recurrencia. En este trabajo se caracterizó el perfil transcriptómico de nódulos displásicos y tumorales positivos a la GGT y a KRT19, mediante la inducción experimental de cirrosis y cáncer en ratas, a través de la administración semanal de dietilnitrosamina (DEN), microdissección láser (MDL), secuenciación del transcriptoma (RNA-Seq) y análisis de microarreglos para microRNAs. Los genes diferencialmente expresados tanto en nódulos displásicos como tumorales fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento funcional de vías metabólicas desreguladas. La activación de células estelares hepáticas (CEH), la función de RXR $\alpha$ , el metabolismo de ácidos grasos, y la vía de NRF2 mostraron niveles de desregulación en los nódulos GGT/KRT19 positivos. Genes implicados en la función del RXR $\alpha$  y en el metabolismo de ácidos grasos, específicamente *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1*, estuvieron subregulados en nódulos GGT/KRT19-positivos. Un análisis de co-expresión llevado a cabo con datos de CHC de origen humano, confirmó la subregulación de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1* y *RXR $\alpha$*  en tumores con sobreexpresión de *KRT19*. Ya que una de las funciones de RXR $\alpha$  es regular la activación de NRF2, la sobreexpresión de genes blanco de este factor de transcripción fue evaluada y validada, confirmando la activación de la vía en los nódulos GGT/KRT19-positivos. El análisis de microarreglos para microRNAs mostró que rno-miR-132-3p, rno-mir-212-3p, y rno-miR-34a-5p son microRNAs que están sobreexpresados desde etapas muy tempranas, en el modelo de hepatocarcinogénesis experimental, así como en un modelo de inducción de células progenitoras, los primeros dos microRNAs tienen como gen blanco *Cyp2e1*, mientras que el tercero regula negativamente la expresión de *Acs11*, lo cual ha sido señalado como mecanismo de activación de CEH. Nuestros resultados contribuyen con la caracterización molecular del CHC GGT/KRT19-positivo y señalan a la

desregulación de la función del RXR $\alpha$  como un evento temprano en la formación de tumores con este fenotipo.

## ABSTRACT

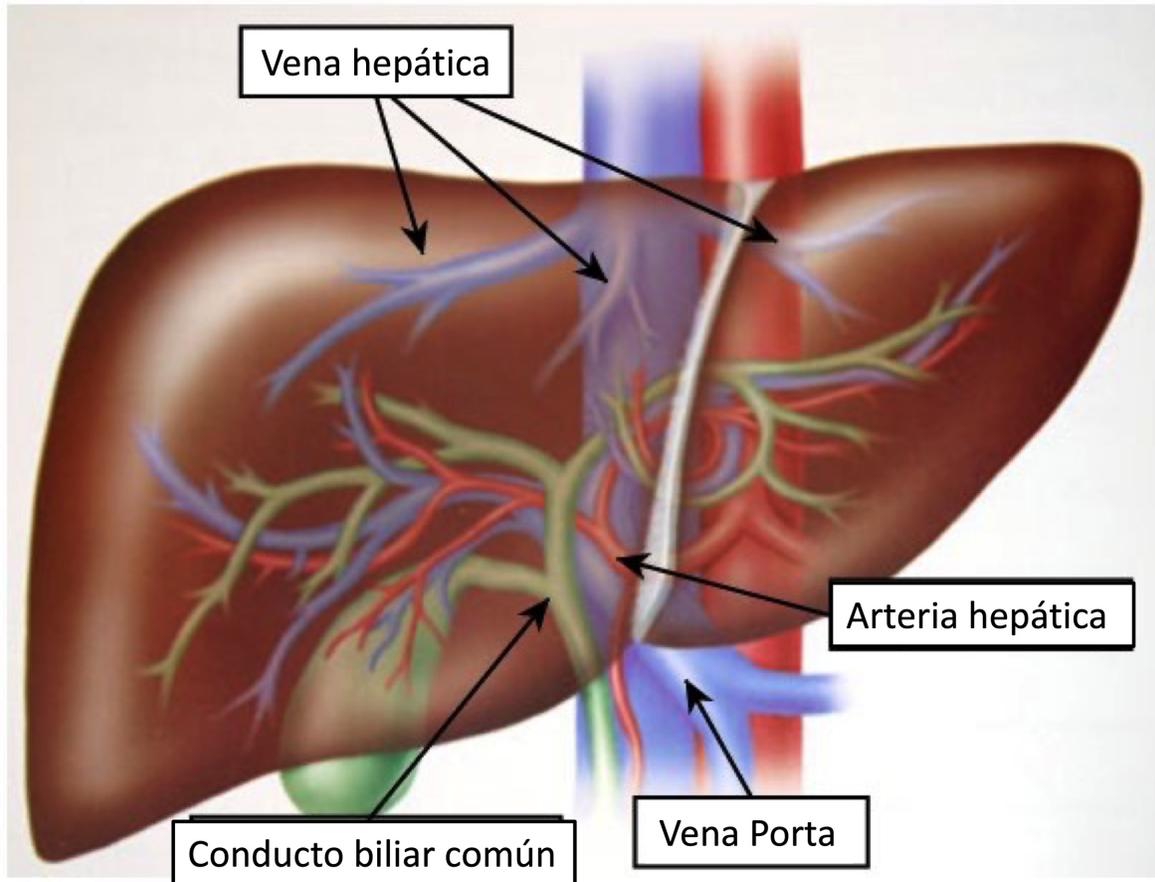
Liver tumors are among the five most lethal tumor types worldwide. Most of these tumors correspond to the hepatocellular carcinoma (HCC) type. HCCs that express bile/progenitor markers, such as gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and cytokeratin 19 (KRT19) are aggressive tumors with high recurrence rates. In this work, we performed a transcriptomic analysis of GGT/KRT19-positive experimental nodules from a rat hepatocarcinogenesis model. Thus, the specific gene expression profile of dysplastic lesions and tumors was obtained through laser microdissection (MDL), transcriptome sequencing (RNA-Seq) and, microarray analysis for microRNAs. Differentially expressed genes from dysplastic and tumor nodules were subjected to functional enrichment analysis of dysregulated metabolic pathways. Genes from hepatic stellate cell (HSC) activation, RXR $\alpha$  function, fatty acid metabolism, and the NRF2 pathway showed dysregulation in GGT / KRT19- positive nodules. Genes involved in RXR $\alpha$  function and fatty acid metabolism, specifically *Slc27a5*, *Acs11* and *Cyp2e1*, were down-regulated in GGT/KRT19-positive nodules. A co-expression analysis using transcriptomic HCC data of human origin from TCGA confirmed a mutually exclusive gene expression where the downregulation of *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1* and *RXR $\alpha$*  in tumors is associated with *KRT19* up-regulation. Since RXR $\alpha$  regulates NRF2 activity, we evaluated the overexpression of target genes of this transcription factor such as *Gstp1*, *Ptgr1*, *Abcc3*, and *Txnrd1*, confirming the activation of the NRF2 pathway in the GGT/KRT19-positive nodules. Microarray analysis from microRNAs showed that the rno-miR-132-3p, rno-mir-212-3p, and rno-miR-34a-5p were upregulated in livers from very early stages in the experimental hepatocarcinogenesis model as well as in a model of progenitor cell induction, the first two microRNAs have *Cyp2e1*. At the same time, the rno-miR-34a-5p negatively regulates the expression of *Acs11*, a gene that has been involved in HSC activation. Our results contribute to the molecular characterization of GGT/KRT19-positive HCC and point to the dysregulation of RXR $\alpha$  function as an early event in the formation of tumors with this phenotype.

## INTRODUCCIÓN

### Hígado

El hígado es un órgano que se encuentra sólo en vertebrados (1), y se encarga de un enramado de funciones que ayudan a mantener el metabolismo de macronutrientes, la inmunidad, digestión, detoxificación, almacenamiento de vitaminas, homeostasis de lípidos y colesterol, regulación y almacenamiento de glucógeno, hemólisis y producción de hormonas, entre otras funciones. En los seres humanos, el hígado se encuentra en el cuadrante superior derecho del abdomen, por debajo del diafragma y encima del estómago, está protegido por las costillas y mantiene su posición mediante uniones ligamentosas. Estas uniones no se consideran ligamentos reales y no cuentan con vascularización, sin embargo, están unidas al peritoneo del hígado. En promedio el hígado representa el 2 % del cuerpo humano, lo que lo convierte en el órgano interno de mayor tamaño (2). Visto de manera frontal, el hígado está dividido por el ligamento falciforme en dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo (**Figura 1**), y visto por debajo de la cara visceral se observan otros dos lóbulos más pequeños; el lóbulo cuadrado y el lóbulo caudado o lóbulo de Spiegel, (3).

El sistema vascular del hígado está constituido principalmente por la vena porta y la arteria hepática. La vena porta suministra cerca de  $\frac{2}{3}$  partes del flujo sanguíneo, rico en nutrientes, proveniente del tracto gastrointestinal y aporta el 40 % de oxígeno, mientras que la arteria hepática aporta un  $\frac{1}{3}$  del flujo sanguíneo, sin embargo, el flujo proveniente de la arteria hepática aporta el 60 % de oxígeno al órgano (4). Estas dos estructuras sanguíneas dentro del hígado se dividen en pequeños capilares, que desembocan en la unidad funcional hepática, el lobulillo hepático (**Figura 1**).

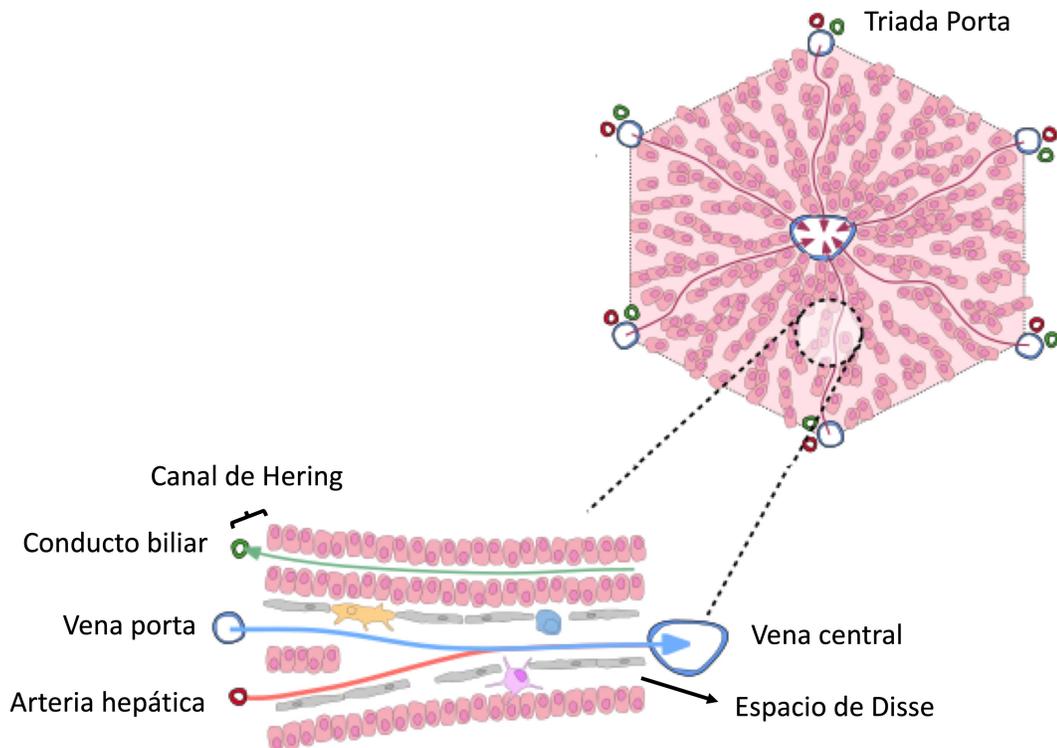


**Figura 1. Vista frontal del hígado y sistema vascular.** El hígado se divide físicamente por el ligamento falciforme. La vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar común se ramifican en el interior del órgano. Imagen modificada de Conference: International Conference on Image Processing, Computer Vision, and Pattern Recognition (ICIPV). Masanori Hariyama, 2014.

### Lobulillo Hepático: Unidad funcional

El lobulillo hepático es la unidad funcional del hígado. Ha sido esquematizada como un prisma hexagonal, cada vértice del prisma contiene una triada portal, la cual está constituida por una rama de la arteria hepática, la vena porta y un conducto biliar. Hacia el centro del prisma se disponen láminas de hepatocitos, dichas láminas forman la microvasculatura del hígado conocido como sinusoides hepáticos. En el centro del prisma se encuentra la vena central. Cada lobulillo hepático recibe sangre tanto de la vena porta como de la arteria hepática, y viaja a través de los sinusoides hepáticos. La sangre que proviene de la vena porta es limpiada por los hepatocitos y la sangre proveniente de la arteria hepática suministra oxígeno a los hepatocitos

adyacentes. El flujo sanguíneo sigue su curso hasta que desemboca en la vena central de cada lobulillo hepático (**Figura 2**). Las venas centrales de los lobulillos hepáticos se fusionan en venas hepáticas que salen del hígado y drenan hacia la vena cava inferior (5). El lobulillo hepático está compuesto tanto por células parenquimales como por células estromales.



**Figura 2. Esquema del lobulillo y del senoide hepático:** En cada vértice del lobulillo hepático (arriba, derecha), se aprecia la triada portal y en el centro del lobulillo la vena central. Las flechas que salen de la vena porta hacia la vena central indican el sentido del flujo sanguíneo. El senoide hepático (abajo), está formado por placas de hepatocitos que forman conductos en contacto con la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. La sangre proveniente de la arteria hepática converge con la vena porta y desembocan en la vena central dentro del lobulillo, mientras que la bilis producida por los hepatocitos fluye por el canalículo biliar (indicado por la flecha verde). El espacio entre el conducto biliar, formado por colangiocitos, y el canalículo biliar de los hepatocitos (células rosas cuboides) se llama “Canal de Hering”. Las placas de hepatocitos están limitadas por células endoteliales del senoide (células grises) el espacio entre las células endoteliales y los hepatocitos se llama “Espacio de Disse” y es donde residen las células estelares hepáticas (célula fucsia). Otras células del senoide son los macrófagos Kupffer (célula naranja) y los linfocitos hepáticos o células Pit (Azul). Imagen modificada de [https://www.wikiwand.com/en/Liver#/google\\_vignette](https://www.wikiwand.com/en/Liver#/google_vignette).

## Células parenquimales

Existen dos principales tipos de poblaciones celulares que constituyen el parénquima hepático; hepatocitos y colangiocitos.

### Hepatocitos

Los hepatocitos son el compartimento celular más prominente en el parénquima hepático, constituyendo el 80 % del tejido (6). El hepatocito es una célula poliédrica con múltiples caras, su diámetro oscila entre 25 – 30  $\mu\text{m}$  de largo y 20 – 25  $\mu\text{m}$  de ancho y en algunos organismos como los mamíferos, es común observar hepatocitos binucleados o poliploides (7). Existen algunas diferencias en la función de los hepatocitos de acuerdo a la ubicación que tienen dentro del lobulillo hepático, por ejemplo, la concentración de oxígeno es mayor en la zona periportal y va disminuyendo hacia el centro del lobulillo hepático, (8) otro ejemplo es el metabolismo de lípidos, en la zona cercana a la vena central, la actividad lipogénica es mayor y disminuye hacia la zona periportal, mientras que la oxidación de ácidos grasos tiene mayor actividad en los hepatocitos cercanos a la triada portal y disminuye en los hepatocitos cercanos a la vena central. Esta zonificación metabólica permite que los hepatocitos participen en una gran cantidad de funciones celulares (9), sin embargo, también los convierte en la célula blanco de diversos factores dañinos para el hígado (10).

Independientemente de la variedad de funciones metabólicas que desempeñan los hepatocitos, estas células son positivas a determinados marcadores, por ejemplo, la expresión de albúmina (ALB), o la combinación de las citoqueratinas 8 y 18 (KRT8 y KRT18), también expresan niveles altos de proteínas que conforman la familia de citocromo P450 (CYP450), así como factores de transcripción de linaje hepático como el factor nuclear 1  $\alpha$  de hepatocito (HNF1A) , y el factor nuclear 4  $\alpha$  de hepatocito (HNF4A) (11).

## Colangiocitos

Los colangiocitos son las células epiteliales que recubren los conductos del árbol biliar (12). Su función, anatomía y fisiología dependen de la ubicación que ocupan en los conductos (13). En general, son células que se ocupan del flujo de bicarbonato y agua suministrados a las sales biliares que llegan a los conductos biliares, proveniente de los hepatocitos. Los colangiocitos tienen como frontera el “Canal de Hering” que es un espacio entre el conducto biliar y las hileras de hepatocitos (**Figura 2**). A pesar de que los colangiocitos son una población secundaria en el hígado (3 – 5 %), son responsables del 30 % del flujo de sales biliares en el cuerpo humano, el otro 70 % se produce en los canalículos hepáticos (14). A pesar de su baja proporción en el hígado, los colangiocitos tienen papeles centrales en la regeneración hepática, principalmente cuando esta última es producto del daño crónico (15). Los colangiocitos también expresan una combinación citoqueratinas, pero a diferencia de los hepatocitos, los colangiocitos expresan las citoqueratinas 7 y 19 (KRT7 y KRT19, respectivamente), así como la gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) (16,17).

## Células estromales

Otras células que forman parte del lobulillo y que no tienen funciones epiteliales son las células estromales, existen tres poblaciones principales de este compartimento celular; células endoteliales del sinusoides hepático (CESH), células estelares o células estrelladas hepáticas (CEH) y las células progenitoras hepáticas (CPH) o células ovals (CO).

## Células endoteliales del sinusoides hepático

Las CESH recubren los sinusoides hepáticos. Son células altamente especializadas cuya principal característica es que contienen múltiples poros o ventanas con diámetros de 100 a 150 nm. Estos poros ocupan del 9 al 8 % de la superficie celular

y están dispuestas en placas que reciben el nombre de “Placas de Sieve” (18), estos poros tienen un anillo de actina, miosina y proteínas de unión a actina (7). Los poros de las CESH juegan un papel crucial en el transporte de lipoproteínas del sinusoides hepático a través del espacio de Disse hasta los hepatocitos (19), así como en la protección hacia los hepatocitos de cualquier molécula dañina (7). En condiciones normales, las CESH carecen de una lámina basal, sin embargo en condiciones de daño crónico, se ha observado la formación de lámina basal en el espacio que residen estas células (20).

#### [Células estelares o células estrelladas hepáticas](#)

Las CEH, reciben otros nombres como células perisinusoidales o células de Ito. Son células que se encuentran en el espacio de Disse, limitado por las CESH y los hepatocitos. En su citoplasma contienen gotas de vitamina A de un diámetro aproximado de 8  $\mu\text{m}$  (7), lo que las convierte en el mayor reservorio de vitamina A en el cuerpo humano (21). Las CEH juegan un papel principal en la fibrogénesis hepática; en condiciones fisiológicas, se encuentran en un estado quiescente, sin embargo, tras daño crónico hepático estas células pasan por un proceso de activación el cual inicia con la disminución en el tamaño de las gotas de vitamina A, posteriormente las CEH comienzan a proliferar y adoptan un fenotipo de miofibroblasto expresando marcadores como  $\alpha$ -SMA (7), una vez activas, estas células son las encargadas de depositar componentes de matriz extracelular como colágena tipo I y colágena tipo III. Los mecanismos celulares implicados en esta activación celular no están del todo claros, sin embargo, se ha observado que la reconfiguración metabólica hacia la glicólisis aeróbica contribuye a esta activación celular (22).

#### [Células progenitoras hepáticas \(CPH\) o células ovas](#)

Las células progenitoras hepáticas (CPH) o células ovas (CO), (23) son células bipotenciales que residen entre los hepatocitos y colangiocitos, en el espacio denominado “Canal de Hering” (23,24). Comparadas con sus vecinas, las CPH son

pequeñas en tamaño, con un núcleo ovalado (25). En condiciones normales, este compartimento celular, se encuentra con niveles bajos de proliferación diferenciándose en hepatocitos o colangiocitos según sea la necesidad del hígado (26), sin embargo, tras daño crónico al órgano estas células se activan y comienzan a proliferar, formando estructuras similares a los conductos biliares, esta reacción proliferativa se denomina Reacción Ductal (RD) y se ha señalado como un nicho de células progenitoras (27). Las CPH, expresan marcadores de origen biliar; KRT7, KRT19 y GGT, así como de origen progenitor; CD90 (THY90), EpCAM y OV6 (28,29).

Todas estas células mantienen un equilibrio funcional y proliferativo basal en el lobulillo hepático, sin embargo, cuando el hígado es objeto de daños crónicos, los hepatocitos, (como principal célula blanco de estos daños) mueren. La respuesta de los hepatocitos adyacentes ante el daño es muy rápida alcanzando una proliferación inmediata de hasta dos ciclos celulares, sin embargo, esta capacidad proliferativa disminuye lo que deriva en un proceso denominado regeneración hepática (30).

### Regeneración hepática

La singular capacidad regenerativa del hígado protege la dependencia vital que la mayoría de los organismos tienen de este órgano (30). La regeneración hepática es el mecanismo mediante el cual el hígado es capaz de reemplazar tejido perdido a partir del tejido remanente y conservar el 100 % de su masa original. En mamíferos este proceso es meramente compensatorio ya que solo se repone la masa y no la forma (30). La regeneración hepática es posible ante dos eventos, la hepatectomía parcial o el daño crónico hepático inducido por toxinas o infecciones virales (31). En el primer escenario los hepatocitos son capaces de reponer la masa hepática perdida en su totalidad, por ejemplo, en roedores, tras una hepatectomía parcial del 70 %, el hígado recupera el 100 % de su masa en dos semanas (32). En el segundo escenario, cuando el daño es crónico, la capacidad regenerativa de los hepatocitos

se ve comprometida y en respuesta a esto las otras poblaciones celulares se activan para compensar la pérdida de masa hepática (32). Las CEH se activan cuando los hepatocitos entran en un estado de quiescencia tras abatir su capacidad proliferativa, una vez activas, las CEH pierden las gotas de vitamina A en el citoplasma y adquieren un fenotipo de miofibroblasto, comenzando a generar tejido fibroso a través de la deposición de componentes de matriz extracelular tales como fibronectina, laminina y colágena tipo I y tipo III (33). Del mismo modo, las CPH se activan cuando la capacidad regenerativa de los hepatocitos se ve comprometida y comienzan a proliferar formando estructuras similares a los conductos biliares, este fenómeno se conoce RD y se señala como un nicho de células progenitoras (27), además, se ha descrito ampliamente que la severidad del daño hepático es directamente proporcional a la RD (34). Ciclos constantes de regeneración hepática, derivan en enfermedades crónicas hepáticas como la fibrosis y cirrosis que en la mayoría de las ocasiones son la antesala del cáncer hepático (35).

## Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja, donde algunas células del cuerpo se replican de manera descontrolada e invaden tejidos vecinos y distantes. Los factores que pueden alterar el ciclo controlado de muerte y proliferación son de diferentes etiologías:

1. Factores físicos, e.g. radiaciones ionizantes (36).
2. Factores químicos, e.g. asbestos, humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico, etc. (37,38).
3. Factores biológicos, e.g. infecciones virales (virus del papiloma humano, virus de hepatitis), bacterianas (*Helicobacter pylori*) y parasitarias (*Schistosoma haematobium*) (39–41).

El cáncer se clasifica de acuerdo al tejido y tipo celular del cual surge, si se desarrolla en células epiteliales se denomina carcinoma, los tumores que se

desarrollan en tejido conectivo se llaman sarcomas, los tumores que se originan en tejidos del sistema nervioso central se denominan neuroectodérmicos y los tumores de células sanguíneas o linfáticas se clasifican como leucemias, mielomas o linfomas (42).

Solo un 10 % de los tumores son consecuencia de la herencia, es decir, las mutaciones genéticas germinales del paciente, el 90 % de los tumores son resultado de la mutación somática adquirida a través de la constante exposición de factores de riesgo a lo largo de los años (43). Esta constante exposición obliga a las células del tejido a pasar por una transformación neoplásica de “célula normal” a “célula tumoral” lo que implica la adquisición de características celulares como:

1. Proliferación sostenida
2. Evasión de los supresores de crecimiento
3. Mecanismos de invasión y metástasis activos
4. Replicación celular ilimitada
5. Inducción de angiogénesis
6. Resistencia a las vías de muerte celular
7. Desregulación en el metabolismo: adaptabilidad metabólica
8. Habilidad para evadir al sistema inmune
9. Inflamación y promoción tumoral
10. Inestabilidad genómica

Estas capacidades características del cáncer constituyen un ambiente celular complejo de la neoplasia y conllevan a cambios fenotípicos, como la transición epitelio-mesénquima (TEM), adquisición o expresión de características progenitoras, reprogramación metabólica, la adquisición de un fenotipo híbrido (e.g. células con fenotipo mesénquima/epitelio). Estas características, no sólo distinguen a las células tumorales, sino que también les brindan ventajas como la capacidad de diseminación y la resistencia a quimioterapias, una vez tratadas (44,45).

## Datos epidemiológicos recientes del cáncer

Según la base de datos de GLOBOCAN, en el año 2020, se estimaron 19.3 millones de casos nuevos de cáncer y 10 millones de defunciones asociadas a tumores. Los tumores más incidentes a nivel mundial son: mama, pulmón, colon, próstata, estómago, hígado, cérvix, esófago, tiroides y vejiga (46). Sin embargo, cuando se pondera en función de la mortalidad y la letalidad este orden cambia (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Principales 10 tumores en incidencia, mortalidad y letalidad en el año 2020

Tumor (incidencia)	Casos en 2020	Tumor (mortalidad)	Casos en 2020	Tumor (Letalidad)	Letalidad %
Mama	2 261 419	Pulmón	1 796 144	Páncreas	93.99
Pulmón	2 206 771	Colon	935 173	Hígado	91.66
Colon	1 931 590	Hígado	830 180	Esófago	90.06
Próstata	1 414 259	Estómago	768 793	Pulmón	81.39
Estómago	1 089 103	Mama	684 996	Estómago	70.58
Hígado	905 677	Esófago	544 076	Leucemia	65.66
Cérvix	604 127	Páncreas	466 003	Cérvix	56.58
Esófago	604 100	Próstata	375 304	Colon	48.41
Tiroides	586 202	Cérvix	341 831	Mama	30.29
Vejiga	573 278	Leucemia	311 594	Próstata	26.53

\*Mortalidad: es la proporción de personas que fallecen respecto al total de la población en un período de tiempo

\*Letalidad: se refiere a la proporción de personas con una característica particular que mueren respecto al total de personas que tienen esa característica (47).

## Cáncer de hígado: Carcinoma hepatocelular

Los tumores hepáticos son el sexto tipo de cáncer más común en el mundo, sin embargo, este tipo de neoplasias ocupan el segundo puesto en letalidad a nivel mundial (46) (**Tabla 1**). Entre un 75 - 90 % de los tumores hepáticos corresponden a un tipo en particular, el carcinoma hepatocelular (CHC) (48), el colangiocarcinoma

es el segundo tipo de tumor hepático más frecuente y sólo contribuye con el 8 % de casos de tumores hepáticos, este último tipo de tumor se origina del epitelio de los conductos biliares intrahepáticos, mientras que el CHC se origina principalmente de hepatocitos que han sido expuestos a daños crónicos (49). Alternativamente se ha sugerido que tanto el CHC como el colangiocarcinoma podrían tener un origen celular a partir de las CPH (50). Siendo el CHC el cáncer más frecuente del hígado a continuación se describen los principales factores de riesgo y mecanismos de carcinogénesis para el CHC.

### Factores de riesgo para el desarrollo del CHC

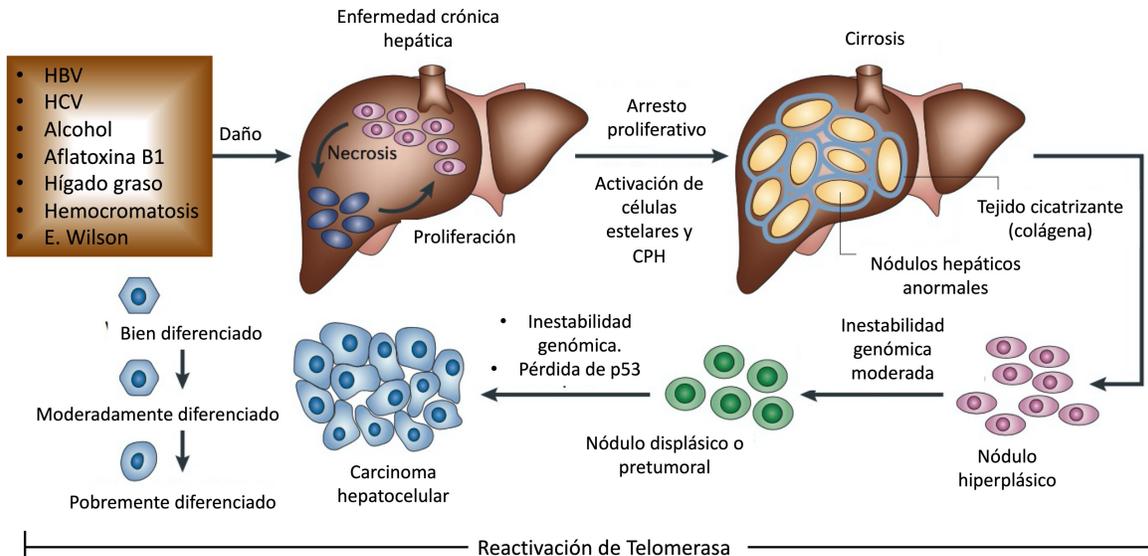
Existen diversos factores de riesgo para desarrollar CHC, por ejemplo:

- Infecciones crónicas por Virus de Hepatitis B (VHB).
- Infecciones crónicas por Virus de Hepatitis C (VHC).
- Ingesta crónica de alcohol.
- Ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas (i.e. Aflatoxina B1).
- Enfermedades hepáticas asociadas a desórdenes metabólicos (e.g. Hígado graso, hígado graso no alcohólico) (51).
- Enfermedades genéticas hereditarias (e.g. Hemocromatosis, Enfermedad de Wilson, la deficiencia de antitripsina).

### Desarrollo del CHC

El CHC es un tumor altamente heterogéneo y letal. Su desarrollo inicia con el daño al hígado de manera crónica considerando cualquiera de los factores de riesgo enlistados previamente. En respuesta a este daño crónico, los hepatocitos, entran en ciclos continuos de recambio celular, (muerte y proliferación). Cuando la capacidad proliferativa de los hepatocitos se abate y la regeneración hepática falla, los hepatocitos restantes quedan confinados en nódulos regenerativos mientras que las CEH y las CPH se activan con el fin de compensar la pérdida de masa celular. La activación de CEH deriva en la pérdida del reservorio de vitamina A y en la

deposición de componentes de matriz extracelular en septos de fibras, rodeando nódulos hepáticos regenerativos en estado de quiescencia. Este proceso, descrito como fibrogénesis hepática (52), es dinámico y prevalece debido al daño hepático crónico hasta el punto donde se establece la cirrosis como enfermedad crónica hepática (**Figura 3**) (53). Las enfermedades crónicas hepáticas como la cirrosis son el contexto en el que se desarrollan más del 90 % de los casos de CHC (54). Una vez establecida la cirrosis, prevalece un microambiente celular pro-inflamatorio donde la necesidad de compensación celular, continua y en respuesta, los hepatocitos de algunos nódulos regenerativos salen del estado de quiescencia y comienzan a proliferar, convirtiéndose en nódulos hiperplásicos. Las células de estos nódulos, con características citológicas normales, pero con actividad hiperplásica, ganarán inestabilidad genómica y con ello alteraciones citológicas, resultando en nódulos con células displásicas. Los nódulos displásicos son considerados como nódulos pretumorales con inestabilidad genómica y pérdida en la función de genes clave como p53 y la reactivación de la telomerasa (53). Estos nódulos eventualmente progresan a un CHC que puede ser bien diferenciado (BD-CHC), moderadamente diferenciado (MD-CHC) o pobremente diferenciado (PD-CHC) este último es considerado el cáncer más avanzado (**Figura 3**) (53,55). La naturaleza de múltiples pasos de la hepatocarcinogénesis y la alta capacidad regenerativa del hígado contribuyen a la heterogeneidad tanto intertumoral como intratumoral del CHC (56,57).



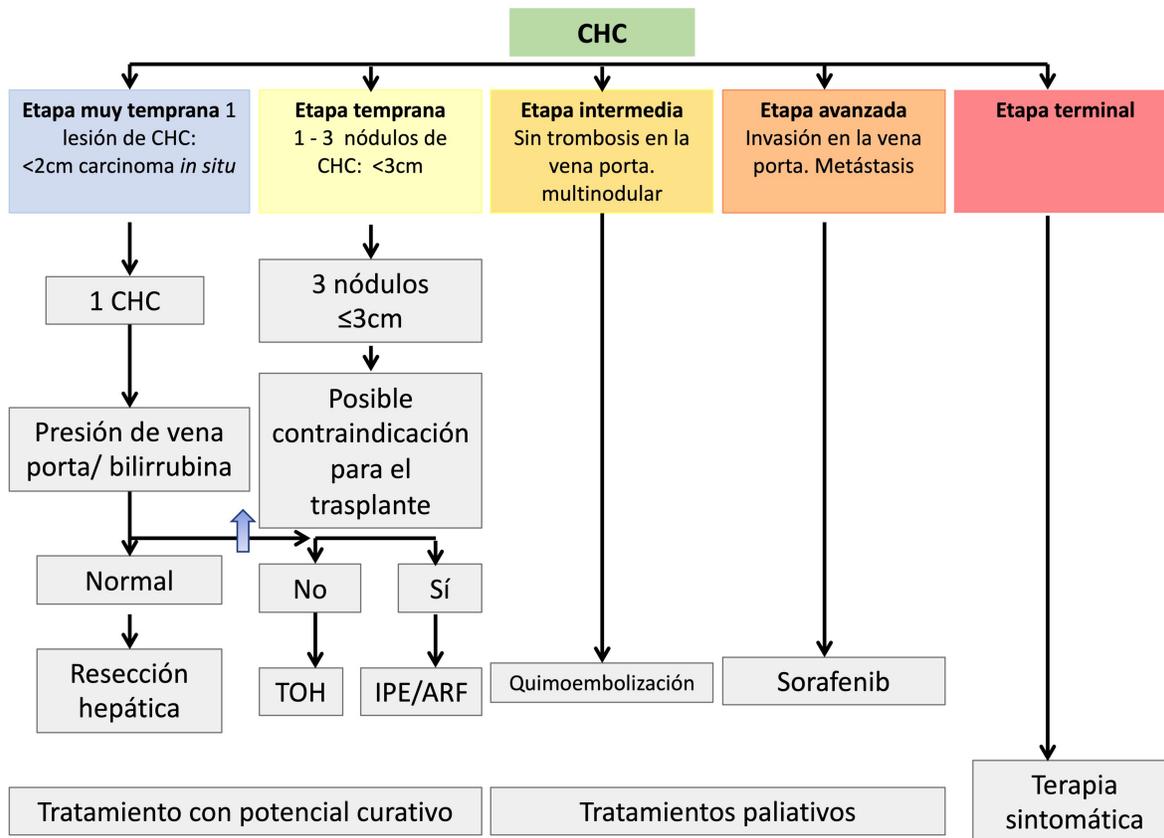
**Figura 3. Desarrollo del CHC.** La hepatocarcinogénesis inicia con el daño crónico al hígado inducido por etiologías de diferente naturaleza. Implica el agotamiento de la regeneración hepática y la compensación con tejido de cicatrización hasta el establecimiento de la cirrosis. Bajo el microambiente inflamatorio y a causa del daño genético hepatocelular surgen nódulos que de forma secuencial y en múltiples etapas forman tumores con al menos tres diferentes grados de diferenciación. Imagen modificada de Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nat Rev Cancer. 2006 Sep; 6(9): 674-87.doi: 10.1038/nrc1934. PMID:16929323.

### Diagnóstico y tratamiento del CHC

En el ser humano, el desarrollo del CHC es un proceso largo que dura entre 10 y 30 años. Además, los pacientes que desarrollan nódulos hiperplásicos y displásicos, normalmente son asintomáticos, lo que dificulta tanto el diagnóstico oportuno como el tratamiento del CHC (53,58). El diagnóstico comprende la exploración física del paciente, exámenes de imagen como el ultrasonido, tomografía computarizada y la resonancia magnética, y opcionalmente parámetros serológicos como niveles de alfa-fetoproteína (AFP), la cual se encuentra fuera de rangos normales en un rango de 50 – 75 % de los pacientes (59).

El tratamiento del CHC depende del estadio de progresión del cáncer (**Figura 4**), donde se considera la función hepática preservada, el tamaño de la lesión y de la

presencia o no de cirrosis. En pacientes con nódulos con un diámetro  $\leq 2$  cm, sin cirrosis y con función hepática normal, el tratamiento es la resección hepática del tumor. En pacientes con 1 – 3 nódulos de CHC con un diámetro  $\leq 3$  cm, con función hepática normal, el tratamiento es el trasplante hepático y/o, inyección percutánea (IPE) y/o ablación por radiofrecuencia (ARF). En pacientes que se encuentran en etapas intermedias, con nódulos de mayor tamaño y sin trombosis en vena porta, el tratamiento recomendado es la quimioembolización y la radioembolización. Los pacientes en etapas avanzadas del CHC con invasión en vena porta y metástasis, son tratados con el inhibidor de cinasas Sorafenib, el cual es el único quimioterapéutico aprobado por la FDA. En etapas terminales, la terapia va a enfocada a la sintomatología (**Figura 4**) (60).



**Figura 4. Esquema de tratamiento para CHC.** El esquema de tratamiento para el CHC divide a la enfermedad en cinco etapas. Solo las primeras dos etapas cuentan con tratamientos potencialmente curativos. Trasplante orto hepático (TOH), Inyección percutánea (IPE), Ablación por radio frecuencia (ARF). Imagen modificada de Forner A, Gilibert M, Bruix J, Raoul JL. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. Nat Rev Clin Oncol. 2014 Sep; 11(9):525-35. Doi: 10.1038/nrclinonc.2014.122. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25091611.

#### Biomarcadores para el estudio y diagnóstico del CHC

Además del diagnóstico mediante exámenes de imagen se utilizan marcadores serológicos como la AFP así mismo, se han descrito marcadores histológicos del CHC tales como el Glypican-3 (GPC3), la Heat shock protein 70 (HSP70), la glutamina sintasa (GS), y la arginasa I (ARG1) (61). No obstante la variedad de proteínas, estos marcadores presentan variabilidad en la sensibilidad y especificidad dependiendo del grado de diferenciación del CHC, además de que este tipo de cáncer suele presentar una elevada heterogeneidad intratumoral (62). En los últimos años la necesidad de estudiar al CHC de acuerdo con la expresión

de marcadores se ha clarificado con los avances tecnológicos de la genómica. Los estudios con objetivos de establecer paneles de biomarcadores relacionados al comportamiento tumoral y la supervivencia de los pacientes han mostrado que los CHC positivos a marcadores progenitores tales como la molécula de adhesión celular (EPCAM), molécula de adhesión de células neurales (NCAM), homólogo delta-like 1 (DLK1), y KRT19, son tumores agresivos, con altas tasas de recurrencia y capacidades metastásicas así como resistentes a la quimioterapia (63).

Desde 1999, se documentó la sobreexpresión de la GGT en diversos tumores, entre los que figura el CHC (64), además la detección de células con actividad GGT, es útil para el estudio de expresión génica (65). Por otro lado, se ha postulado a tumores de CHC que expresan KRT19, como un subtipo de origen progenitor (66), además de que los pacientes con tumores KRT19-positivos presentan altas tasas de recurrencia y altos niveles de metástasis (67). Ambas proteínas se han encontrado en nódulos displásicos o pretumorales en diversos estudios (68,69) por estas razones estos dos marcadores de origen progenitor son relevantes en el estudio del CHC.

#### [Gamma-glutamil transferasa \(GGT\)](#)

La GGT es una enzima que se encuentra en la membrana celular y está involucrada en el metabolismo del glutatión (70,71). La función principal de esta enzima es escindir en el enlace gamma-glutamil del glutatión extracelular y de los conjugados con glutatión, liberando el ácido glutámico y la cisteinglicina, este último es hidrolizado a cisteína y glicina por aminopeptidasas membranales. Una vez separados los aminoácidos, estos pueden ser internalizados a las células y usados para la síntesis *de novo* del glutatión (71). La expresión de la GGT normalmente se encuentra en la superficie luminal de las células secretoras y absorptivas de los conductos biliares, se encuentra también en las CPH, pero no en los hepatocitos (72). El aumento en la expresión de esta enzima brinda ventajas a las células que la expresan bajo condiciones pro-oxidantes y altas en radicales libres, consecuencia del crecimiento descontrolado y las condiciones de hipoxia o por el tratamiento de

quimioterapéuticos (73–75). En modelos experimentales de hepatocarcinogénesis se ha descrito que la expresión de GGT es una característica constitutiva de nódulos displásicos y tumorales (70).

#### [Citoqueratina 19 \(KRT19\)](#)

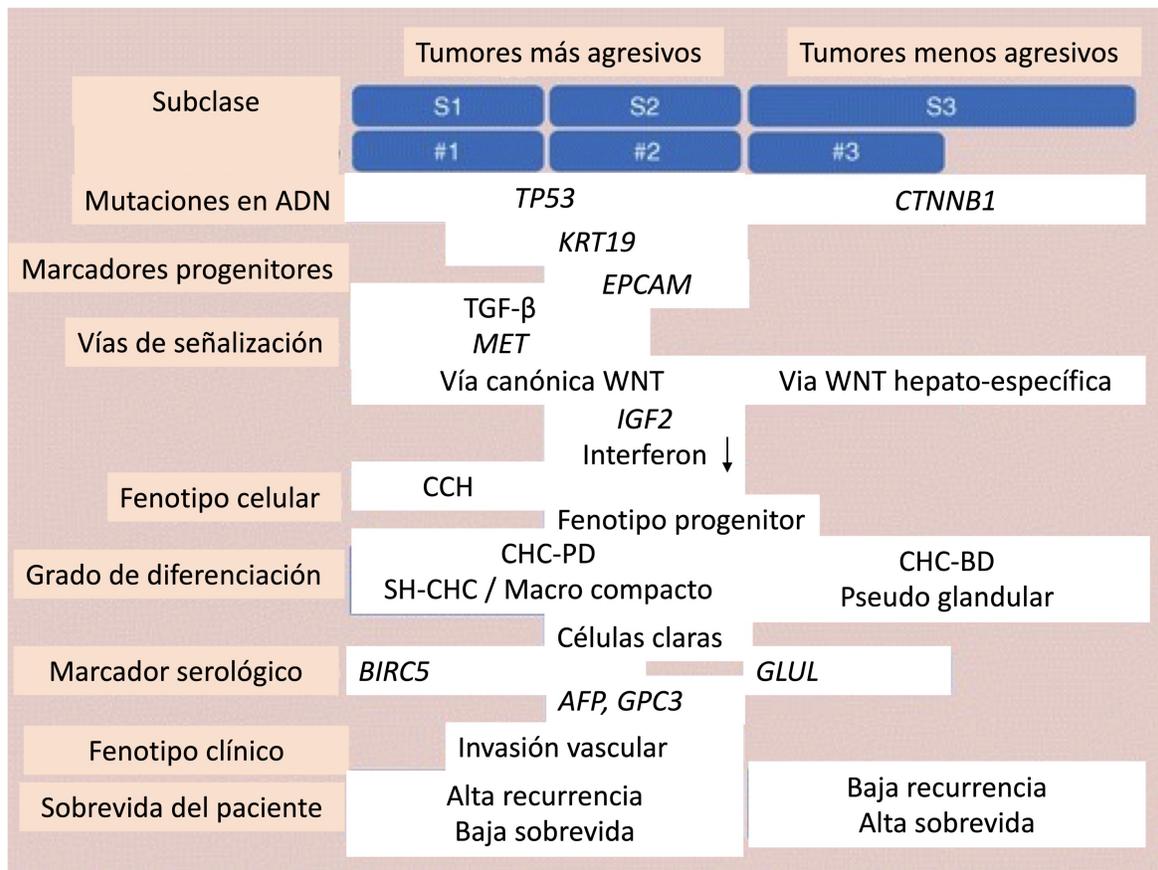
La KRT19 es un miembro pequeño (aproximadamente 40 kDa) de la familia de queratinas. Las queratinas son filamentos intermedios responsables de la integridad estructural de las células epiteliales y se subdividen en citoqueratinas y queratinas capilares (76). La KRT19 pertenece a la clase I de queratinas, las cuales son queratinas ácidas y es la única que no necesita estar en conjunto con una queratina de clase II o básica (76). En el hígado, los colangiocitos y las CPH expresan KRT19, mientras que los hepatocitos maduros expresan una combinación de KRT18 y KRT8 (77). Por su alta sensibilidad, KRT19 ha sido utilizada para detectar mediante RT-PCR, células tumorales de cáncer de mama diseminadas en nódulos linfáticos, sangre periférica y médula ósea (78,79). En el caso del CHC, en los últimos años se ha propuesto como un marcador para un subtipo de tumores hepáticos (80,81).

La subclasificación del CHC mediante la expresión de marcadores y los análisis ómicos han permitido estratificar a este tipo de tumor de manera molecular, metabólica e inmunológica. Estas clasificaciones guardan una relación con factores clinopatológicos (82), lo que ha aportado avances en marcadores tempranos, así como tratamientos específicos para cada subtipo de CHC.

#### [Secuenciación del transcriptoma como herramienta para el estudio del CHC](#)

En los últimos años se han desarrollado diversos estudios que han conseguido definir subtipos de CHC a nivel molecular y metabólico con diferencias en la activación de vías y en la sobrevida de pacientes (83). Así mismo, se han identificado perfiles de expresión de isoformas de genes que son específicas para cada subtipo de CHC, por ejemplo un estudio basado en análisis transcriptómico y metabolómico logró identificar tres subtipos de CHC; el subtipo 1 mostró

alteraciones en el metabolismo de la quinurenina (metabolito del l-triptófano), el subtipo 2, mostró una relación entre el metabolismo de lípidos y la activación de la vía WNT/ $\beta$ -catenina y el subtipo 3, se caracterizó por la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR, a su vez, cada subtipo expresó diferencialmente una isoforma para llevar a cabo la misma reacción enzimática, por ejemplo la Acyl Co-A sintetasa de cadena corta 1 (ACSS1) se encontró sobrerregulada en el subtipo 1, la ACSS2 en el subtipo 2 y la ACSS3 en subtipo 3. Estos resultados sugieren quimioterapias específicas para cada subtipo de CHC con resultados más eficientes (83). Recientemente, mediante el análisis de 183 muestras de pacientes, se definieron tres principales subtipos de CHC. El subtipo 1 estuvo caracterizado por tumores mitogénicos y con propiedades progenitoras; el subtipo 2 estuvo constituido por tumores con mutaciones en CTNNB1 y supresión inmunogénica y el subtipo 3 estuvo constituido por tumores asociados a desórdenes metabólicos y con altos índices de infiltración de macrófagos, y mejores tasas de supervivencia (82). Uno de los estudios eje en cuanto a estratificación molecular del CHC es el realizado por Hoshida (84). Mediante el análisis transcripcional de 603 muestras, los autores lograron identificar de manera clara tres perfiles de expresión asociados a subclases de CHC con correlación a parámetros como: tamaño de tumor, grado de diferenciación celular y niveles séricos de AFP. Los autores identificaron que la subclase 1 (S1) manifiesta una activación aberrante en la vía de WNT, la subclase 2 (S2) manifestó una proliferación celular característica mientras que la subclase 3 (S3) estuvo asociada principalmente al grado de diferenciación celular (**Figura 5**). Es importante mencionar que, en los tres estudios mencionados, la expresión de características progenitoras en los tumores guarda una relación en características clinopatológicas como tamaño de tumor, agresividad, metástasis y menores tasas de supervivencia en los pacientes.



**Figura 5. Principales características de las tres subclases de CHC identificados por Hoshida y colaboradores.** La S1 y S2 son los tumores más agresivos; características que los definen son la expresión de marcadores de origen progenitor (e.g. KRT19), mutaciones en *TP53*, y son CHC pobremente diferenciados. En contraste, los tumores S3, son tumores menos agresivos, con un grado de diferenciación alto (BD-CHC) y el gen con mayor frecuencia en mutaciones es *CTNNB1*. Imagen modificada de Goossens N, Sun X, Hoshida Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepat Oncol.* 2015;2(4):371-379. doi: 10.2217/hep.15.26. MID: 26617981; PMC4662420.

### Modelos experimentales como herramientas para el estudio del CHC

Para reducir la mortalidad por cáncer de hígado, se necesitan métodos de diagnóstico oportuno del CHC, sin embargo, la complejidad en el desarrollo de este tipo de tumor, así como el largo tiempo de desarrollo patológico, dificultan el estudio de las etapas tempranas del CHC en pacientes humanos. Una herramienta que permite aproximarse al estudio por etapas, así como recrear la heterogeneidad de

este tumor, es la implementación de modelos experimentales de la hepatocarcinogénesis. En general, los modelos experimentales en animales han permitido la identificación de nuevos genes y biomarcadores tumorales, así como la validación de estos. También han sido útiles para el estudio molecular de las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis (85). También han sido utilizados para evaluar moléculas como nuevos agentes terapéuticos con utilidad en la resistencia tumoral. Si bien los modelos experimentales en animales muestran como principal limitación la diferencia inter-especie, los modelos experimentales en animales siguen arrojando información valiosa que es aplicable a la especie humana (86).

Desde el año 1930, diversos modelos experimentales en animales han sido utilizados para inducir hepatocarcinogénesis química, mediante la exposición continua o única de carcinógenos. Los carcinógenos pueden presentar varias propiedades para inducir neoplasia:

- 1) Los carcinógenos iniciadores incrementan la diversidad genética mediante su propiedad genotóxica, siendo generalmente mutágenos.
- 2) Los carcinógenos promotores favorecen la selección de clones celulares mediante la inducción de la proliferación celular.
- 3) Los carcinógenos completos, son iniciadores y promotores, siendo suficientes para la inducción de cáncer.

La carcinogénesis química implica una secuencia de cambios moleculares, primordialmente en el ADN celular, seguida del crecimiento selectivo de uno o más tipos de células alteradas, generando focos de proliferación celular que, en cada paso del proceso, aumenta la probabilidad de evolucionar a una población neoplásica (87).

El modelo de hepatocarcinogénesis química propuesto en el año 2005 por Eduardo Schiffer permite la inducción tanto de fibrosis como de CHC multinodular, recapitulando de forma experimental patología del cáncer hepático asociado a cirrosis.

## Modelo de Cirrosis y Cáncer o Modelo de Schiffer

El modelo de cirrosis y cáncer o modelo de Schiffer (**Figura 6**), tiene como fundamento la administración periódica del carcinógeno completo dietilnitrosamina (DEN) con la capacidad de afectar a las células tumorales en todas las etapas de la progresión carcinogénica, así como de alterar la estructura lobular y celular del hígado de forma crónica. Dado que el metabolismo de DEN depende del CYP2E1, la activación metabólica ocurre principalmente en los hepatocitos. Una de las principales virtudes de este modelo es que permite replicar el desarrollo del CHC de múltiples etapas en una ventana de tiempo de 18 semanas; iniciando con el daño hepatocelular, el establecimiento de la cirrosis asociado al desarrollo de la displasia y la progresión hacia la neoplasia. Además, el modelo de cirrosis y cáncer también recrea la heterogeneidad inter-tumoral e intra-tumoral que caracterizan al CHC de los pacientes. Los nódulos producidos en este modelo expresan una variedad de marcadores del CHC tales como la GGT y la glutatión S-transferasa pi (GSTP) (88).

## Justificación

Tomando en cuenta la alta tasa de letalidad del CHC, la dificultad que representa el estudio de las etapas tempranas, y la alta heterogeneidad que caracteriza a este tipo de tumor se hace evidente la necesidad de estudiar, con precisión, los cambios moleculares que anteceden al CHC, mediante el uso de modelos experimentales y con tecnologías de punta como la secuenciación de transcriptoma.

Considerando las dificultades para la detección oportuna del CHC en etapas displásicas, y que los CHCs positivos a marcadores progenitores son tumores altamente agresivos en este trabajo, se planteó determinar el perfil transcripcional de nódulos GGT/KRT19-positivos en dos momentos críticos del desarrollo de la hepatocarcinogénesis; displasia y neoplasia, con el fin de determinar eventos moleculares tempranos que contribuyan a la detección y tratamiento del CHC GGT/KRT19-positivo.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Analizar las características histológicas y determinar un perfil de expresión de nódulos fenotipo-específicos (GGT/KRT19-positivos) inducidos en un modelo de cirrosis y cáncer.

### Objetivos Particulares

1. Caracterizar los cambios histológicos en dos puntos críticos (displasia y neoplasia) del modelo de cirrosis y cáncer, mediante marcadores de fibrosis, marcadores de células progenitoras hepáticas, y marcadores de tumor.
2. Identificar y obtener de manera específica nódulos GGT/KRT19-positivos en la etapa displásica y neoplásica del modelo de cirrosis y cáncer.
3. Determinar y analizar el transcriptoma de los nódulos GGT/KRT19-positivos.
4. Identificar y validar genes diferencialmente expresados (GDE), así como vías metabólicas desreguladas en nódulos GGT/KRT19-positivos tanto en la etapa displásica como en etapa neoplásica.
5. Revisar el impacto clínico-patológico de los GDE en los nódulos GGT/KRT19-positivos y su relación con el CHC humano a través de un análisis de co-expresión y de análisis de supervivencia.
6. Evaluar perfiles de expresión de microRNAs de las diferentes etapas hepatocarcinogénicas del modelo de cirrosis y cáncer, así como de un modelo de inducción de células progenitoras hepáticas.
7. Buscar microRNAs que regulen los GDE en nódulos GGT/KRT19-positivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales de laboratorio

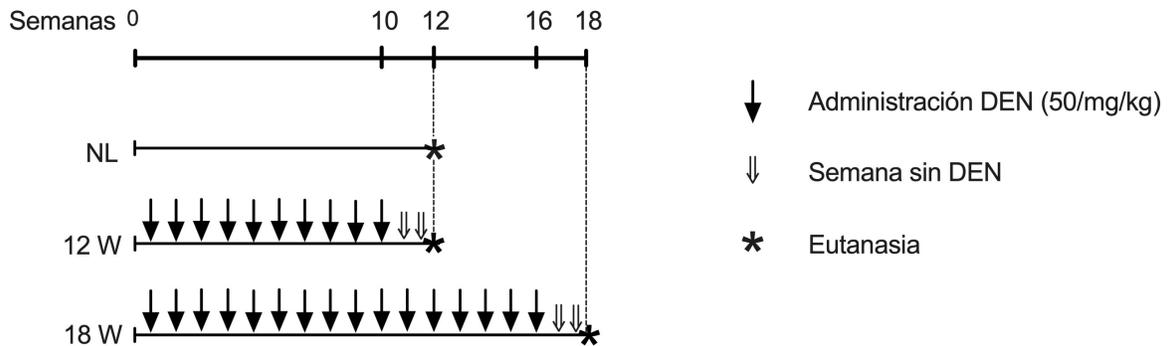
La Unidad de Producción de Animales del Laboratorio Experimental de la UPEAL-CINVESTAV, proveyó ratas macho de la cepa Fisher 344, con un peso inicial de 180 a 200 g (seis semanas de edad). Las ratas fueron albergadas en cajas de polietileno (tres animales por caja) bajo temperatura controlada (20 – 25 °C), ventilación filtrada automatizada y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con dieta estándar (Purina 5008, St. Louis, MO; EUA) y agua potable. Los animales recibieron el cuidado y manejo adecuado, de acuerdo con el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (CICUAL) de CINVESTAV-IPN y el protocolo aprobado No. 0283-18.

### [Modelo de hepatocarcinogénesis química en rata.](#)

Este protocolo ha sido descrito como modelo de cirrosis y cáncer, modelo de DEN o modelo de Schiffer (88).

Quince ratas fueron divididas en tres grupos experimentales (n=5), a dos grupos se les administró semanalmente una inyección intraperitoneal (i.p.) de dietilnitrosamina (DEN, N0756; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; EUA) a una dosis de 50 mg/kg de peso (88). El primer grupo experimental, denominado, *12 W*, recibió 10 dosis de DEN más dos semanas sin tratamiento, como recuperación de necrosis aguda causada por el carcinógeno, sumando 12 semanas de tratamiento en el momento de eutanasia. El segundo grupo experimental, denominado, *18 W*, recibió 16 dosis de DEN más dos semanas sin tratamiento, sumando 18 semanas de tratamiento en el momento de eutanasia. Un tercer grupo experimental constó de ratas adultas administradas con solución salina en lugar de DEN. Este grupo se denominó hígado normal (*NL*) (**Figura 6**). Los tejidos hepáticos provenientes del modelo de cirrosis y cáncer fueron utilizados para la caracterización histológica con marcadores de fibrosis, de células tumorales y progenitoras, la obtención de nódulos displásicos y neoplásicos

GGT/KRT19-positivos y la determinación de microRNAs implicados en la regulación de genes diferencialmente expresados en nódulos GGT/KRT19-positivos.



**Figura 6: Modelo de inducción de cirrosis y cáncer (Modelo DEN o de Schiffer).** Las flechas negras indican los momentos de administración (i.p.) semanal de DEN. Los asteriscos indican los puntos de eutanasia y las flechas blancas las semanas de recuperación, sin administraciones de DEN. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

#### [Modelo de inducción de células progenitoras hepáticas](#)

A cinco ratas se les administró durante tres días una dosis de 25 mg/kg de 2-acetilaminofluoreno (2AAF, 53-96-3; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; EUA), por vía intragástrica, posteriormente se les realizó una hepatectomía parcial del 70 % para estimular la activación de células progenitoras hepáticas (89). A este modelo se le abrevió como 2AAF+PH. Los tejidos provenientes del modelo de inducción de células progenitoras fueron utilizados para la determinación de microRNAs implicados en la regulación de GDE en nódulos GGT/KRT19-positivos.

#### [Banco de tejidos hepáticos](#)

La eutanasia de las ratas tratadas se realizó bajo anestesia, dos semanas después de la última inyección de DEN y la eutanasia de las ratas pertenecientes al grupo NL, se realizó a las 12 semanas después de haber sido adquiridas (peso aproximado de 240 g). Para la eutanasia, las ratas fueron anestesiadas con éter, y después se desangraron cortando la vena cava inferior. El hígado se escindió, se lavó con PBS 1X a temperatura ambiente (TA), se pesó y cada lóbulo del hígado

fue fraccionado. Al menos tres porciones representativas de los lóbulos fueron adheridas en piezas de corcho con Tissue Tek y congeladas en nitrógeno líquido utilizando 2-metilbutano como crioprotector. Otras tres porciones fueron fijadas en formaldehído al 10 % por 18 h para posteriormente incluirlas en parafina. Con estas muestras hepáticas se conformó un banco de tejidos que denota el curso temporal de la hepatocarcinogénesis, desde la formación de nódulos hasta el cáncer. Este incluye: hígado normal (NL), hígado cirrótico con nódulos displásicos (12 W), hígado cirrótico con CHC multinodular (18 W) e hígado con una población celular progenitora enriquecida (2AAF+PH). Todos los tejidos fueron preservados en congelación a -70 °C, fijados en formol o incluidos en parafina.

#### [Métodos Histológicos](#) [Análisis Histopatológicos](#)

Tras la inclusión en parafina, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, se desparafinaron y gradualmente fueron rehidratados. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina & Eosina (H&E) de acuerdo con protocolos convencionales para detectar alteraciones histopatológicas. Además de nuestras observaciones, la descripción del análisis histopatológico fue realizado por una anatomopatóloga en ensayo ciego. Finalmente, se tomaron fotografías de los cortes usando el microscopio Axio Scope A1 (Carl-Zeiss, Oberkochen, BW, Alemania) acoplado a una cámara EOS 1000D (Canon, Ciudad Ota, TKY, Japón).

#### [Histoquímica para GGT](#)

Se realizó la histoquímica para GGT, agregando una solución (300 mL de un pH 7,4) que contenía 75 mg de ácido L-glutámico  $\gamma$ -4-metoxi- $\beta$ -naftilamida (G0141; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; EUA), 600 µg de glicilglicina (G1002; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; EUA.), Y 150 µg de Fast-Blue (F3378; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; EUA) Esta solución se incubó durante 12 min, después de dicho periodo, se formó un precipitado de color rojo sobre los nódulos hepáticos con actividad GGT. (**Figura 8B**). Las laminillas se dejaron secar a TA para el acoplamiento de otros protocolos histológicos.

#### [Doble tinción; histoquímica para GGT y tinción de colágenas tipo I y III \(Tinción de Herovici\)](#)

Después de la histoquímica para GGT, las laminillas fueron lavadas con PBS 1X (4 °C) y se llevó a cabo la tinción policrómica de Herovici para detectar fibras de colágena tipo I y tipo III (tinción roja y azul, respectivamente). La tinción se llevó a cabo en cortes histológicos de 5 µm y se siguió el protocolo convencional (90). Las laminillas se montaron con medio Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se tomaron tres fotografías con el campo 5 X, por réplica biológica para cuantificar la proporción de área de colágena tipo I y III, el análisis de imágenes se realizó con el software ImageJ (91). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Axio Scope A1 (Carl-Zeiss, Oberkochen, BW, Alemania) acoplado a una cámara (Canon, Ciudad Ota, TKY, Japón). Las imágenes fueron analizadas mediante el software ImageJ.

#### [Análisis de Inmunofluorescencia](#)

A partir de las secciones hepáticas congeladas, se hicieron cortes de 5 µm de espesor, se fijaron con acetona durante 5 min a -20 °C, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 10 % durante 1 h y luego se incubaron durante la noche con anti-CD90 (1:50; NovusBio, Littleton, CO; EUA), o anti-KRT19 (1: 100; Bio SB, Santa Barbara, CA, EUA) por 1 h. Los anticuerpos primarios se detectaron usando anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488 o anti-IgG de conejo marcado con Alexa 594, respectivamente, ambos a una dilución de 1: 300 (Jackson, West Grove, PA; EUA) durante 1 h. Como control experimental se incubó el control de isotipo de ratón o de conejo. Para cuantificar el tejido positivo a CD90 y KRT19 se tomaron al menos cinco fotografías con el campo 5 X, en tres réplicas biológicas . Las fotografías fueron tomadas con el microscopio AXIO Scope (Carl-Zeiss, Oberkochen, BW, Alemania). El análisis de imágenes se realizó con ayuda del software ImageJ.

#### [Detección de nódulos GGT/KRT19-positivos](#)

Después de la inmunofluorescencia anti-KRT19 y de haber lavado tres veces las laminillas con TBS 1X, se llevó a cabo la histoquímica para GGT, previamente descrita. Finalmente, las laminillas se montaron con medio de montaje fluoroshield

(ab104137; Abcam Cambridge, CAMBS; Reino Unido). Para detectar y cuantificar nódulos GGT/KRT19-positivos, se tomaron fotografías con el campo 5 X hasta que se abarcó en su totalidad el corte histológico en las laminillas, por lo menos tres cortes histológicos por réplica biológica fueron considerados y se evaluaron a las cinco ratas que conformaban el grupo experimental. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Axio Scope A1 (Carl-Zeiss, Oberkochen, BW; Alemania) acoplado a una cámara EOS 1000D (Canon, Ota City, TKY; Japón). El análisis de las imágenes fue llevado a cabo con ayuda del software ImageJ.

#### [Histoquímica de GGT con protección de ARN para obtener nódulos KRT19 y GGT positivos mediante microdissección láser](#)

De las secciones hepáticas que contenían nódulos GGT/KRT19-positivos, se cortaron criosecciones en serie, de un grosor de 10  $\mu\text{m}$  en un Criostato (Leica, CM1520, Wetzlar, HE; Alemania) a  $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las criosecciones fueron montadas en portaobjetos de vidrio con membrana de polietileno naftalato (PEN membrane glass slides) (LCM0522; Applied Biosystems, Waltham, MA; EUA). De la misma forma se cortaron criosecciones de hígado normal (NL). Una vez adheridas, fueron fijadas con una solución compuesta de alcohol absoluto grado biología molecular y el inhibidor de RNAsas dietilpirocarbonato (DEPC), a una concentración de 0.05 % v/v, por 5 min a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se removió la solución de fijación y se adicionó la solución del sustrato de la GGT en un buffer de reacción optimizado que contenía 0.25 mg/mL de GMNA, 2 mg/mL de glicilglicina, 0.5 mg/mL de Fast Blue y 50 mM de MOPS pH 7.4; disueltos en agua libre de RNAsas suplementada con DEPC (0.05 % v/v). La reacción se incubó durante 12 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después los portaobjetos fueron secados con la ayuda de la flama de un mechero por un minuto, sin calentar en exceso, evitando la humedad residual y la reactivación de RNAsas, el procedimiento fue seguido tal cual lo señalado (65).

#### [Microdissección Láser](#)

Después de la histoquímica para GGT con protección de ARN, las laminillas con secciones de *NL*, *12 W* y *18 W* se procesaron mediante Microdissección Láser (MDL)

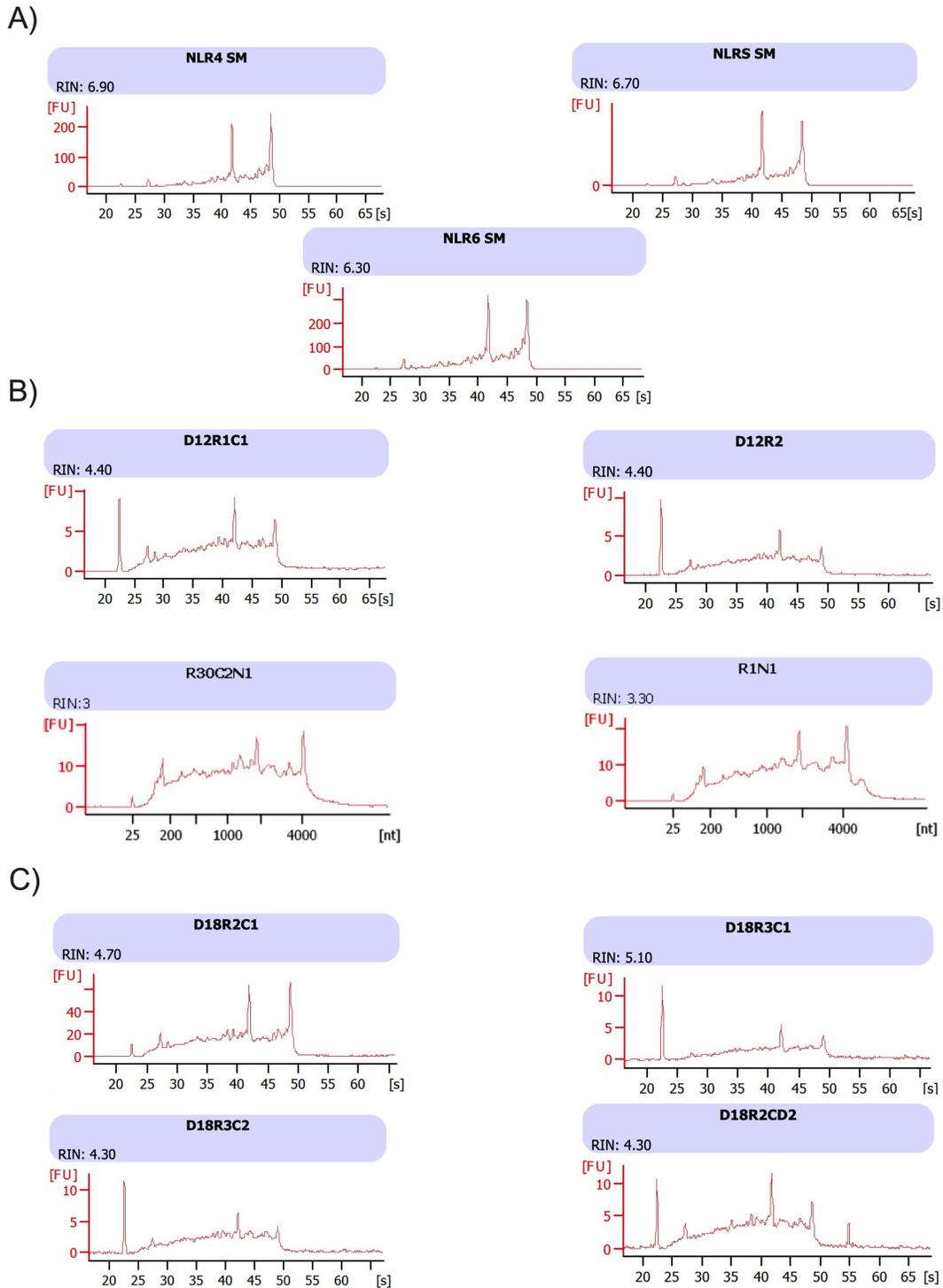
(PALM Microlaser. Carl Zeiss MicroImaging. Bernreid, Alemania, GmbH). Los ajustes utilizados para el corte por láser fueron: Velocidad de uno, Energía de 48 y Enfoque de 80. Los nódulos GGT/KRT19-positivos se cortaron siempre por dentro de la marca de la GGT para evitar contaminación con tejido no positivo a estos marcadores. Los cortes fueron llevados a cabo bajo el objetivo 10 X (92). El láser puede cortar la membrana PEN del portaobjetos, y esto proporcionó suficiente soporte para recolectar el tejido con una aguja 27G. Todo el procedimiento no duró más de dos horas como es recomendado (65).

#### Extracción del ARN total del tejido obtenido mediante Microdissección Láser

Todo tejido obtenido mediante MDL fue depositado en un tubo con 90  $\mu$ L de buffer de lisis, buffer RLT de Rneasy mini-kit (74104; Qiagen, Hilden, NW; Alemania) suplementado con 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), como coadyuvante en la lisis del tejido previa a la extracción del ARN. El lisado fue homogenizado agitando con vortex a velocidad lenta, posteriormente se añadieron 270  $\mu$ L de buffer de lisis suplementado con 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v). La extracción de ARN total se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. El ARN se eluyó en 20  $\mu$ L de agua libre de RNAasas.

#### Análisis de integridad del ARN obtenido después de la microdissección láser

La integridad del ARN del tejido seleccionado por MDL, fue evaluada por electroforesis de ARN capilar utilizando el bioanalizador Agilent 2100, (Agilent, Santa Clara, CA; EUA). Este análisis tiene como fundamento la tecnología de microfluidos que permite analizar múltiples muestras biológicas en un chip a través de una electroforesis capilar. Con ayuda de un algoritmo, se determina la integridad de ARN con un número asignado que va del 0 al 10, esta calificación recibe el nombre de RIN por sus siglas en inglés (RNA Integrity Number). Idealmente, para estudios ómicos se busca un RIN  $\geq 6$  o muestras cuyo patrón de electroforesis capilar muestre claros picos ribosomales, como fue el caso del presente estudio (**Figura 7**).



**Figura 7: Electroforesis capilar de ARN de las muestras obtenidas por MDL.** Las 11 muestras de la imagen fueron elegidas para secuenciación de ARN mediante RNA-Seq; tres muestras *NL*, cuatro *12 W* y cuatro *18 W*. El criterio de selección de muestras fue la identificación de los picos de ARN ribosomal que corresponden a la subunidad 28S y 18S.

## Construcción de bibliotecas de cDNA y secuenciación de ARN

Las bibliotecas de cDNA fueron preparadas a partir de 100 ng de ARN empleando el “kit TrueSeq Total Stranded RNA” (Illumina, San Diego, CA; EUA) que es adecuado para muestras incluidas en parafina o muestras con un RIN bajo. Brevemente, se removió el rRNA mediante secuencias complementarias de rRNA, unidas a perlas magnéticas, con el RNA restante se realizó la síntesis de cDNA de la primera y segunda hebra mediante PCR, luego se adenilaron los extremos 3' y se ligaron los adaptadores para la amplificación mediante PCR. Se validaron los pases y enseguida se realizó la normalización de muestras. El cDNA amplificado fue secuenciado por síntesis durante 75 ciclos en un Next Seq 500 (Illumina, San Diego, CA; EUA).

## Análisis de datos de secuenciación de ARN

Se verificó la calidad de los datos crudos de secuenciación (FASTQ) y la eliminación de adaptadores usando trim\_galore (v0.4.4), luego, las lecturas se alinearon con el genoma de *Rattus Norvegicus* (ensamblaje 6.0, GCA\_000001895.4) usando HISAT2 v2.1.0. El análisis de control de calidad de los archivos BAM se realizó mediante RSeqC v2.6.4. Las muestras que pasaron el control de calidad se procesaron para contar las lecturas utilizando featureCounts v1.5.0-p3. Después del recuento de lecturas, se eliminaron los genes con cero recuentos de lectura en bruto para todas las muestras (18499 genes de 38079). El análisis estándar del paquete DESeq2 R (93) se utilizó para normalizar todos los recuentos de muestras y el análisis estadístico (el método de ajuste  $p$  fue Benjamini-Hochberg). Genes con los umbrales: valor  $p$  ajustado (FDR)  $\leq 0.05$  y  $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1.5$ , se consideraron como GDE.

## Análisis por RT-qPCR

El cDNA fue preparado a partir de 150 ng de ARNm total de los nódulos microdisecados, en una reacción de 5  $\mu$ l utilizando el Master Mix High Capacity RNA- to cDNA (Applied Biosystems, Waltham, MA; EUA) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de *Akr1b8*, *Akr7a3*, *Gstp1*, *Sox9*, *Abcc3*,

*Txnrd1*, *Ptgr1*, *Ggt1*, *Krt19*, *Car3*, *Slc27a5*, *Acs1*, *Cyp2e1* y *Rxra* se midió empleando sondas TaqMan (**Tabla 2**), en un equipo “QuantStudio 7 Flex Real-time PCR system” (Applied Biosystems, Waltham, MA; EUA). La expresión de los genes analizados se normalizó con *rRNA 18s* (Applied Biosystems, Waltham, MA; EUA). La expresión relativa se calculó mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  comparativo, donde la expresión de *NL* se consideró como muestra de referencia (94).

**Tabla 2.** Sondas Taqman empleadas y IDs

Sonda Taqman	ID Sonda Taqman
<i>Akr1b8</i>	Rn00756509_g1
<i>Akr7a3</i>	Rn00682418_m1
<i>Gstp1</i>	Rn00561378_gH
<i>Sox9</i>	Rn01751070_m1
<i>Abcc3</i>	Rn01452852_m1
<i>Txnrd1</i>	Rn01503798_m1
<i>Ptgr1</i>	Rn00593950_m1
<i>Ggt1</i>	Rn01428468_g1
<i>Krt19</i>	Rn01496867_m1
<i>Car3</i>	Rn01461970_m1
<i>Slc27a5</i>	Rn00577177_m1
<i>Acs1</i>	Rn00563137_m1
<i>Cyp2e1</i>	Rn00580624_m1
<i>Rxra</i>	Rn00441185_m1
<i>rRNA 18s</i>	Rn03928990_g1

#### Análisis de vías metabólicas enriquecidas mediante Ingenuity Pathway Analysis

Los GDE fueron analizados mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Esta herramienta permite detectar vías metabólicas desreguladas que resultan estar “enriquecidas”. En este caso, los genes con una expresión diferencial provenientes de nódulos displásicos (12 W) y nódulos tumorales (18 W) con un fenotipo específico (GGT/KRT19-positivos) fueron sometidos al análisis.

#### Análisis de co-expresión o expresión mutuamente excluyente

Se obtuvieron datos de niveles de expresión de ARNm de 366 muestras de CHC de origen humano, disponibles en la base de datos de cBioPortal for Cancer Genomics de The Cancer Gene Atlas (TCGA) (<https://www.cbioportal.org/>). Las puntuaciones de expresión de ARNm transformadas logarítmicamente de muestras tumorales se

compararon con la expresión de tejidos normales adyacentes de la cohorte, donde se estableció un punto de corte de  $z$  de  $\pm 1.5$ . A partir de 363 muestras que presentaron una alteración en el nivel de expresión de ARNm de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1*, *RXR $\alpha$* , *GGT* y *KRT19*, se generó un mapa de calor y un análisis de co-expresión o de exclusión mutua, considerando las 15 combinaciones (pares) de los seis genes sometidos al análisis (95). El análisis puede verse en <https://bit.ly/34mFukT>.

#### Extracción de ARN de tejido total para análisis de expresión de microRNAs

Se extrajo el ARN total a partir de 50 - 100 mg de tejido hepático congelado de los grupos experimentales, *NL*, *12 W*, y *18 W*, además se consideraron dos tiempos experimentales adicionales; el primer tiempo donde solo se aprecian focos de hepatocitos alterados (según la histoquímica para GGT) el cual corresponde a seis semanas de tratamiento con DEN, *6 W*, y un segundo tiempo adicional que emula un estadio avanzado tumoral, el cual corresponde a 22 semanas de tratamiento (16 semanas de administración más seis semanas sin tratamiento), *22 W*. También se extrajo RNA del modelo 2AAF+PH con el fin determinar el perfil de expresión de microRNAs en un hígado con población celular progenitora enriquecida sin un proceso carcinogénico. El ARN se obtuvo por extracción fenólica con TRIZOL (Reagent Invitrogen, Life Technologies). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol a partir de la fase acuosa.

#### Análisis de datos de microarreglos de expresión de microRNAs

La regulación de la expresión génica en el proceso carcinogénico, mediante microRNAs se evaluó mediante microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad sintetizados *in situ* (GeneChip Rat Gene 2.0 ST array, Affymetrix, Santa Clara, CA; EUA). Para el experimento se utilizó un diseño de réplicas biológicas ( $n=3$ ) para cada grupo experimental. Se hibridaron un total de 18 microarreglos; tres para cada

tipo; *NL*, *6 W*, *12 W*, *18 W*, *22 W* y *2AAF+PH*. La expresión global de los microRNAs fue sujeta a un análisis de componentes principales (ACP). La expresión diferencial de microRNAs (veces de cambio de  $\pm 2$ , valor de  $p$  de ANOVA  $\leq 0.05$ ) fue analizada mediante el software Transcriptome Analysis Console 4.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA; EUA).

#### Búsqueda de genes blanco de microRNAs diferencialmente expresados

Se realizó una búsqueda supervisada en las bases de datos de *MiRNeT* y *miRTarBase* tanto para ser humano como para rata (*hsa\_MTI* y *rno\_MTI*, respectivamente), para determinar si *Acs1*, *Cyp2e1*, *Rxra*, y *Slc27a5* son genes blanco de microRNAs diferencialmente expresados (MDE) según el análisis por microarreglos. Solamente se consideraron a los microRNAs con reportes de validación experimental para los genes mencionados. Para este análisis fueron considerados todos los MDE en *6 W*, *12 W*, *18 W*, *22 W* y *2AAF+PH*.

## RESULTADOS

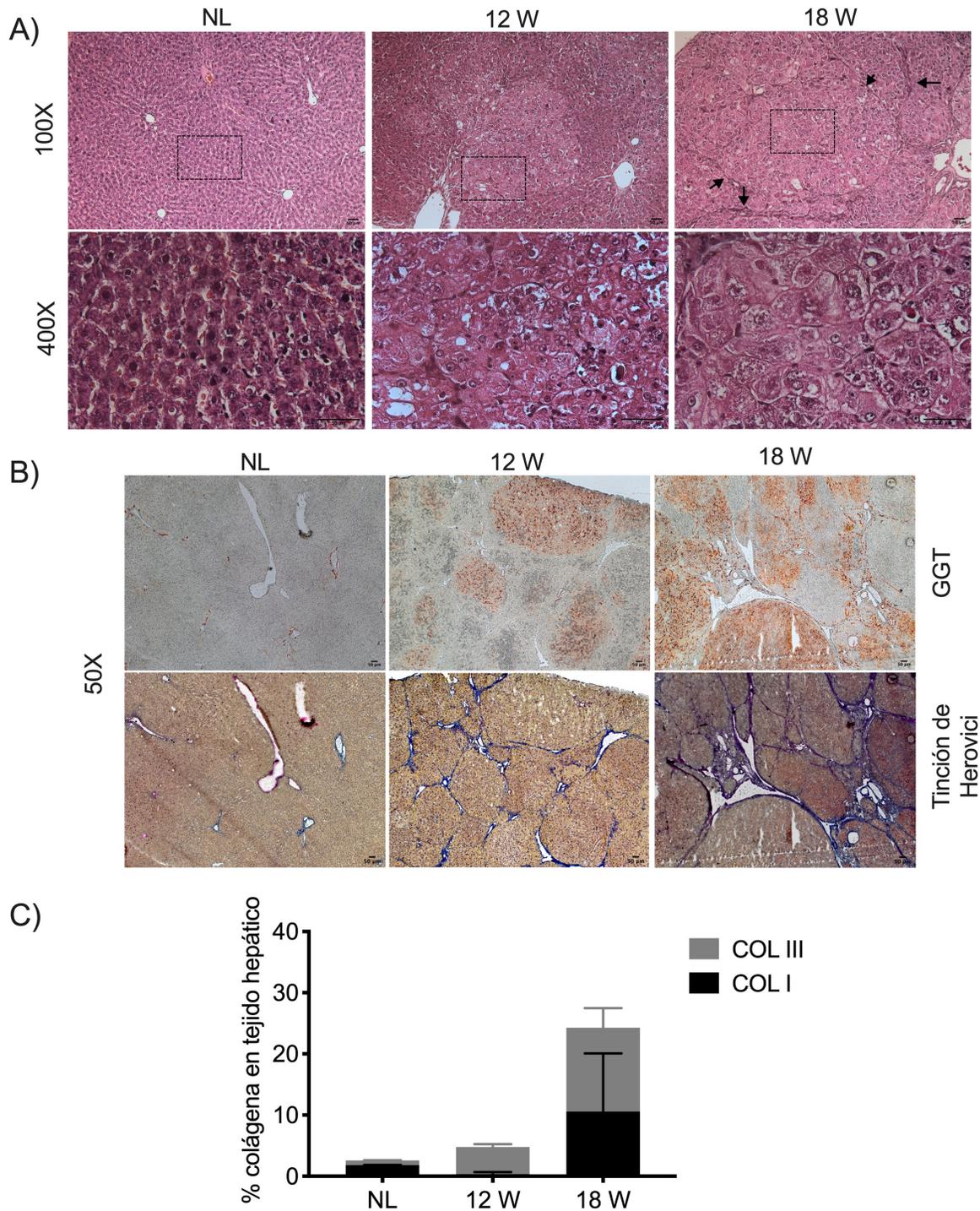
La fibrosis y el CHC multinodular incrementan significativamente a las 18 semanas de tratamiento del modelo de cirrosis y cáncer

Se ha descrito que la administración crónica de DEN induce una carcinogénesis progresiva en el hígado (88). Para analizar cronológicamente la aparición del CHC en el modelo experimental de cirrosis y cáncer, se llevó a cabo una observación histopatológica de muestras teñidas por H&E. El análisis histopatológico mostró que las principales diferencias entre los hígados *12 W* y *18 W* fueron tanto la presencia de tumores tipo CHC, como el aumento de la fibrosis (**Tabla 3** y **Figura 8**). En los hígados *18 W* se detectaron nódulos tipo CHC bien diferenciado (BD) y células de CHC moderadamente diferenciadas (MD). Por el contrario, los hígados *12 W* presentaron solamente células hiperplásicas y displásicas y una fibrosis menor que los hígados *18 W*. Contrariamente a la estructura del lobulillo hepático normal (*NL*), en los hígados *12 W*, el patrón trabecular se volvió más grueso, y en hígados *18 W*, el patrón celular se organizó en multicapa (**Figura 8A**). La tinción de Herovici permitió valorar la fibrosis hepática y los tipos de colágena involucrados (**Figura 8B**). En *NL*, la colágena I se observó en un 1.85 % del tejido hepático, principalmente en las venas centrales (tinción roja), mientras la colágena tipo III (tinción azul) se expresó principalmente en los tractos portales, abarcando 2.65 % del tejido hepático. Por otra parte, se observó que la actividad GGT, en condiciones fisiológicas, se limitó a las regiones portales (**Figura 8C**). En hígados de *12 W*, se observaron diversos nódulos hepáticos con actividad GGT rodeados principalmente por colágena tipo III (4.57 %). En hígados de *18 W*, se observó un aumento en la actividad GGT en el parénquima hepático, así como un aumento en el porcentaje de colágena tipo III (24.29 %). Adicionalmente se observó la aparición de la colágena tipo I que alcanzó el 10.59 % del tejido hepático (**Figura 8C**). Estos resultados muestran cómo el modelo de cirrosis y cáncer recrea el proceso carcinogénico que ocurre en la mayoría de los CHCs de origen humano.

**Tabla 3.** Parámetros histopatológicos evaluados en los hígados provenientes de ratas tratadas con DEN

Criterios Histológicos	Semanas de tratamiento con DEN	
	12	18
Hiperplasia	+	+
Displasia	+	+
BD-CHC	-	+
MD-CHC	-	+
Fibrosis	+	+
Infiltración celular	+	+
Células ovasales o progenitoras	+	+
Esteatosis	-	-
Colestasis	+	+
Inflamación lobular	-	-

El marcaje patológico fue asignado cualitativamente como : + =presente, - = ausente.

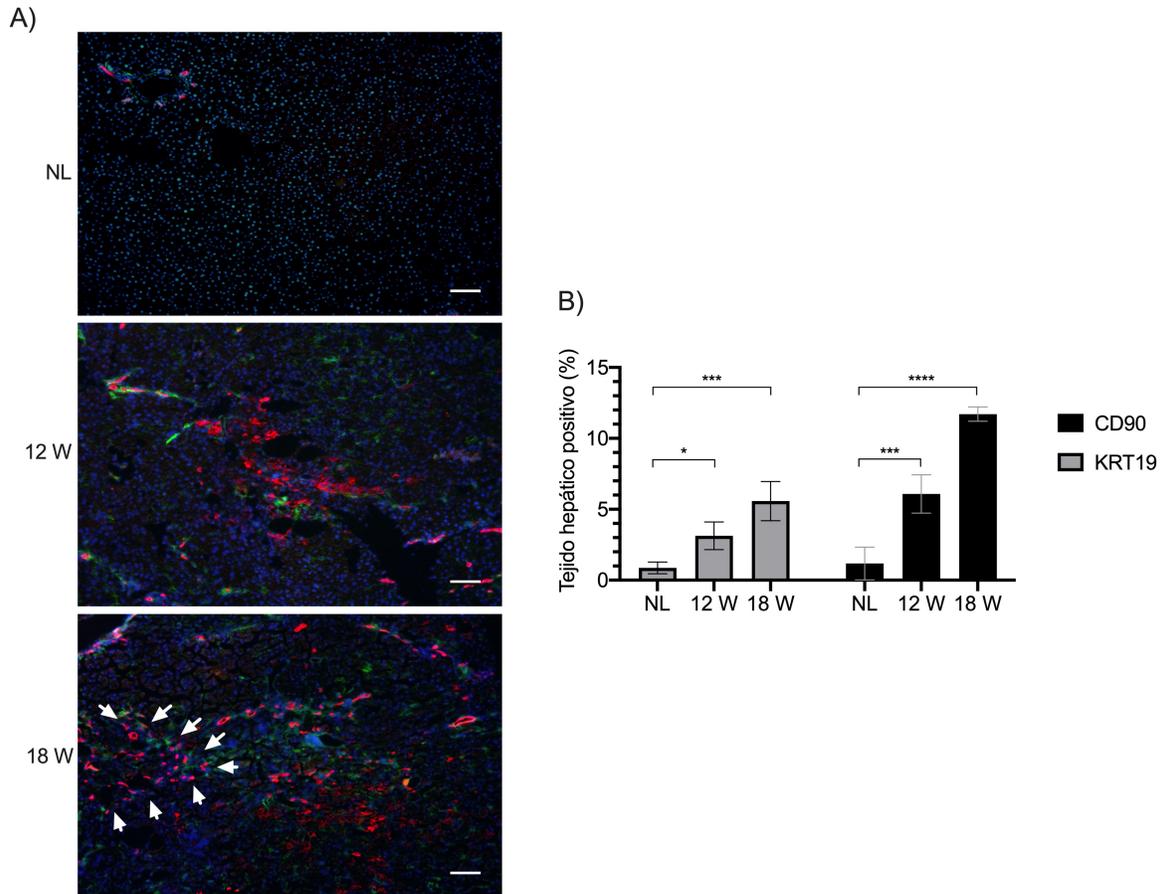


**Figura 8. Observaciones histopatológicas en los hígados experimentales.** A) Imágenes representativas de secciones teñidas con H&E. La primera fila corresponde a un tejido de hígado normal (NL) sin alteraciones. La segunda fila corresponde a una sección de tejido hepático de 12 W, donde se observa un nódulo displásico. La tercera fila corresponde a una sección de tejido hepático de 18 W, donde se observan múltiples nódulos de CHC rodeados de tejido fibrótico (flechas negras).

Los rectángulos punteados señalan el aumento (400 X). (B) Imágenes representativas de las secciones hepáticas sometidas a la histoquímica para GGT y la tinción de Herovici. En *NL*, la actividad de la GGT solo se muestra en los tractos portales, así como la colágena tipo III (azul), mientras que la colágena tipo I (roja) se muestra en la vena central del lobulillo hepático. En hígados *12 W*, la colágena tipo III se expresa rodeando los nódulos hepatocelulares, con y sin actividad de la GGT. En hígados de *18 W*, se muestran múltiples nódulos hepatocelulares con actividad GGT, rodeados de fibras de color púrpura como resultado de la combinación del azul y rojo de los dos tipos de colágena. C) El gráfico muestra las proporciones de ambos tipos de colágena en el hígado. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

### La expresión de marcadores progenitores aumenta a lo largo del desarrollo del CHC

La expresión de marcadores progenitores es una característica del CHC con una naturaleza agresiva (81,96), con el fin de caracterizar la expresión de dos marcadores de origen progenitor, CD90 y KRT19, se llevó a cabo su detección mediante inmunofluorescencia (**Figura 9**). En *NL*, tanto CD90 como KRT19 se expresaron en las regiones periportales, mientras que en hígados de *12 W* la expresión de ambos marcadores aumentó en diferentes regiones del parénquima hepático (**Figura 9A**); KRT19 se expresó en 3.13 % del tejido y CD90 en 6.09 % ( $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.001$ , respectivamente). En hígados de *18 W*, KRT19 se expresó en 5.57 % del tejido hepático y CD90 el 11.71 % ( $p \leq 0.001$ ,  $p \leq 0.0001$ , respectivamente), (**Figura 9B**). La expresión de KRT19 hizo evidente RD en hígados de *18 W*, otro fenómeno interesante que ocurre como compensación del daño hepático. La RD ha sido postulada como la proliferación del nicho progenitor hepático en respuesta al arresto proliferativo de los hepatocitos tras daño crónico (**Figura 9A**). El patrón de expresión de CD90 y KRT19 a lo largo del modelo de cirrosis y cáncer indica que la población celular positiva a marcadores progenitores va en aumento en etapas displásicas y tumorales.

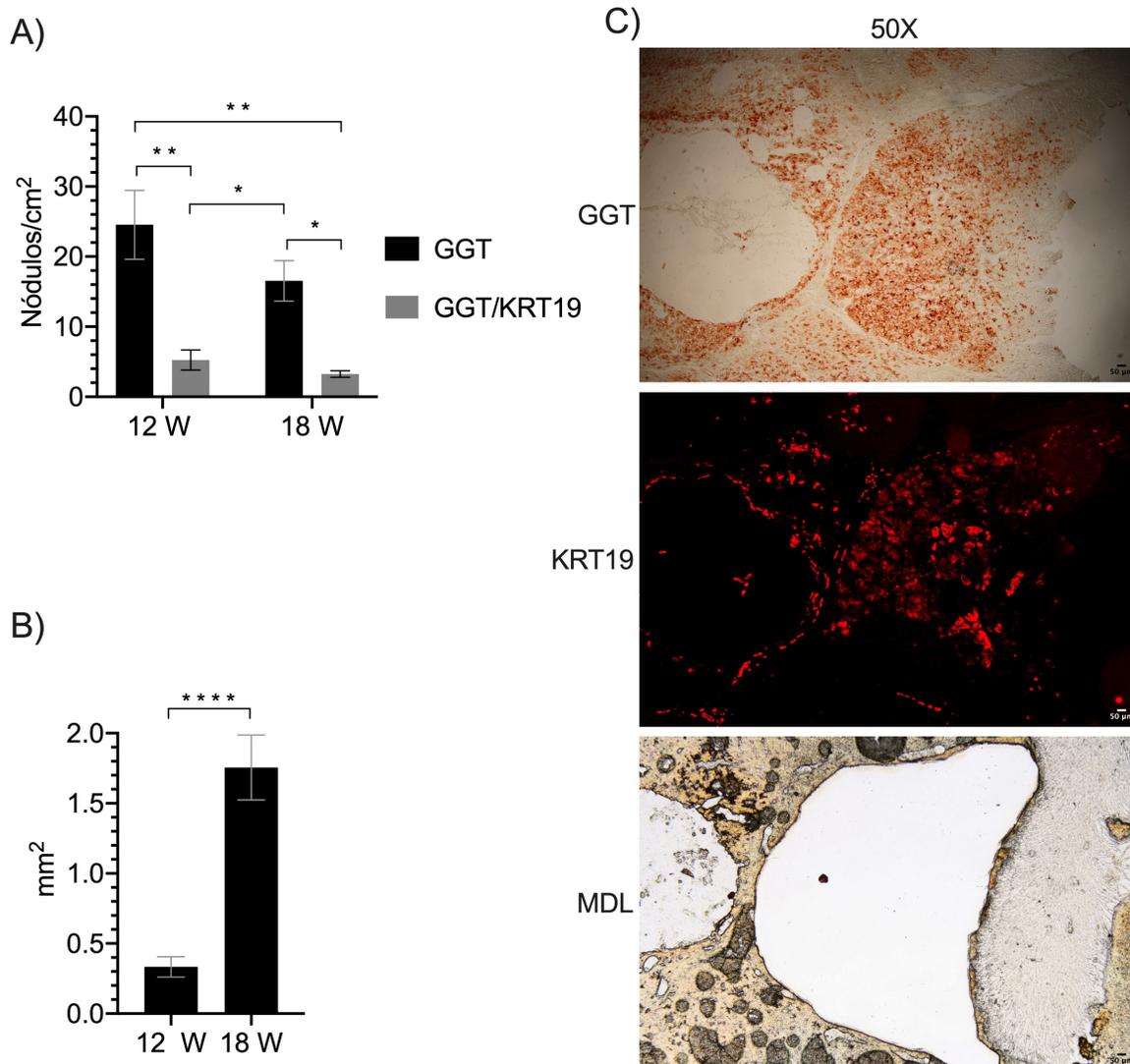


**Figura 9 Expresión de marcadores progenitores en NL, 12 W y 18 W.** A) Imágenes representativas de la expresión de KRT19 (rojo) y CD90 (verde) en NL, 12 W y 18 W. La tinción con DAPI (azul) indica los núcleos celulares. Las flechas blancas señalan la RD. B) porcentaje de tejido hepático positivo a KRT19 y CD90, \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  respecto de NL. Imagen modificada de Castro-Gil MP, Sánchez-Rodríguez R, Torres-Mena JE, López-Torres CD, Quintanar-Jurado V, Gabiño-López NB, Villa-Treviño S, Del-Pozo-Jauner L, Arellanes-Robledo J, Pérez-Carreón JI. Enrichment of progenitor cells by 2-acetylaminofluorene accelerates liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in vivo. Mol Carcinog. 2021 Jun; 60(6):377-390. doi: 10.1002/mc.23298. Epub 2021 Mar 25. PMID:33765333; PMCID: PMC8252613.

La proporción de nódulos GGT/KRT19 positivos persiste desde la etapa displásica hasta la etapa neoplásica en el modelo de cirrosis y cáncer

La GGT es otro marcador de origen progenitor y biliar, ampliamente utilizado en la clínica a nivel serológico como indicador de daño hepático. La determinación de la GGT en el hígado ha sido utilizada ampliamente como marcador de nódulos pretumorales en los modelos de hepatocarcinogénesis experimental en rata. Para

conocer la frecuencia y distribución de las células positivas a KRT19 y GGT, se detectó la GGT mediante histoquímica acoplada a la inmunofluorescencia de KRT19. En los hígados *12 W* se contabilizaron en promedio, 24 nódulos GGT-positivos por  $\text{cm}^2$ , de los cuales cinco fueron positivos para KRT19, lo que representa el 21.42 % de los nódulos. En hígados *18 W*, se contabilizaron 17 nódulos con actividad GGT, de los cuales cuatro fueron también KRT19-positivos. Aunque el número de nódulos por  $\text{cm}^2$  disminuyó en los hígados de *18 W*, la proporción de nódulos doblemente positivos (GGT/KRT19) fue similar en ambos puntos tipos de nódulos (*12 W* y *18 W*) (19.69 %) ( $p = 0.70$ ) (**Figura 10A**). Independientemente de la reducción en el número de nódulos en *18 W*, estos aumentaron de tamaño; el área promedio de los nódulos fue de  $1.73 \text{ mm}^2$ , mientras que en hígados de *12 W* fue de  $0.33 \text{ mm}^2$  ( $p \leq 0.0001$ ) (**Figura 10B**). Estos resultados sugieren que la proporción de nódulos GGT/KRT19-positivos persiste en la progresión hepatocarcinogénica en el modelo de cirrosis y cáncer.

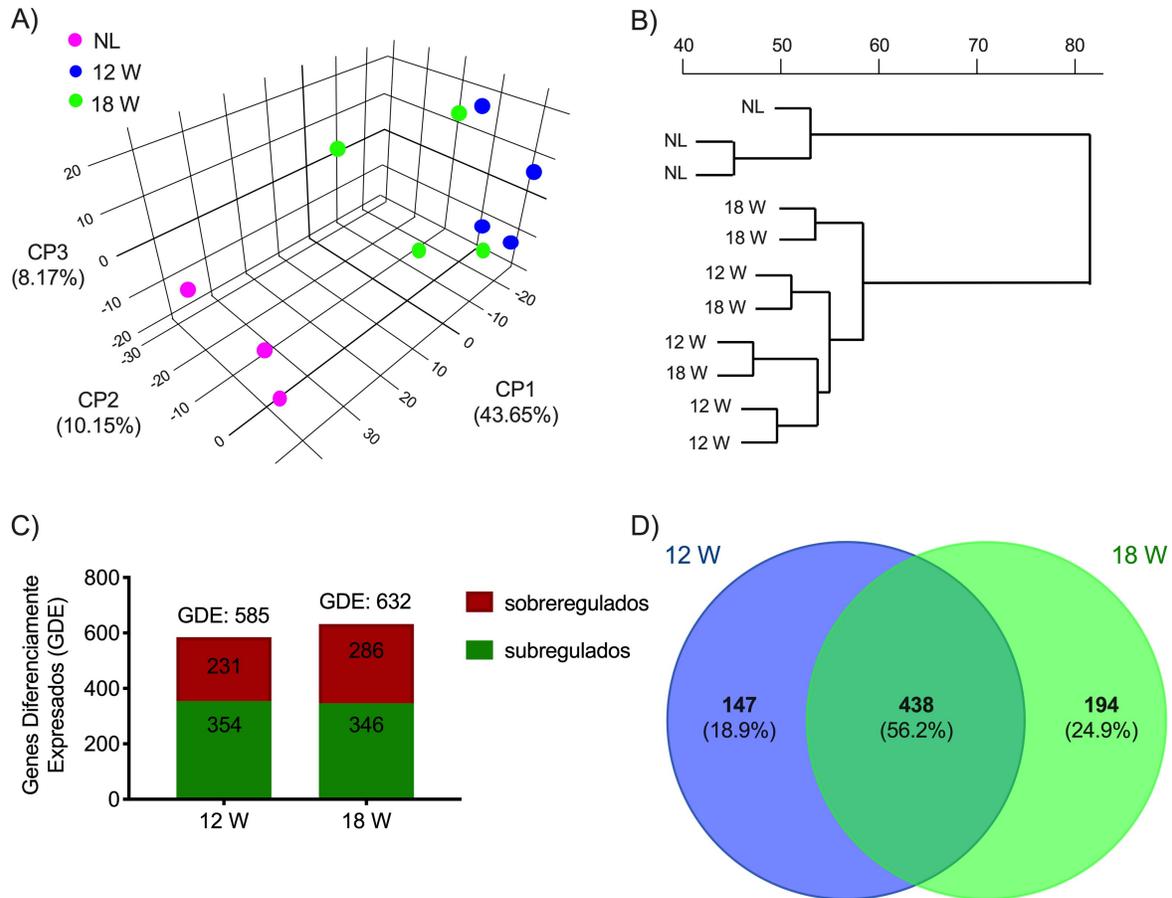


**Figura 10. Detección y cuantificación de nódulos GGT/KRT19-positivos.** A) Número de nódulos GGT y GGT/KRT19-positivos por cm<sup>2</sup>, en hígados 12 W y 18 W. \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . B) Área de nódulos de acuerdo con la semana de tratamiento \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . C) Imagen representativa de un nódulo GGT/KRT19- positivo y el tejido remanente después de capturarlo mediante MDL. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

### Nódulos 12 W y 18 W GGT/KRT19-positivos comparten un alto porcentaje de genes diferencialmente expresados

Para analizar el transcriptoma de los nódulos GGT/KRT19-positivos con precisión, utilizamos MDL para obtenerlos (**Figura 10C**). Todas las muestras microdisectadas, provenientes de tres ratas del grupo NL, cuatro ratas de 12 W y cuatro ratas del grupo 18 W se sometieron a secuenciación de ARN (RNA-Seq) como se describe

en materiales y métodos. Primero, se realizó un análisis de expresión global. El análisis de componentes principales (ACP) (**Figura 11A**) mostró dos grupos de muestras; el primer grupo formado por muestras *NL* ubicadas en un extremo del gráfico, el otro grupo de muestras formado por nódulos GGT/KRT19-positivos de *12 W* y *18 W*, ubicado al otro extremo del gráfico. Esta distribución de datos en el gráfico mostró la diferencia en la expresión génica entre los nódulos GGT/KRT19-positivos y los tejidos *NL*. El componente principal 1 (CP1) contribuyó a la distribución de datos con 43.65 %, el CP2 con 10.15 % y CP3 con 8.17 %. El dendograma muestra un agrupamiento jerárquico e ilustra cómo los nódulos positivos GGT/KRT19-positivos provenientes de hígados de *12 W* y *18 W* se agruparon entre sí a diferencia de las muestras *NL* (**Figura 11B**). Posteriormente, se analizó la expresión diferencial de genes considerando como referencia común el grupo *NL*. Se encontraron 585 GDE en nódulos *12 W* y 632 GDE en nódulos *18 W* (**Figura 11C**). Interesantemente, el diagrama de Venn ilustra 438 GDE que se compartieron entre los nódulos *12 W* y *18 W*, lo que representa el 56.2 % del total de los GDE (**Figura 11D**). El alto porcentaje de GDE compartidos entre nódulos *12 W* y *18 W* indica una alta similitud en el perfil de expresión génica y sugiere que puede estar estrechamente asociada con nódulos que comparten un fenotipo GGT/KRT19-positivo.

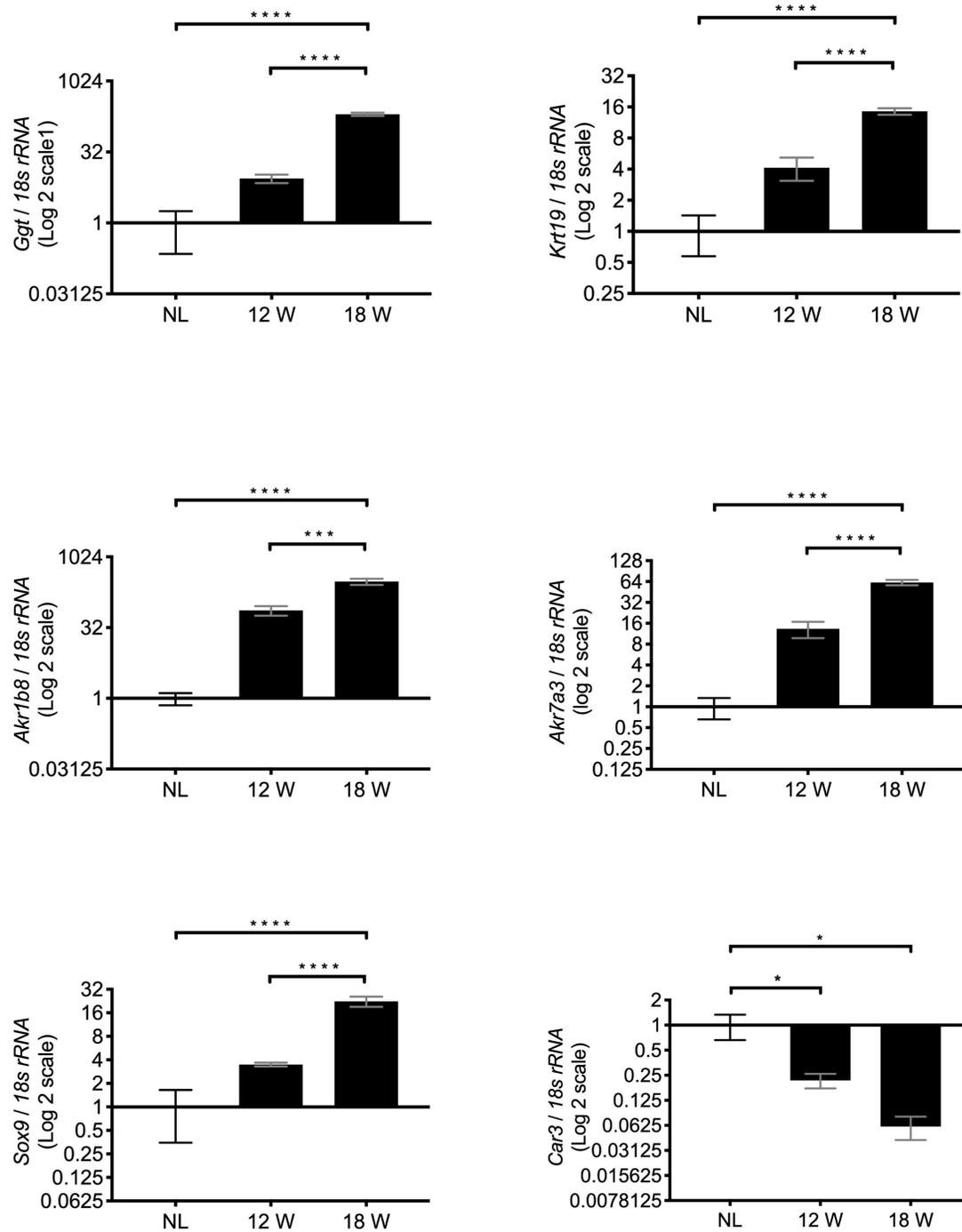


**Figura 11. Análisis de expresión global y diferencial de nódulos 12 W y 18 W, GGT/KRT19-positivos.** A) Análisis de componentes principales; NL en magenta, nódulos 12 W en azul, nódulos 18 W en verde. B) Agrupamiento jerárquico de muestras secuenciadas. C) Genes diferencialmente expresados en nódulos 12 W y 18 W; en verde genes subregulados y en rojo genes sobrerregulados. D) Diagrama de Venn que ilustra los GDE compartidos entre nódulos 12 W y 18 W y GDE exclusivos para cada tipo de nódulo. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

Los perfiles de expresión de nódulos GGT/KRT19-positivos son comparables con CHC de origen humano

Para la validación a través de RT-qPCR de los datos de secuenciación, se seleccionaron cinco genes ya descritos como marcadores para CHC (*Ggt1*, *Krt19*, *Akr1b8*, (gen ortólogo de *AKR1B10* en el humano), *Akr7a3*, *Sox9*) y *Car3* como el gen con el nivel más bajo de ARNm según el análisis de expresión diferencial (**Figura 12**). *Ggt1*, *Krt19*, *Akr1b8*, *Akr7a3* y *Sox9* presentaron una clara tendencia a la sobrerregulación en nódulos 12 W con más de 4 veces de cambio (FC, fold change) respecto del NL (8.79 FC, 4.12 FC, 74.40 FC, 13.30 FC y 3.49 FC,

respectivamente) y mostraron un aumento estadísticamente significativo en los nódulos 18 W (201.79 FC  $p \leq 0.0001$ , 14.48 FC  $p \leq 0.0001$ , 305.45 FC  $p \leq 0.0001$ , 61.96 FC  $p \leq 0.0001$  y 22.42 FC  $p \leq 0.0001$ , respectivamente). La subregulación de *Car3* fue estadísticamente significativa en los nódulos 12 W y 18 W (0.21 FC y 0.06 FC  $p \leq 0.05$ , respectivamente) en comparación con el grupo *NL*.



**Figura 12. Expresión relativa de marcadores de CHC.** La expresión relativa de los genes fue normalizada con los valores de expresión de *rRNA 18s*, el valor de *p* fue con base en los valores de NL: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM.  $n=4$ . Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

## Comparación del impacto clinicopatológico de los genes de interés utilizando datos de transcriptoma de CHC del TCGA

Para hacer una asociación entre los perfiles de expresión de los nódulos GGT/KRT19-positivos y la significancia clínica, comparamos los datos de expresión con la base de datos de sobrevida de TCGA, de acuerdo con los niveles de expresión los genes en CHCs humanos. La **tabla 4** muestra que la alta expresión de *Ggt1*, *Akr1b8*, y *Sox9* está asociada a un pronóstico desfavorable en la sobrevida de los pacientes con CHC, mientras que la alta expresión del gen *Car3* está asociada a un pronóstico favorable en CHCs humanos. Por lo que, los perfiles de expresión de genes en nódulos GGT/KRT19-positivos de hígados *12 W* y *18 W* son comparables con CHCs humanos de mal pronóstico.

**Tabla 4.** Marcadores de CHC y valores de expresión provenientes de datos de RNA-Seq en los nódulos 12 W y 18 W GGT/KRT19-positivos y referencias que los describen como marcadores de CHC.

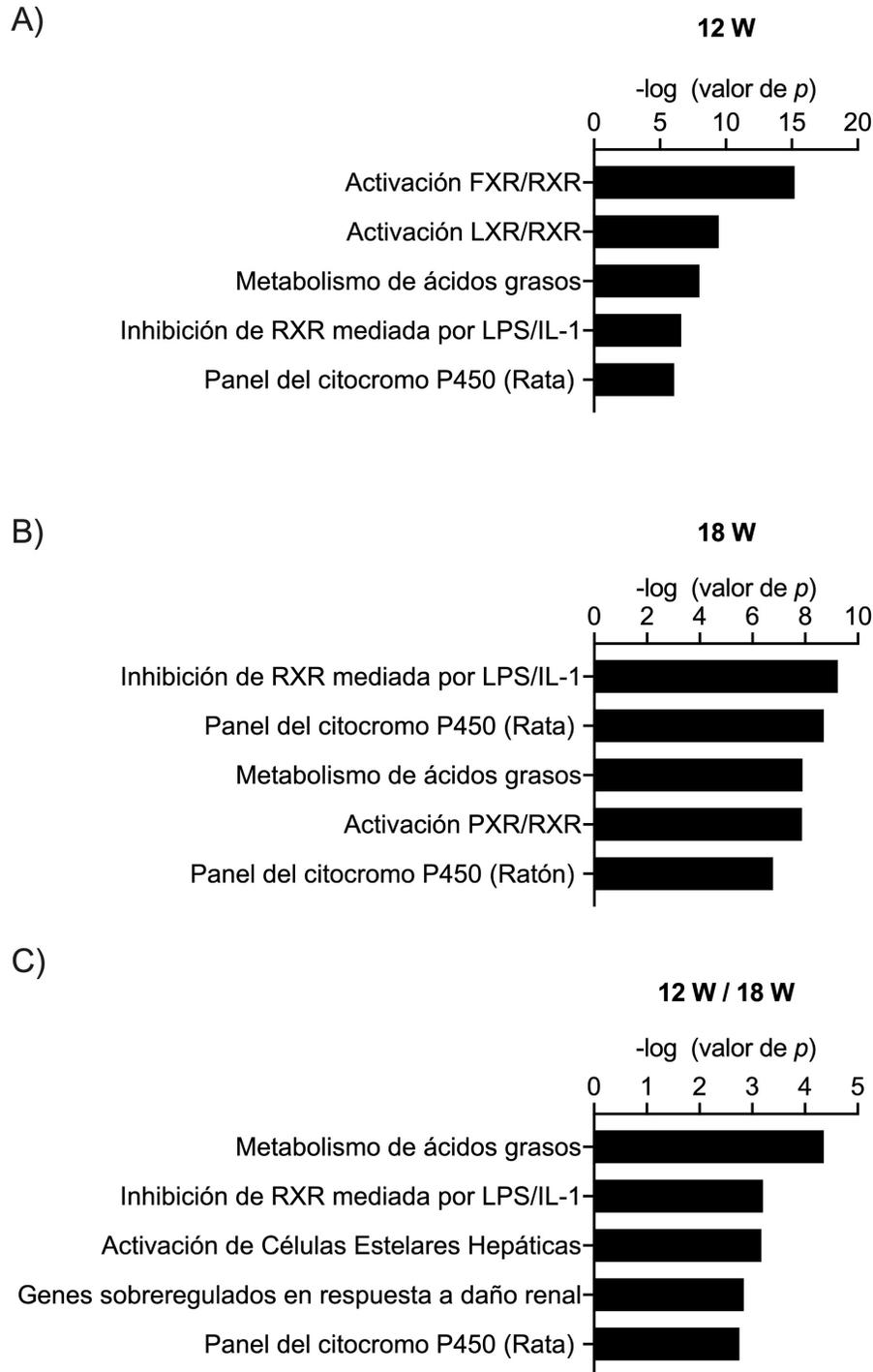
Marcador de CHC	12 W Log2 FC	Valor de $p$	FDR	18 W Log2 FC	Valor de $p$	FDR	Pronóstico sobrerregulación (TCGA)	Valor de $p$ (TCGA)
<i>Ggt1</i>	1.92	2.52E-01	9.95E-01	2.98	6.48E-02	5.52E-01	Desfavorable	0.0056
<i>Krt19</i>	1.82	3.08E-01	9.95E-01	0.06	9.72E-01	9.94E-01	NA	0.23
<i>Akr1b8</i>	5.19	8.00E-05	3.76E-03	5.11	1.08E-04	4.41E-03	Desfavorable	0.0022
<i>Akr7a3</i>	3.96	1.43E-03	3.83E-02	3.74	2.76E-03	6.15E-02	NA	NA
<i>Sox9</i>	4.51	8.78E-04	2.62E-02	4.64	6.13E-04	1.85E-02	Desfavorable	0.0043
<i>Car3</i>	-6.06	5.33E-14	2.98E-11	-7.15	7.93E-12	2.76E-09	Favorable	0.036

NA = Dato no Disponible.

Los nódulos GGT/KRT19-positivos muestran desregulación en los genes asociados a la función del RXR y en la vía NRF2

Para explorar las vías metabólicas desreguladas en los nódulos GGT/KRT19-positivos, analizamos las interacciones de los GDE utilizando la herramienta Ingenuity Pathway Analysis (IPA). En los nódulos 12 W, las cinco principales vías desreguladas fueron la activación de FXR / RXR, la activación de LXR / RXR, el metabolismo de ácidos grasos, la inhibición de la función RXR mediada por LPS / IL-1 y el panel del citocromo P450 (**Figura 13A**). En los nódulos 18 W, las vías desreguladas fueron la inhibición de la función RXR mediada por LPS / IL-1, el panel del citocromo P450, el metabolismo de los ácidos grasos y la activación de PXR / RXR (**Figura 13B**). La intersección de los 438 GDE compartidos entre nódulos de 12 W y 18 W muestra genes asociados con el tiempo de progresión tumoral de nódulos GGT/KRT19-positivos. Las vías metabólicas que resultaron estar enriquecidas en esta intersección fueron el metabolismo de los ácidos grasos, seguida de la inhibición de RXR $\alpha$  mediada por LPS / IL-1, genes regulados en respuesta a insuficiencia renal crónica y panel del citocromo P450. Interesantemente, la activación de CEH, resultó estar desregulada en la asociación temporal de la progresión tumoral (**Figura 13C**). Este resultado llamó nuestra atención porque esta vía sólo se presentó en la intersección de los 438 GDE, y la deposición de colágenas tipo I y III corrobora este descubrimiento. La **Tabla 5** muestra los genes implicados en las cinco vías desreguladas, según los 438 GDE compartidos, y el pronóstico de supervivencia según TCGA de acuerdo con la alta expresión de ARNm en CHC humanos. De esto se destaca que diez de los genes con baja expresión en los nódulos experimentales se asocian con un pronóstico favorable en los CHCs de los pacientes. Esto en contraste con el gen *Abcc3*, que presentó una elevada expresión en los nódulos experimentales, y su elevada expresión está asociada a un pronóstico desfavorable en los pacientes con CHC. Además, medimos la expresión relativa de *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1*, ya que están implicados en la función del RXR, la cual se mostró constantemente desregulada en los nódulos GGT/KRT19-positivos. La subregulación de estos tres genes está relacionada con resultados desfavorables en los pacientes con CHC (**Tabla 5**). Es

de destacar que RXR $\alpha$  es la forma más frecuente de la familia de RXR en el hígado (97) y una de sus funciones es regular negativamente la activación de NRF2. De manera esperada, encontramos la vía de NRF2 desregulada en datos adicionales del análisis de IPA de los nódulos GGT/KRT19-positivos (**Figura 14**) Junto con los genes ya validados, *Akr1b8* y *Akr7a3* (**Figura 12**), *Gstp1*, *Abcc3*, *Ptgr1* y *Txnrd1* son genes blanco de NRF2 y se consideran marcadores de CHC (98–101).



**Figura 13. Principales cinco vías metabólicas desreguladas en nódulos GGT/KRT19-positivos.**

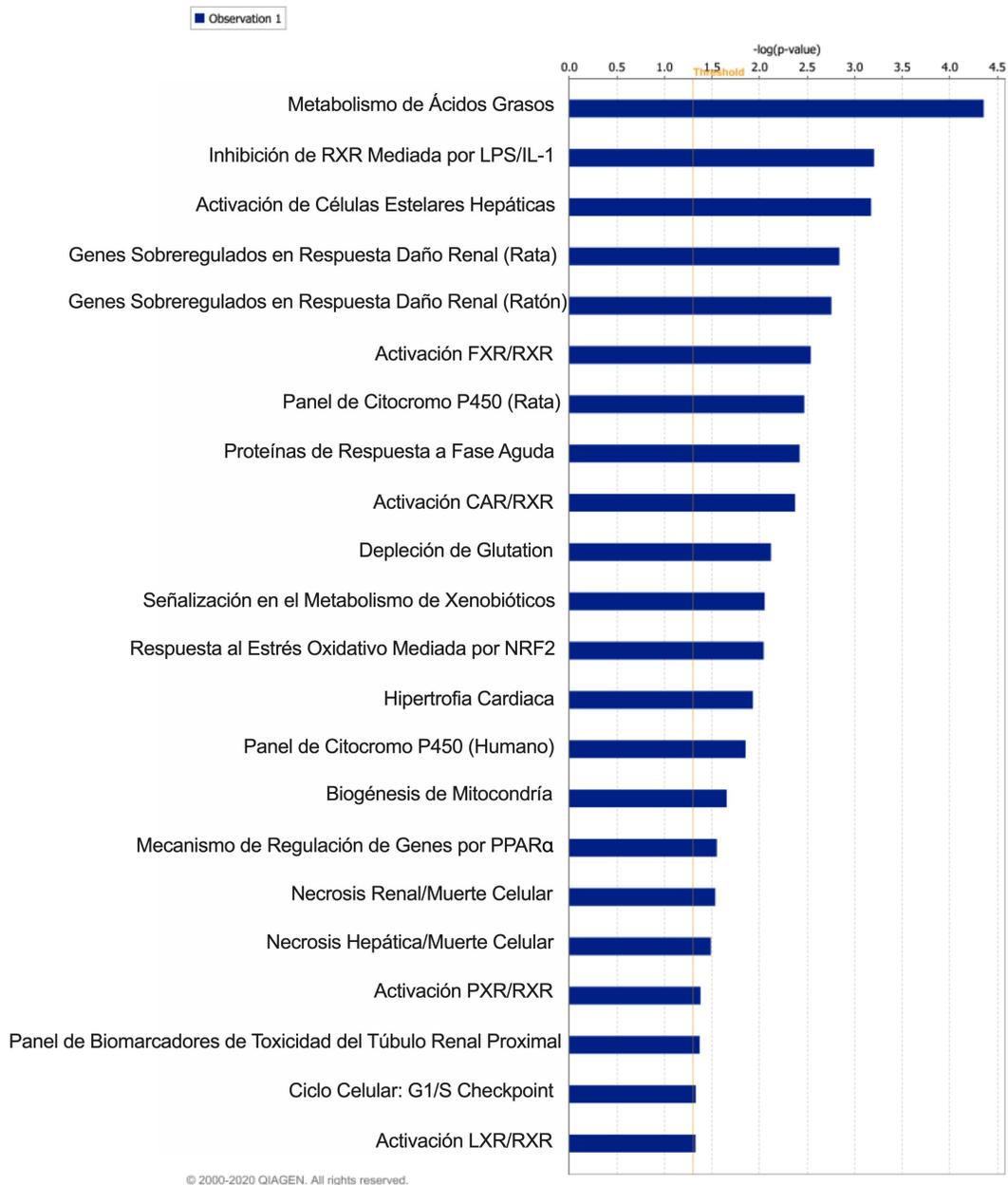
Los genes que se sometieron al análisis de enriquecimiento fueron para: A) los GDE de los nódulos 12 W, para B) los GDE de los nódulos 18 W y para C) los 438 GDE compartidos entre 12 W y 18 W. El valor de  $p$  se muestra como  $-\log$ .  $n=4$ . Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

**Tabla 5.** Cinco principales vías metabólicas desreguladas en nódulos 12 W y 18 W, GGT/KRT19-positivos. Los valores de expresión provienen de los datos de RNA-Seq.

Vía metabólica	Valor de $p$ (IPA)	Gen	12 W Log2 FC	18 W Log2 FC	Pronóstico sobrerregulación (TCGA)	Valor de $p$ (TCGA)
<b>Metabolismo de ácidos grasos</b>	<b>4.41E-05</b>	<i>Acs11</i>	-3.51	-3.07	Favorable	0.0018
		<i>Cyp2e1</i>	-3.84	-3.54	Favorable	0.0029
		<i>Slc27a5</i>	-3.25	-3.30	Favorable	0.001
		<i>Adh1</i>	2.31	2.38	Favorable	0.00024
		<i>Adhfe1</i>	4.59	3.59	Favorable	0.001
		<i>Cyp2a2</i>	-4.77	-5.82	NA	
		<i>Cyp2c9</i>	-6.28	-6.09	Favorable	0.001
		<i>Cyp4a22</i>	-5.89	-4.34	Favorable	0.0029
<b>Inhibición de la función de RXR mediada por LPS/IL</b>	<b>6.27E-04</b>	<i>Slc27a5</i>	-3.25	-3.30	Favorable	0.001
		<i>Cyp2a2</i>	-4.77	-5.82	NA	
		<i>Cyp2e1</i>	-3.84	-3.54	Favorable	0.0029
		<i>Cyp4a22</i>	-5.89	-4.34	Favorable	0.0029
		<i>Fabp1</i>	-4.22	-3.51	Favorable	0.055
		<i>Cyp2c9</i>	-6.29	-6.09	Favorable	0.001
		<i>Hmgcs2</i>	-2.97	-2.59	Favorable	0.001
		<i>Abcc3</i>	3.20	2.86	Desfavorable	0.0074
		<i>Acs11</i>	-3.51	-3.07	Favorable	0.0018
		<i>Gstp1</i>	4.77	5.268	Favorable	0.33
<i>*Rxra</i>	-1.03	-0.80	Favorable	0.15		
<b>Activación de células estelares</b>	<b>6.72E-04</b>	<i>Igf1</i>	-2.81	-2.86	Favorable	0.0016
		<i>Cyp2e1</i>	-3.83	-3.54	Favorable	0.0029
		<i>Pdgfa</i>	1.67	1.84	Desfavorable	0.0026
		<i>Pdgfrb</i>	-4.74	-6.47	Desfavorable	0.10
<b>Genes sobrerregulados en respuesta al daño renal crónico (Rata)</b>	<b>1.45E-03</b>	<i>Slco1a2</i>	-3.65	-5.10	Desfavorable	0.076
		<i>Abcc3</i>	3.20	2.86	Desfavorable	0.0074

<b>Panel del citocromo P450 (Ratón)</b>	<b>1.76E-03</b>	<i>Cyp2e1</i>	-3.84	-3.54	Favorable	0.0029
		<i>Cyp2c9</i>	-6.29	-6.09	Favorable	0.001
		<i>Cyp2a2</i>	-4.77	-5.82	NA	

\*Gen no sometido al analisis por IPA. NA = Dato no disponible.

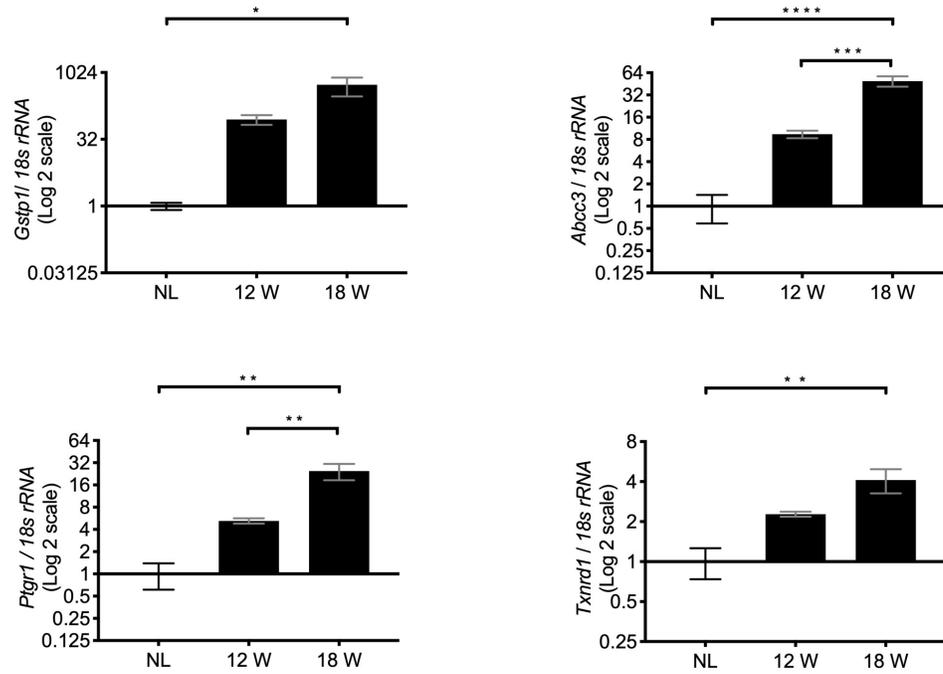


**Figura 14. Vías desreguladas asociadas a los 438 GDE vinculados al tiempo de progresión tumoral.** Los genes que se analizaron con la herramienta IPA fueron los 438 GDE, compartidos entre nódulos 12 W y 18 W. El valor de  $p$  se muestra como  $-\log$ .  $n=4$ . Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

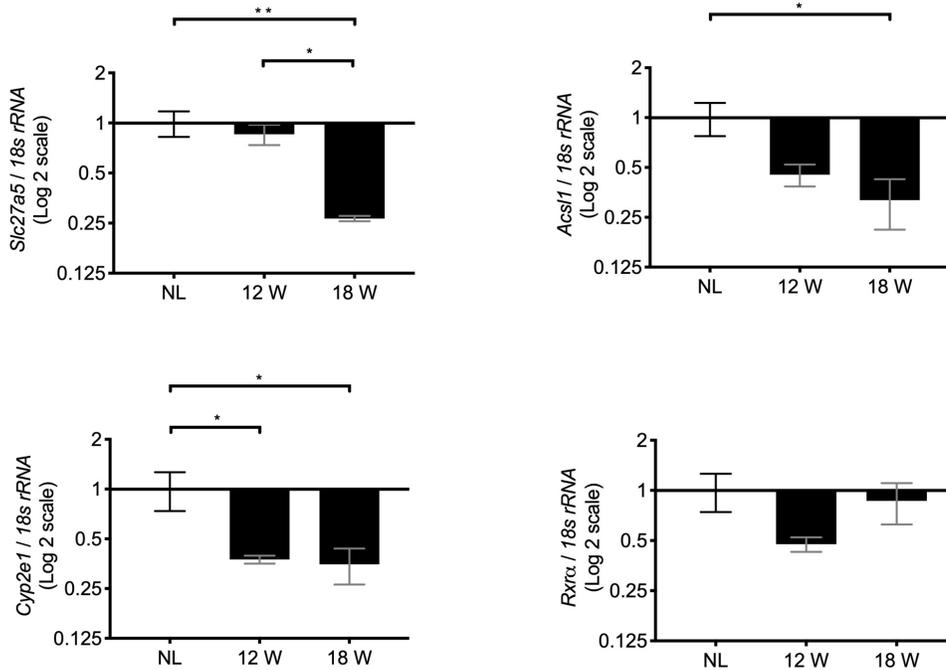
En nódulos con un fenotipo GGT/KRT19-positivo, las vías de NRF2 y RXR $\alpha$  están desreguladas

Para confirmar la desregulación de la función del RXR $\alpha$  y la vía de NRF2 en nódulos GGT/KRT19-positivos medimos los cambios de expresión de genes blanco de NRF2, como *Gstp1*, *Abcc3*, *Ptgr1*, y *Txnrd1* mediante RT-qPCR (**Figura 15A**). Mientras que, en 12 W se registró una tendencia a la sobrerregulación (89 FC, 9 FC, 5 FC y 2 FC, respectivamente) en nódulos 18 W la sobrerregulación fue estadísticamente significativa (540 FC,  $p \leq 0.05$ , 49 FC,  $p \leq 0.0001$ , 24 FC,  $p \leq 0.01$  y 4 FC,  $p \leq 0.01$ , respectivamente). Además, se corroboró la regulación a la baja de genes implicados en la función de RXR $\alpha$  como *Slc275*, *Acs11*, y *Cyp2e1*. Los dos primeros genes mostraron disminución estadísticamente significativa en los nódulos 18 W 0.2 FC,  $p \leq 0.01$  y 0.3 FC,  $p \leq 0.05$  respectivamente y *Cyp2e1* mostró una diferencia estadísticamente significativa en los nódulos 12 W y 18 W (0.3 FC,  $p \leq 0.05$ ), RXR $\alpha$  tuvo una tendencia hacia la subregulación sin ser estadísticamente significativo (0.4 FC en 12 W y 0.8 FC en 18 W) (**Figura 15B**), lo que fue congruente con los datos de RNA-Seq (**Tabla 5**). Estos resultados corroboraron la activación de la vía NRF2 y la regulación a la baja de *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1*, genes implicados en la función RXR $\alpha$ .

A)



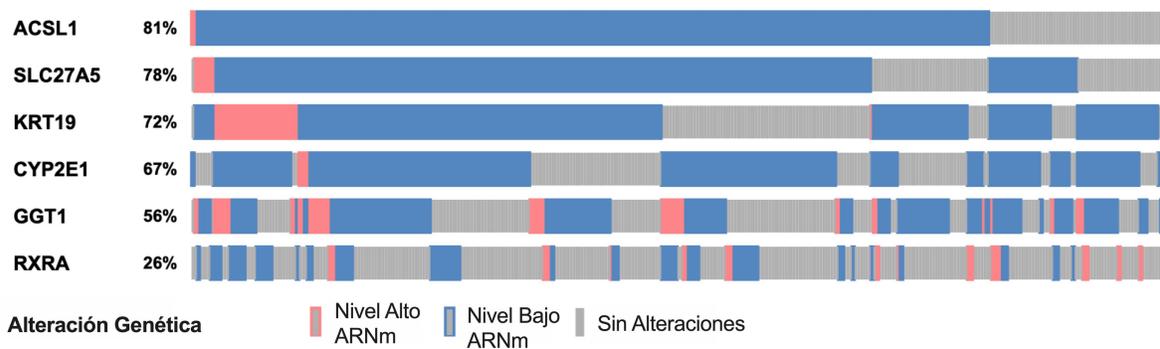
B)



**Figura 15. Expresión relativa de genes implicados en la función RXR y en la vía de NRF2.** A) RT-qPCR de genes blanco de NRF2 y B) RT-qPCR de genes implicados en la función de RXR. Los datos se normalizaron con los valores de expresión de *rRNA 18s* y se compararon con *NL*. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  comparado con *NL*.  $n = 4$ . Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

Los CHCs de origen humano con sobreexpresión de *KRT19*, tienden a expresar niveles bajos de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1*, y *RXRα*

Aquí, realizamos un análisis de co-expresión, para explorar la relación de genes clave desregulados en CHC de Rata con aquellos en CHC humano que expresan niveles altos de ARNm de *GGT1* o *KRT19*. Así que analizamos los datos de expresión de genes provenientes de 366 muestras de CHC de origen humano, obtenidos de la base de datos de TCGA. Es de destacar que, 363 muestras (99%) de las 366, mostraron alteraciones en los niveles de ARNm de cualquiera de los seis genes analizados; *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1*, *RXRα*, *GGT1* o *KRT19* (**Figura 16**). La frecuencia de alteración del gen *ACSL1* fue de 81 %, es decir, 297 muestras de CHC, de las cuales 296 presentaron subregulación del gen. El gen *SLC27A5* estuvo alterado en 285 muestras de CHC (78 %), de las cuales, 278 presentaron subregulación y sólo siete sobreexpresión. Niveles bajos de ARNm de *KRT19* fueron observados en 230 muestras y niveles altos del transcrito se observaron en 33 muestras (frecuencia de alteración: 72 %) de las cuales, 32 muestras también mostraron niveles bajos en los transcritos de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1* y *RXRα* (**Figura 16**). Coincidentemente, el análisis de co-expresión, reveló que los pares de genes que eran significativamente excluyentes entre sí eran *CYP2E1/KRT19*,  $p = 0.006$  y *SLC27A5/KRT19*,  $p = 0.018$ . *RXRα/KRT19* mostraron una clara tendencia hacia la exclusión mutua,  $p = 0.055$  (**Tabla 6**). Este análisis también mostró que los pares de genes con una co-expresión estadísticamente significativa fueron *SLC27A5/ACSL1*,  $p < 0.001$ ; *SCL27A5/CYP2E1*,  $p < 0.001$ ; *CYP2E1/RXRα*,  $p < 0.001$ ; *SLC27A5/RXRα*,  $p = 0.003$ ; y *GGT1/KRT19*,  $p = 0.004$ . (**Tabla 6**). En conjunto, estos datos sugieren que la función del *RXRα*, está comprometida, dada la subregulación de genes implicados en ella específicamente *Slc27a5*, *Acs1*, *Cyp2e1* y *RXRα*, lo que es un evento temprano que ocurre en nódulos GGT/KRT19-positivos, y esta disfunción del *RXRα* puede estar implicada en la activación de la vía de NRF2.



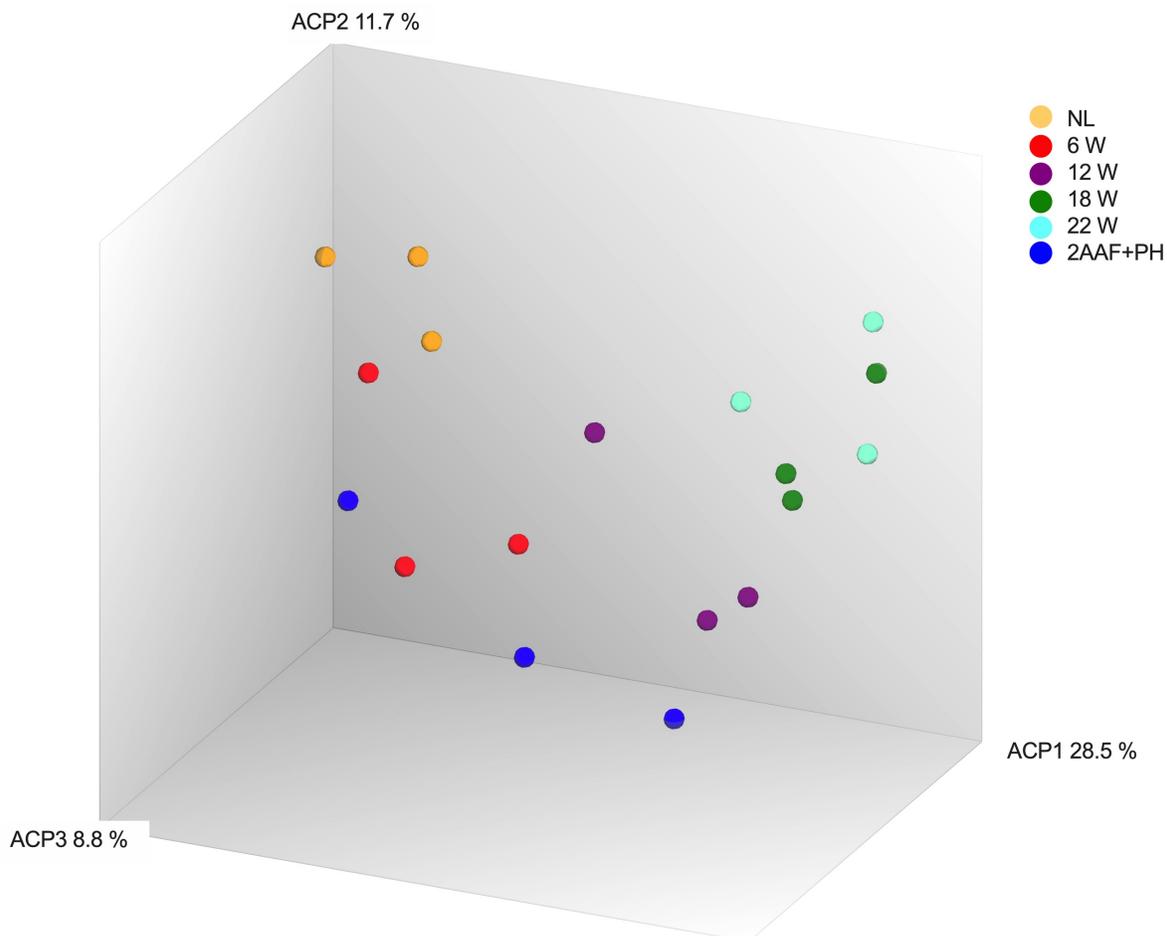
**Figura 16. Co-expresión de *SLC27A5*, *ACSL1* y *CYP2E1* en CHC humanos positivos *GGT* o *KRT19* positivos.** Mapa de calor de 363 muestras de CHC de origen humano que presentaron alteraciones en los niveles de ARNm de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1*, *RXR $\alpha$* , *GGT* o *KRT19*. Cada columna representa una muestra de CHC; las celdas rojas corresponden a un nivel alto de ARNm, las celdas azules a un nivel bajo de ARNm y las celdas grises corresponden a una muestra sin alteraciones en el nivel de ARNm. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

**Tabla 6.** Análisis de exclusión mutua. El análisis evaluó 15 pares entre los seis genes del mapa de calor

A	B	Ninguno	A pero no B	B pero no A	Ambos	Log2 razón de probabilidades	Valor de $p$	Valor de $q$	Tendencia
<i>SLC27A5</i>	<i>ACSL1</i>	36	33	45	252	2.611	< 0.001	<0.001	Co-expresión
<i>SLC27A5</i>	<i>CYP2E1</i>	40	79	41	206	1.347	< 0.001	0.002	Co-expresión
<i>CYP2E1</i>	<i>RXR<math>\alpha</math></i>	101	171	18	76	1.318	< 0.001	0.004	Co-expresión
<i>SLC27A5</i>	<i>RXR<math>\alpha</math></i>	70	202	11	83	1.387	0.003	0.010	Co-expresión
<i>GGT1</i>	<i>KRT19</i>	57	46	104	159	0.922	0.004	0.013	Co-expresión
<i>CYP2E1</i>	<i>KRT19</i>	23	80	96	167	-1.000	0.006	0.015	Mutuamente excluyentes
<i>SLC27A5</i>	<i>KRT19</i>	15	88	66	197	-0.975	0.018	0.039	Mutuamente excluyentes
<i>RXR<math>\alpha</math></i>	<i>KRT19</i>	70	33	202	61	-0.643	0.055	0.104	Mutuamente excluyentes
<i>SLC27A5</i>	<i>GGT1</i>	30	131	51	154	-0.532	0.096	0.160	Mutuamente excluyentes
<i>ACSL1</i>	<i>RXR<math>\alpha</math></i>	55	217	14	80	0.534	0.162	0.233	Co-expresión
<i>CYP2E1</i>	<i>GGT1</i>	48	113	71	134	-0.319	0.194	0.233	Mutuamente excluyentes
<i>ACSL1</i>	<i>KRT19</i>	16	87	53	210	-0.457	0.194	0.233	Mutuamente excluyentes
<i>ACSL1</i>	<i>CYP2E1</i>	19	100	50	197	-0.418	0.202	0.233	Mutuamente excluyentes
<i>RXR<math>\alpha</math></i>	<i>GGT1</i>	122	39	150	55	0.198	0.329	0.352	Co-expresión
<i>ACSL1</i>	<i>GGT1</i>	29	132	40	165	-0.142	0.411	0.411	Mutuamente excluyentes

## Regulación de la función de RXR $\alpha$ mediada por microRNAs: análisis de expresión de microRNAs en el modelo de cirrosis y cáncer

Con el fin de identificar microRNAs con un posible rol en la regulación de la función del RXR $\alpha$ , se extrajo ARN de extracto de tejidos hepáticos totales y mediante microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad sintetizados *in situ* (Gene Chip Rat Gene 2.0 ST array, affymetrix), se analizaron los perfiles de expresión de microRNAs en las diferentes etapas del modelo de cirrosis y cáncer; 6W (donde la cirrosis no está establecida) 12 W (cirrosis), 18 W (CHC multinodular más cirrosis), 22 W CHC avanzado. Además, se analizó el perfil de expresión de microRNAs del modelo 2AAF+PH para determinar si los MDE en las diferentes etapas del modelo de cirrosis y cáncer se expresan, también, de manera diferencial en poblaciones celulares progenitoras hepáticas. La comparación entre tipos de muestras y la expresión global de los microRNAs se observa en un ACP (**Figura 17**). Como lo muestra el gráfico, la expresión global de los microRNAs se agrupó de acuerdo con la semana de tratamiento en el modelo de cirrosis y cáncer e incluso se puede observar un acomodo progresivo (de izquierda a derecha) de las muestras de acuerdo con la semana de tratamiento; en el extremo izquierdo los *NL* en amarillo, seguidos por los 6 W en rojo, 12 W en morado, hasta llegar a un grupo formado por 18 W y 22 W (colores verde y turquesa, respectivamente) en el extremo derecho (**Figura 17**). En azul marino, las muestras provenientes del modelo 2AAF+PH, se distribuyeron a lo largo y en la parte inferior del gráfico. El ACP1 contribuyó con 28.5% en la distribución de los datos, el ACP2 con 11.7% y el ACP3 con 8.8%. Estos resultados muestran que los perfiles de expresión de microRNAs presentan un patrón progresivo que corresponde a las diferentes etapas carcinogénicas en el modelo de cirrosis y cáncer, mientras que el perfil de expresión de microRNAs proveniente del modelo 2AAF+PH no se combina con los perfiles de expresión de ninguno de los grupos experimentales del modelo de cirrosis y cáncer.

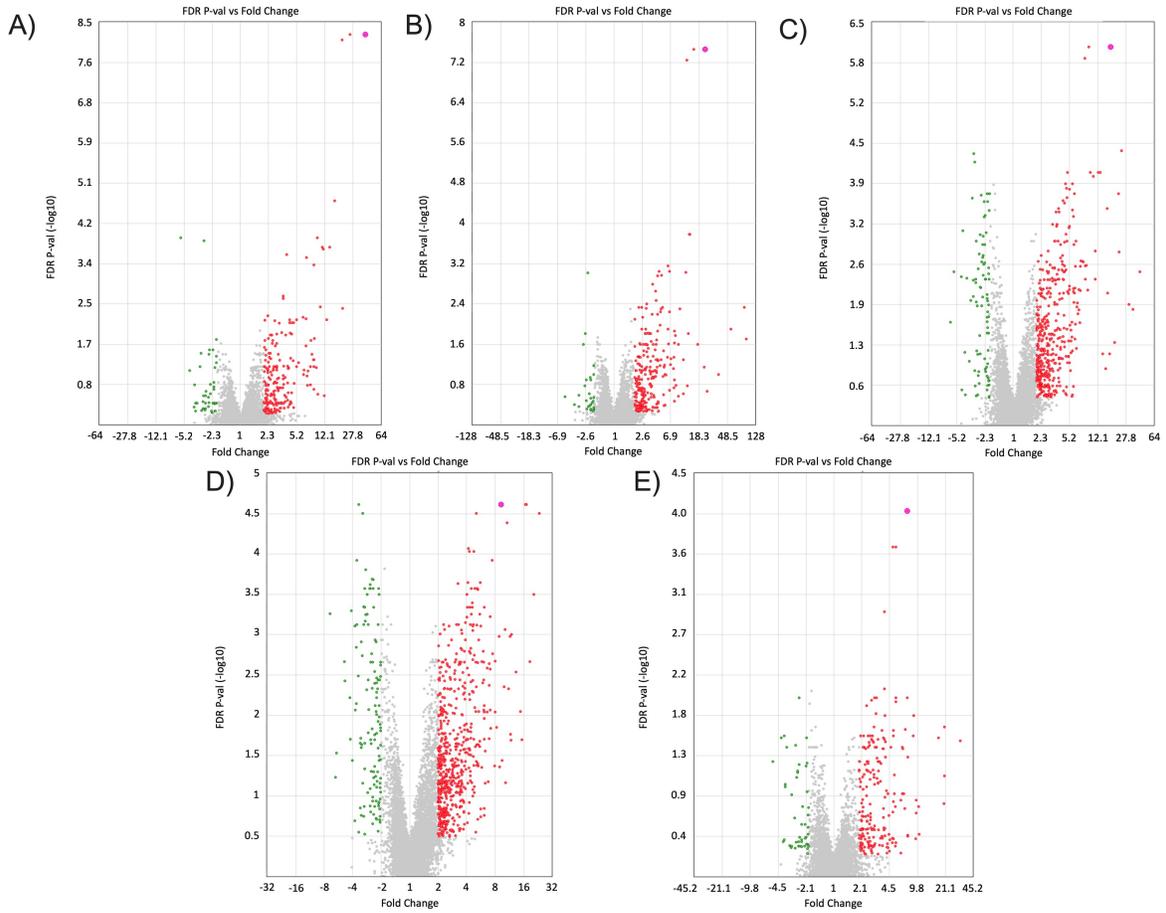


**Figura 17. Distribución de muestras de acuerdo con la expresión global de microRNAs en el modelo de cirrosis y cáncer.** Análisis de componentes principales. En amarillo se observan las muestras provenientes de hígados *NL*, en rojo hígados *6 W*, en morado, hígados *12 W*, en verde hígados *18 W*, en color turquesa, muestras provenientes de hígados *22 W* y en azul marino muestras provenientes del modelo de inducción de células progenitoras (*2AAF+PH*).

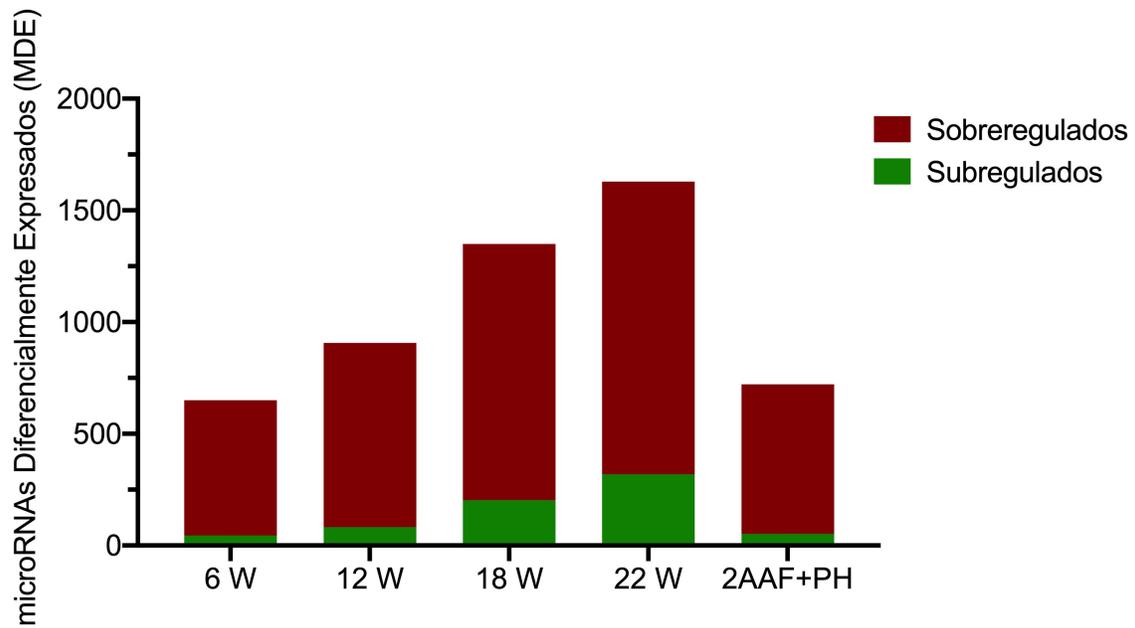
La expresión diferencial de microRNAs aumenta a lo largo del modelo de cirrosis y cáncer

Posterior a la normalización de datos se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial de los microRNAs considerando como referencia en común la expresión de los microRNAs del grupo *NL*. El punto de corte para considerar una expresión diferencial de microRNAs fue una razón de cambio  $\leq -2$  para la subregulación y  $\geq 2$  para la sobreexpresión y la condición de un valor de  $p \leq 0.05$ . En los gráficos de volcán se muestran los perfiles de expresión de las muestras provenientes de las

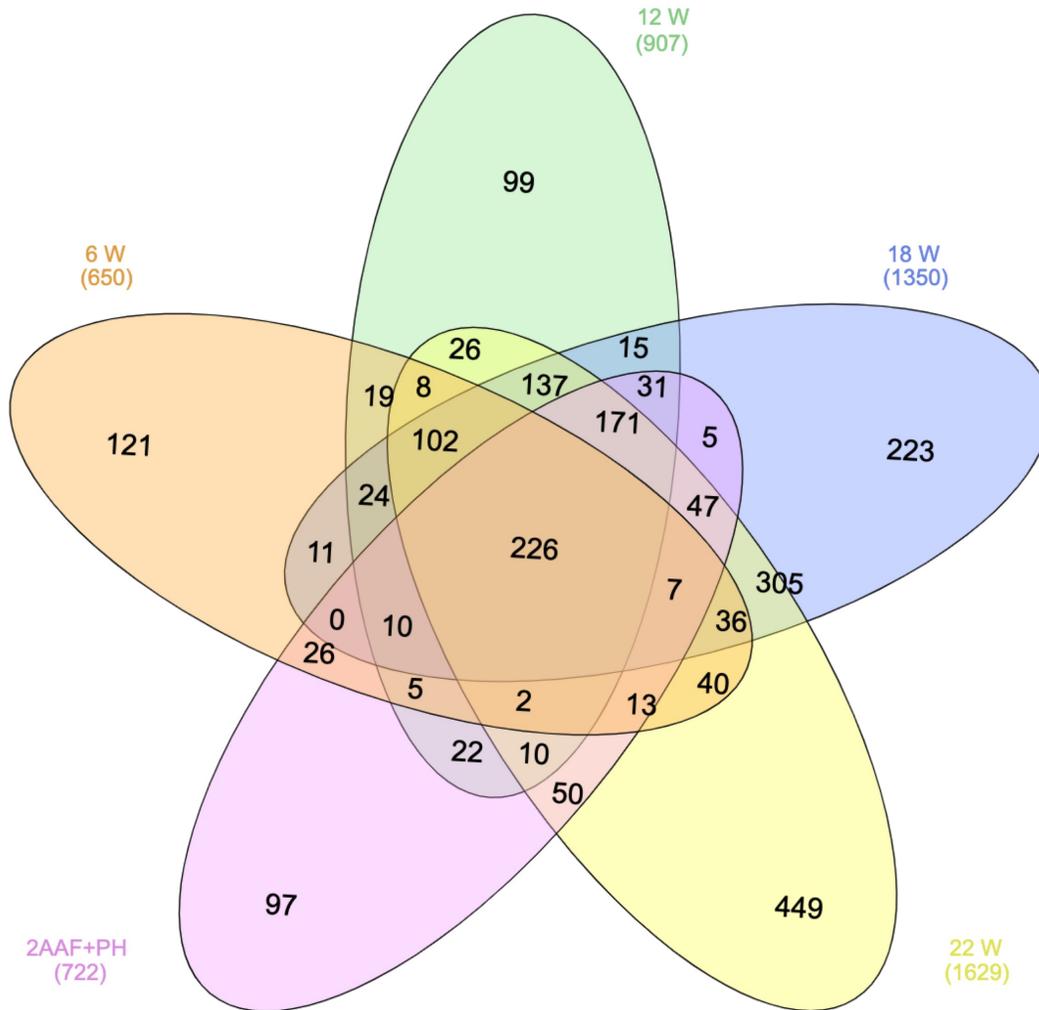
diferentes semanas de tratamiento del modelo de cirrosis y cáncer y el modelo 2AAF+PH (**Figura 18**); en los hígados 6 W se encontraron 650 MDE; 45 subregulados (en verde) y 605 sobre regulados (rojo), en los hígados 12 W, 907 MDE; 82 sub regulados y 825 sobre regulados, en los hígados 18 W 1350 MDE; 203 subregulados y 1147 sobrerregulados, en los hígados 22 W se encontraron 1629 MDE; 319 subregulados y 1310 sobrerregulados y en los hígados 2AAF+PH se encontraron 722 MDE; 670 sobrerregulados y 52 subregulados (**Figura 18 y 19**). Tanto en los gráficos de volcán como en el gráfico de barras, es notable el aumento en la cantidad de MDE a lo largo de las diferentes etapas carcinogénicas de modelos de cirrosis y cáncer. Posteriormente se observó el comportamiento de los MDE en todos los grupos experimentales. Como se observa en el diagrama de Venn (**Figura 20**), la intersección con menor cantidad de transcritos compartidos fue 6 W y 2AAF+PH, sin embargo, dichos grupos experimentales fueron los que presentaron menor cantidad MDE. Como era de esperarse, la intersección más numerosa fue la que se presentó en los grupos experimentales que se agruparon entre sí desde el ACP y los que son de etapas tumorales en el modelo de cirrosis y cáncer; 18 W con 22 W. Estos resultados muestran cómo la cantidad MDE aumenta a lo largo del proceso carcinogénico del modelo de cirrosis y cáncer.



**Figura 18. Gráficos de volcán.** Los gráficos ilustran los perfiles de expresión de microRNAs provenientes de hígados sometidos al modelo de cirrosis y cáncer. Los puntos rojos, representan microRNAs sobreexpresados, los puntos verdes, microRNAs subexpresados.



**Figura 19. Gráfica de columna con MDE.** La gráfica ilustra que la cantidad de MDE aumenta conforme a las semanas de tratamiento en el modelo de Cirrosis y Cáncer. En el modelo de 2AAF+PH la cantidad de MDE es similar a hígados 6 W. Los MDE sobrerregulados se graficaron en rojo y los MDE subregulados se graficaron en verde.



**Figura 20. Diagrama de Venn.** Se ilustran los MDE en común entre los hígados provenientes de ratas tratadas en las diferentes semanas de tratamiento en el modelo de Cirrosis y Cáncer, así como en el modelo de 2AAF+PH.

*Acs1* y *Cyp2e1* son blancos de microRNAs diferencialmente expresados en el modelo de Cirrosis y Cáncer

Con el fin de establecer una relación entre los MDE y los genes *Slc27a5*, *Acs1*, *Cyp2e1* o *RXR $\alpha$* , subregulados en los nódulos GGT/KRT19-positivos, se realizó una búsqueda supervisada, en las bases de datos *miRNet* y *miRTarBase*, de los microRNAs que tienen como blancos validados experimentalmente a cualquiera de los genes anteriores, (**Tabla 7**). En los hígados 6 W, se identificaron de manera

sobrerregulada tres microRNAs; rno-miR-132-3p (11.15 FC  $p=1.33E-06$ ), rno-mir-212-3p (7.34 FC  $p=0.0044$ ) que tienen como gen blanco a *Cyp2e1*, y el microRNA rno-miR-34a-5p (25.55 FC  $p=2.48E-12$ ) que tiene como gen blanco a *Acs11*. En los hígados 12 W, se encontraron sobrerregulados los mismos microRNAs; rno-miR-132-3p (13.55 FC  $p=9.71E-07$ ), rno-mir-212-3p (5.49 FC  $p=0.0042$ ) y rno-miR-34a-5p (15.81 FC  $p=1.10E-11$ ). En los hígados 18 W y 22 W, la sobrerregulación de los tres microRNAs se mantuvo; rno-miR-34a- (9.59 FC  $p=1.75E-10$ , 5.27 FC  $p=8.94E-09$ , respectivamente) rno-miR-132-3p (12.29 FC  $p=7.86E-07$ , 15.05 FC  $p=1.63E-07$ , respectivamente), rno-miR-212-3p (6.63 FC  $p=0.0014$ , 14.42 FC  $p=0.0001$ , respectivamente). De manera interesante, los tres microRNAs se encuentran sobre regulados en el modelo de 2AAF+PH; rno-miR-212-3p (2.32 FC,  $p=0.221$ ), rno-miR-132-3p (5.47 FC,  $p=1.99E-05$ ) y rno-miR-34a-5p (5.43 FC,  $p=1.43E-07$ ), lo que indica que la sobre regulación de dichos microRNAs puede estar vinculada a un fenotipo progenitor o a procesos de dediferenciación hepática hacia un fenotipo menos maduro, y en consecuencia la pérdida de la expresión de genes enriquecidos hepatocelulares como son *Cyp2e1* y *Acs11*. En lo que a RXR $\alpha$  respecta, se encontraron dos microRNAs validados experimentalmente que lo regulan; rno-mir-27a-3p y rno-mir-128-3p, sin embargo, así como RXR $\alpha$  no mostró una subregulación estadísticamente significativa, los microRNAs que lo regulan tampoco mostraron una sobrerregulación estadísticamente significativa. Los microRNAs y genes blanco se muestran en la **figura 21**. Estos resultados sugieren, que la regulación de *Cyp2e1* y *Acs11* puede estar mediada también por microRNAs, mientras que la expresión de RXR $\alpha$  parece estar mediada principalmente por la baja disponibilidad de derivados de ácido retinoico en respuesta a la activación de CEH.

**Tabla 7.** MicroRNAs que regulan a *Cyp2e1*, *Acs1*, *Rxr $\alpha$*  y *Sc127a5*. Los valores de expresión provienen de datos de microarreglos.

miRNA	Gen blanco	6 W Log2F C	6 W Valor de <i>p</i>	12 W Log2F C	12 W valor de <i>p</i>	18 W Log2F C	18 W valor de <i>p</i>	22 W Log2F C	22 W valor de <i>p</i>	2AAF Log2F C	2AAF valor de <i>p</i>	Método de validación	Ref.
rno-miR-132-3p	<i>Cyp2e1</i>	11.15	1.33 E-06	13.55	9.71 E-07	12.29	7.86 E-07	15.05	1.63 E-07	5.47	1.99 E-05	EGRL	(102)
rno-mir-212-3p	<i>Cyp2e1</i>	7.34	0.0044	5.49	0.0042	6.63	0.0014	14.2	0.0001	2.32	0.2211	EGRL	(102)
rno-miR-34a-5p	<i>Acs1</i>	25.55	2.48 E-12	15.81	1.10 E-11	9.59	1.75 E-10	5.27	8.94 E-09	5.43	1.43 E-07	ICQ/EGR L/RT-qPCR/W B	(103)
rno-mir-27a-3p	<i>Rxr<math>\alpha</math></i>	1.27	0.047	1.16	0.0371	1.27	0.0276	1.18	0.0233	1.25	0.0795	EGRL	(104)
Rno-mir-128-3p	<i>Rxr<math>\alpha</math></i>	1.96	0.0023	1.37	0.0707	1.72	0.0041	1.45	0.0179	1.14	0.522	EGRL	(105)

3'	accggcacugaccu	CUGACAAu	5'	rno-mir-212-3p
5'	a u c c c u u a a a c u a u	G A C U G U U u	3'	Cyp2e1
3'	gcugguacc	GACAUCUGACAAu	5'	rno-mir-132-3p
5'	u c c c u u a a a C U A U -	G A C U G U U u	3'	Cyp2e1
3'	uguuggucgauucu	GUGACGGu	5'	rno-mir-34a-5p
5'	gcagagggcacggaa	CACUGCCu	3'	Acs1
3'	cgccuugaaucgc	UGACACUU	5'	rno-mir-27a-3p
5'	.....cugugacug	ACUGUGAA	3'	Rxr $\alpha$
3'	uuucucucggCcaAg	UGACACu	5'	rno-mir-128-3p
5'	gccuuccuguGacUg	ACUGUGaa	3'	Rxr $\alpha$

**Figura 21. Regiones donde hibridan los microRNAs que tienen como genes blanco a *Cyp2e1*, *Acs1* y *Rxr $\alpha$* .**

En conjunto, nuestros hallazgos contribuyen a la caracterización transcriptómica de nódulos de CHC GGT/KRT19-positivos. Los tumores con este fenotipo mostraron desregulación en la vía de activación de CEH. La activación de CEH hacia un fenotipo de miofibroblastos coincide con la deposición de colágenas tipo I y tipo III observada. La activación de CEH resulta en la pérdida del reservorio de vitamina A, lo que afecta directamente la activación del RXR $\alpha$ . La inactivación del RXR $\alpha$  repercute directamente en la transcripción de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, específicamente *Slc27a5*, *Acs1*, y *Cyp2e1*. Además, una de las funciones de RXR $\alpha$  es regular la activación de NRF2. En este sentido, la sobreexpresión de genes blanco de NRF2 fue evaluada y validada, confirmando la activación de NRF2 en los nódulos GGT/KRT19-positivos. Además, se encontraron microRNAs diferencialmente expresados en las diferentes etapas del modelo de cirrosis y cáncer, cuya función es regular los genes *Cyp2e1* y *Acs1*, es

importante mencionar que estos MDE también estuvieron presentes en el modelo 2AAF+PH, lo que nos permite sugerir que estos microRNAs está asociados a un fenotipo progenitor.

## DISCUSIÓN

Mediante la combinación de Microdissección Láser, secuenciación de nueva generación (RNA-Seq) y análisis de expresión de microRNAs por microarreglos, en el presente trabajo de investigación se caracterizó, de manera curso temporal, el transcriptoma de nódulos de carcinoma hepatocelular con un fenotipo específico (GGT/KRT19-positivo). Uno de los hallazgos novedosos fue la subregulación de *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1*, genes implicados en la función del RXR $\alpha$ , como evento temprano en el desarrollo del CHC GGT/KRT19-positivo.

El modelo de cirrosis y cáncer, propuesto por Schiffer, recrea el proceso secuencial y de múltiples etapas del CHC, de forma concomitante con la cirrosis (88). Mediante un análisis histopatológico, evaluamos en qué semana de tratamiento con DEN, predominan nódulos displásicos y en qué semana surgen nódulos tumorales. Según nuestro análisis histopatológico, la hiperplasia, displasia y fibrosis están presentes tanto en hígados 12 W como en hígados 18 W, sin embargo, el CHC-BD y CHC-MD se observaron únicamente en hígados del grupo 18 W, además de que la cantidad de fibrosis también aumentó. Estas observaciones histológicas, concuerdan con el estudio que propuso el modelo de cirrosis y cáncer, donde a las 12 semanas de tratamiento con DEN, los hígados presentaron cirrosis y múltiples nódulos displásicos, mientras que a las 18 semanas de tratamiento, los hígados fueron clasificados como CHC multinodular cirrótico (88).

La fibrosis crónica, resulta ser el común denominador en el 90% de los casos de CHC, por lo que evaluamos la deposición de componentes de matriz extracelular, como la colágena tipo I y III, mediante la tinción de Herovici. Las fibras de la colágena tipo III son delgadas, en comparación con la colágena tipo I (106). En el inicio del proceso de cicatrización, la colágena III es la más predominante de las dos (107), y eventualmente, ésta se ve reemplazada por colágena tipo I, que es mucho más rígida (108), este proceso de recambio de colágenas se conoce como fibrilogénesis y forma parte del proceso de cicatrización crónica (109–111). El hígado humano, de manera constitutiva, mantiene una proporción equitativa de

colágena I y III, mientras que en un hígado cirrótico la cantidad de colágena aumenta hasta siete veces más, siendo la colágena I la más representativa (112). En el presente estudio, observamos en hígados *NL*, que la colágena III se encuentra en las regiones periportales recubriendo los conductos biliares y la colágena I se encuentra recubriendo estructuras sanguíneas, como la vena central del lobulillo hepático. En *NL*, la presencia de cualquier tipo de colágena en el parénquima hepático fue nula. En hígados *12 W*, la colágena tipo III fue el tipo de colágena predominante y se encontró en el parénquima rodeando nódulos hepáticos. En hígados *18 W*, se registró un aumento en la cantidad de ambos tipos de colágena, rodeando nódulos hepáticos. Parecido a lo que sucede en pacientes con cirrosis (112) el ratio de colágena I/III aumentó en los hígados *18 W*. El recambio de colágena III por colágena I en los hígados *18 W*, coincide con los procesos patológicos observados en el humano en respuesta a los procesos de fibrosis crónica en diversos tejidos (113,114). Además, la colágena I está asociada con el aumento de la agresividad de múltiples tumores sólidos (115–118) y en CHC, se ha visto que promueve la proliferación celular (119).

Una característica de los CHCs que expresan KRT19 es la presencia de septos de fibra intratumorales, mientras que en CHCs que son KRT19-negativos, no existen septos fibróticos intranodulares (120). Los fibroblastos asociados a tumor (FATs), mediante la intercomunicación con células de CHC, son responsables de producir estroma fibroso intratumoral (121). En el hígado, las células que dan origen a los miofibroblastos son las CEH (122,123), y se ha documentado que el factor de crecimiento de hepatocitos, derivado de CEH y la subsecuente activación de la vía MET-MEK-ERK1/2 activan la transcripción de *KRT19* (124). El aumento en la deposición de fibra evidenciado por la tinción de Herovici y el enriquecimiento de la vía de activación de CEH son resultados de la presente investigación, que pueden ser explicados con la intercomunicación de FATs y células tumorales GGT/KRT19-positivas.

Algo que caracteriza a las CEH es que en su estado quiescente contienen un nutrido reservorio de vitamina A. Cuando las CEH se activan se pierde la capacidad de

almacenar vitamina A (122,125). Se ha documentado ampliamente que pacientes con cirrosis presentan deficiencias en la cantidad de vitamina A (126). Muchas de las funciones de la vitamina A en el organismo, son llevadas a cabo mediante sus derivados como el ácido retinoico que activa a su vez, redes transcripcionales controladas por los receptores de ácido retinoico (RAR) y el Receptor X de retinoides (RXR) (21,127). Existen tres isoformas de RXR; RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , en el hígado, la isoforma más abundante es RXR $\alpha$  (97). La disminución en el contenido de vitamina A, repercute directamente en la disponibilidad del ácido retinoico, lo que evita que el RXR $\alpha$  se active (128), y pueda formar un heterodímero con algún otro miembro de los receptores nucleares, por ejemplo, FXR, PPAR. Esta unión regula la transcripción de genes implicados en el metabolismo de lípidos y de ácidos grasos como son *SLC27A5* y *ACSL1* (129,130). En este estudio se demostró que estos genes se encuentran significativamente subregulados en los nódulos GGT/KRT19-positivos, lo que indicia que su subregulación es un evento temprano en el desarrollo del CHC GGT/KRT19-positivo.

La alta heterogeneidad del CHC ha promovido su estudio basado en la expresión de marcadores (63,131). Los tumores que expresan marcadores de origen progenitor tienden a ser tumores agresivos y resistentes a la quimioterapia y han sido la base para proponer una clasificación (132). En el presente estudio, analizamos de manera temporal en el modelo de cirrosis y cáncer la expresión de CD90, GGT y KRT19, todos marcadores de origen progenitor. CD90 es un marcador ampliamente utilizado en el estudio de células troncales del cáncer (133), y su expresión se ha relacionado con altas tasas de recurrencia en pacientes con CHC (134), sin embargo, CD90 es un marcador de células mesenquimales y no necesariamente de hepatocitos (135). En tumores hepáticos el enriquecimiento de células CD90-positivas ha sido principalmente en la región periportal, reconocida como un nicho de las CPH, pero no se ha observado de la misma manera en el parénquima hepático (135). En el presente estudio, se observó que la expresión constitutiva de CD90 es en la región periportal, adyacente a los colangiocitos que son KRT19-positivos, esta región es la que se especula que prolifera en condiciones de daño crónico hepático (34). Lo que podría sugerir que nódulos con estas

características surgen de esta región, sin embargo, experimentos funcionales se requieren para validar esta hipótesis. En hígados *12 W*, se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de CD90 y en hígados *18 W*, este aumento alcanzó una significancia estadística. Múltiples estudios han señalado la participación de CD90 en la agresividad, invasión y recurrencia en tumores hepáticos (136). Además, células de CHC que expresan CD90, también tienden a expresar otros marcadores de CHC, por ejemplo, PTGR1 (137). Otro marcador evaluado fue la GGT. La expresión de GGT ha sido definida como una característica constitutiva de la formación de nódulos en modelos de hepatocarcinogénesis química (69). Efectivamente, en hígados *NL*, la GGT sólo se expresó en conductos biliares, mientras que en hígados *12 W*, se observaron nódulos positivos a dicha enzima. Las secciones hepáticas provenientes de hígados *18 W*, mostraron nódulos GGT-positivos que cubrían casi la totalidad de la superficie. En contraste con CD90, la expresión de GGT en procesos de hepatocarcinogénesis, está enriquecida principalmente en hepatocitos, mientras que el primero, tiende a expresarse en los espacios mesenquimales. El tercer marcador evaluado fue KRT19. Los tumores de CHC que expresan KRT19 han sido clasificados como tumores altamente agresivos, con alta recurrencia y capacidades metastásicas (81), además se ha sugerido como un marcador de lesiones neoplásicas en estadio temprano (138). Los nódulos hepáticos displásicos, positivos a KRT19, han demostrado tener la vía de la autofagia desregulada y se ha sugerido que esta alteración metabólica promueve su progresión hacia un estadio tumoral (68). Células CD90-positivas, también han mostrado sobreexpresión en marcadores de autofagia (e.g. LC3-II), después de haber sido tratadas con quimioterapéuticos (139). La supervivencia de pacientes con CHC tiene una correlación negativa con la expresión de marcadores de origen progenitor, además, esta correlación negativa aumenta si el tumor es positivo a dos o más marcadores (131). Considerando el efecto perjudicial de la co-expresión de marcadores de origen progenitor, y la expresión de CD90 en células mesenquimales, en el presente estudio, se rastrearon los nódulos displásicos y tumorales GGT/KRT19-positivos. El mantenimiento de la proporción de nódulos GGT/KRT19-positivos, de las 12 semanas de tratamiento (etapa de displasia), hasta

las 18 semanas de tratamiento (etapa neoplásica) sugiere una progresión persistente de nódulos GGT/KRT19-positivos a lo largo de la progresión carcinogénica, dicho hallazgo concuerda con reportes que demuestran la progresión de nódulos KRT19-positivos a estadios tumorales y la remodelación regresiva de nódulos KRT19-negativos (68).

Otra forma en la que se ha clasificado al CHC es mediante análisis metabólicos (83). Según estos estudios, los subtipos más agresivos, son en primer lugar, análogos a la clasificación “2” de Hoshida, la cual está caracterizada por la expresión de marcadores progenitores como KRT19 (84,140). En segundo lugar, presentan desregulaciones en el metabolismo de ácidos grasos (83). En el presente estudio, la vía del metabolismo de ácidos grasos fue una de las cinco vías con mayor grado de desregulación tanto en nódulos displásicos como en nódulos tumorales GGT/KRT19-positivos. *Slc27a5*, *Acs1* y *Cyp2e1*, fueron algunos de los genes implicados en esta vía, y persistentemente subregulados. En condiciones fisiológicas, *SLC27A5*, internaliza ácidos grasos de cadena larga, que son activados por *ACSL1* (141). La subregulación de estos genes tiene un impacto directo con la internalización, activación y metabolismo de ácidos grasos. En tumores de cáncer colorrectal, se ha documentado la sobrerregulación de *ACSL1*, sin embargo, en tumores hepáticos con un metabolismo de lípidos aberrante, *ACSL1* se encuentra subregulado (142). Nuestros resultados, apoyan las evidencias sobre la desregulación del metabolismo de ácidos grasos en los nódulos KRT19-positivos. Por lo que, posiblemente, la reconfiguración metabólica de esta vía en particular es un evento importante para el desarrollo de tumores con este fenotipo.

Uno de los responsables de controlar la expresión de *ACSL1* y *SCL27A5*, es RXR $\alpha$  (143,144). Como se mencionó previamente, la activación del RXR $\alpha$ , se ve comprometida en presencia de septos de fibra. El análisis de enriquecimiento mostró que las vías donde el RXR tiene un papel importante, se encuentran, persistentemente desreguladas, en los nódulos GGT/KRT19-positivos. Considerando que la presencia de septos de fibra es característica en tumores KRT19-positivos, no es extraño entonces, que la activación de CEH se encuentre

entre las vías desreguladas en los nódulos GGT/KRT19-positivos, y, por ende, es congruente sugerir que, en este tipo de nódulos, la activación de CEH sea causa de la desregulación de la función del RXR $\alpha$  y en consecuencia de la subregulación de los genes blanco; *Slc27a5* y *Acs11*.

Otra vía desregulada en los nódulos GGT/KRT19-positivos, fue la de NRF2. Esta vía ha sido ampliamente asociada al desarrollo del CHC (145–147). La vía de NRF2, está encargada de la homeostasis redox en las células. En el citoplasma, Keap1 (co-represor de NRF2), censa la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) libera a NRF2 y este se transloca al núcleo y se posiciona en secuencias llamadas “Elementos de Respuesta Antioxidante” (ERA), lo que desencadena la transcripción de genes con actividad antioxidante (148). En el presente estudio, logramos validar la desregulación de la vía de NRF2, mediante la medición de la expresión relativa de sus genes blanco; *GSTP1*, *PTGR1*, *ABCC3*, *TXNRD1* y *AKR7A3* (98–100,149,150), así como el ortólogo de *AKR1B10*; *Akr1b8* (151). Todos los genes evaluados presentaron una sobrerregulación estadísticamente significativa, en los tumores GGT/KRT19-positivos. Anteriormente, se ha reportado que nódulos KRT19-positivos tienen sobrerregulación de la vía NRF2 (152). Algunos estudios mencionan que NRF2 se encuentra activo y desencadena la transcripción de la maquinaria antioxidante una vez que se transloca al núcleo (153). Sin embargo, los receptores nucleares tiene un rol en la regulación intranuclear de NRF2 (154). El RXR $\alpha$  regula la actividad de NRF2 mediante la interacción de su dominio de unión a ADN (DBD, por sus siglas en inglés) al dominio Neh7 de NRF2, lo que impide que la maquinaria formada por la proteína de unión CREB (CBP) y la RNA polimerasa, forme el complejo transcripcional, evitando la transcripción de los genes blanco de NRF2 (155). Otro mecanismo de activación de NRF2 en tumores hepáticos, es la subregulación de *SLC27A5* (98), lo que conduce al aumento en los niveles de ácidos grasos poli-insaturados resultando en el aumento de ERO, y la translocación al núcleo de NRF2 (98). La activación de las CEH, repercute en la disponibilidad de ácido retinoico y por ende en la activación del RXR $\alpha$ , evitando la transcripción de genes blanco con función en el metabolismo de ácidos grasos, estos genes blanco, como *SLC27A5*, pueden tener efectos en el metabolismo redox

activando la vía antioxidante de NRF2, como está previamente propuesto (98), en este trabajo proponemos que la función co-represora de RXR $\alpha$  sobre NRF2, dentro del núcleo, no está teniendo lugar debido a la inactivación del receptor nuclear. **(Figura 22)**

La relación de los genes implicados en la función de RXR $\alpha$ , en tumores humanos GGT/KRT19-positivos, fue explorada mediante un análisis de co-expresión. Se obtuvieron los datos de expresión a nivel de mensajero de 366 muestras de CHC humano a partir del TCGA (<https://www.cbioportal.org/>). El 99% de las muestras presentaron alteraciones en el nivel del transcrito de *SLC27A5*, *ACSL1*, *CYP2E1*, *RXR $\alpha$* , *GGT1* o *KRT19*. El gen que tuvo la mayor frecuencia de alteraciones a nivel de mensajero fue *ACSL1* seguido de *SLC27A5*, otro punto que llamó nuestra atención fue que todas las muestras con sobrerregulación de *KRT19*, con excepción de una, mostraron subregulación de *ACSL1*, *SLC27A5*, *RXR $\alpha$*  y *CYP2E1*, lo que significa que la expresión de estos genes es mutuamente excluyente en CHC de origen humano. La expresión de *KRT19* en CHC está asociada a un proceso de dediferenciación hacia un fenotipo progenitor y más agresivo (156,157), por lo que la pérdida en la expresión de genes específicos hepatocelulares como *SLC27A5*, *ACSL1* y *CYP2E1* es congruente con la reprogramación molecular hacia un fenotipo progenitor.

Evaluamos los perfiles de expresión hepática de microRNAs de manera progresiva en el modelo de cirrosis y cáncer, para evaluar si los niveles de expresión de *Slc27a5*, *Acs1*, *Cyp2e1*, *Rxra*, *Ggt1* o *Krt19* están regulados mediante microRNAs. El ACP de los perfiles de expresión global de los microRNAs mostró un acomodo progresivo que corresponde a las semanas de tratamiento, agrupando a las muestras *NL* en un extremo del ACP y en el otro extremo las muestras provenientes de hígados en estadios tumorales. El análisis de expresión diferencial mostró aumento en la cantidad de MDE de manera progresiva con las semanas de tratamiento; se llevó a cabo una búsqueda supervisada de MDE experimentalmente validados que regulen la expresión de *Rxra*, *Slc27a5*, *Acs1*, *Krt19*, *Ggt1* y *Cyp2e1*. Dos MDE son responsables de la regulación de *Cyp2e1* (rno-mir-212-3p y rno-mir-

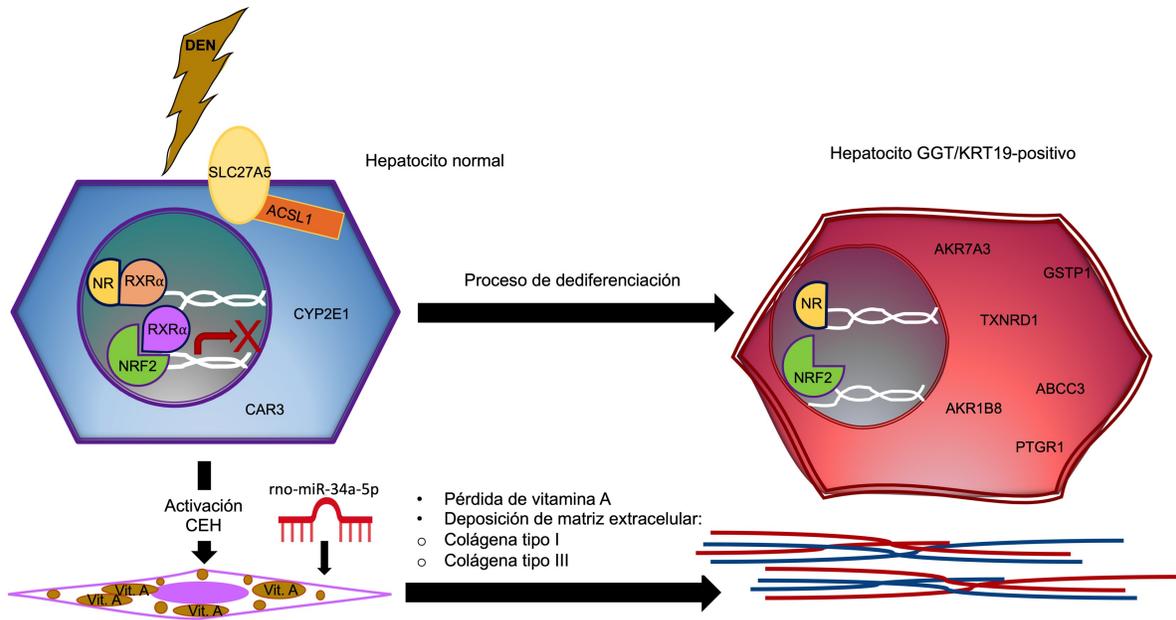
132-3p), por su parte, rno-mir-34a, regula la expresión de *Acs11*. Estos microRNAs mantuvieron una sobreexpresión a lo largo del modelo de cirrosis y cáncer, así como en el modelo 2AAF+PH. Estos resultados permiten sugerir que la pérdida de la expresión de *Cyp2e1* y *Acs11* son parte de un proceso de dediferenciación hacia un fenotipo progenitor en los nódulos positivos a marcadores como GGT y KRT19. Por otra parte, los microRNAs rno-mir-27a-3p y rno-mir-128-3p regulan la expresión *Rxra*, sin embargo, ninguno de los microRNAs mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa, de igual manera que *Rxra* no mostró una subregulación estadísticamente significativa. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la regulación de RXR $\alpha$  puede estar a cargo de la disponibilidad de derivados de la vitamina A relacionada con la activación de las CEH, en lugar de una regulación mediada por microRNAs.

Recientemente se documentó que la activación, mediada por la insulina, de la vía PI3K, Akt, mTOR, es la responsable de la sobreexpresión de los microRNAs rno-mir-212-3p y rno-mir-132-3p (102). Los autores demostraron que concentraciones ascendentes de insulina aumentaban los niveles de estos dos microRNAs, los cuales se unen a la región 3' UTR del transcrito de *CYP2E1* impidiendo su traducción (102). Ratones knockout para la proteína *SLC27A5*, mostraron niveles altos de glucosa en suero, así como, una tendencia en el aumento en los niveles de insulina (158). Posiblemente, exista una relación entre la subregulación de *SLC27A5* y la sobreexpresión de rno-mir-212-3p y rno-mir-132-3p, mediante el aumento en la concentración de insulina, sin embargo, experimentos funcionales son necesarios para sostener esta propuesta.

Además de estar enriquecido en hepatocitos (159), *ACSL1*, también se expresa en CEH (160). En estos estudios, la sobreexpresión de rno-mir-34a-3p, tuvo como resultado, la subregulación de *ASCL1* en CEH, además de propiciar el aumento en la expresión de  $\alpha$ -*SMA*, *DES* y *COL1A1*, indicando que la subregulación de rno-mir34a-3p permite la transformación de CEH activadas hacia un fenotipo quiescente. Los autores propusieron que la sobreexpresión de rno-mir-34a-3p, es un factor que promueve la fibrosis hepática mediante la subregulación de *ACSL1*.

Sin la expresión de ACSL1, la formación de acyl-CoA a partir de ácidos grasos de cadena larga no tiene lugar, lo que afecta directamente la acumulación y metabolismo de lípidos en las CEH. Los autores sugieren que este desequilibrio metabólico en las CEH es un factor que promueve la activación de CEH (103).

Estos datos apuntan a que la activación de CEH y los nódulos GGT/KRT19-positivos guardan una estrecha relación. Por un lado, la sobrerregulación de rno-mir34a-3p, es un punto clave en la activación de CEH. Una vez activadas estas células se convierten en la principal fuente de fibroblastos en el hígado, depositando proteínas de matriz extracelular, como colágena tipo I y tipo III de manera internodular e intranodular. La comunicación entre FATs y hepatocitos, deriva en la transcripción de KRT19 y por ende en el fenotipo progenitor. De manera paralela, la pérdida del reservorio de vitamina A, en consecuencia, a la activación de CEH, repercute directamente en la activación y función del RXR $\alpha$ , causando, por un lado, la subregulación de genes blanco como *Slc27a5* y *Acs11*, y por otro lado, la activación de la vía de NRF2 y la transcripción de genes blanco como *Gstp1*, *Akr1b8*, *Akr7a3*, *Abcc3* y *Txnrd1* (**Figura 22**).



**Figura 22. Activación de CEH, función de RXR $\alpha$ , y activación de la vía de NRF2.** Mecanismo propuesto en este estudio. Las flechas negras indican procesos de activación y dediferenciación, Las líneas rojas y azules curvas representan colágena tipo I y III respectivamente. Imagen modificada de Castro-Gil MP, *et al.*, en proceso.

Finalmente, nuestros datos contribuyen a la caracterización transcriptómica de nódulos GGT/KRT19-positivos en un modelo de cirrosis y cáncer y apuntan a la subregulación de *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1* (genes implicados en la función del RXR $\alpha$ ), como un evento temprano en el desarrollo del CHC GGT/KRT19-positivo.

## CONCLUSIONES

1. El modelo de cirrosis y cáncer inducido con DEN en rata recrea el proceso carcinogénico que ocurre en el humano, además de permitir identificar dos puntos críticos en este proceso; la displasia y neoplasia.
2. La proporción de nódulos GGT/KRT19-positivos persiste de una etapa displásica a una etapa neoplásica en el modelo de cirrosis y cáncer, lo que sugiere que los nódulos con dicho fenotipo son capaces de progresar de una etapa a otra.
3. Mas del 50 % de los GDE están presentes tanto en nódulos 12 W y nódulos 18 W. Este alto porcentaje de genes sugiere una fuerte asociación al fenotipo de nódulos GGT/KRT19-positivos.
4. La desregulación de genes implicados en la función de RXR $\alpha$ , metabolismo de ácidos grasos, activación de CEH, y en la vía de NRF2, se encontró tanto en nódulos displásicos como tumorales GGT/KRT19-positivos provenientes del modelo de cirrosis y cáncer, lo que sugiere una relevancia de dichas vías metabólicas en el desarrollo del CHC GGT/KRT19-positivo.
5. La subregulación de *Slc27a5*, *Acs1*, y *Cyp2e1* puede ser un evento temprano en el desarrollo del CHC con un fenotipo GGT/KRT19-positivo.
6. La sobrerregulación de rno-mir34a-3p, rno-mir-212-3p y rno-mir-132-3p, se presenta desde las seis semanas de tratamiento (6 W) en el modelo de cirrosis y cáncer y perdura hasta etapas tumorales (22 W), dicha sobrerregulación también está presente en hígados que fueron sometidos a un modelo de inducción de células progenitoras hepáticas (2AAF+PH). Por lo que la sobrerregulación de estos microRNAs puede estar asociada al desarrollo de CHC con características progenitoras.

## RELEVANCIA DEL ESTUDIO

La secuenciación del transcriptoma de nódulos displásicos y tumorales fenotipo-específicos, permite establecer que la desregulación de la función del RXR $\alpha$  y la subregulación de *Slc27a5*, *Acs11* y *Cyp2e1* son eventos tempranos en la hepatocarcinogénesis con un fenotipo GGT/KRT19-positivo.

La desregulación en la función del RXR $\alpha$  puede ser un mecanismo de activación de la vía de NRF2 en los tumores hepáticos, específicamente los tumores GGT/KRT19-positivos.

La sobrerregulación de rno-miR-132-3p, rno-mir-212-3p, y rno-miR-34a-5p, en muestras provenientes del modelo de cirrosis y cáncer como en el modelo de células progenitoras (2AAF+PH) y la regulación a la baja sobre *Cyp2e1* y *Acs11* relaciona estos perfiles de expresión con fenotipos progenitores y tumorales, además de la activación de CEH.

## PERSPECTIVAS

Para describir y comparar los cambios transcriptómicos de otros fenotipos nodulares sería necesario comparar los perfiles de expresión de nódulos GGT-positivos KRT19-negativos.

Estudios similares en muestras clínicas podrían contribuir con una mejor clasificación molecular del CHC.

Para comprender aspectos funcionales de los genes que modificaron su expresión sería importante evaluar histológicamente la ubicación celular de *Slc27a5*, *Acs11*, *Cyp2e1* y *RXR $\alpha$*  en los tejidos NL, así como en nódulos GGT/KRT19-positivos, por lo que experimentos de este tipo son necesarios para validar las propuestas establecidas.

Son necesarios estudios que validen la función reguladora de *RXR $\alpha$*  sobre NRF2 de manera intranuclear en nódulos GGT/KRT19-positivos.

Estudios que validen la inactivación de la función de *RXR $\alpha$*  por falta de ácido retinoico en nódulos GGT/KRT19-positivos son necesarios.

La validación de la regulación de *miR-34a-3p* sobre *Acs11* en nódulos GGT/KRT19-positivos, son necesarios para determinar el rol de dicho microRNA en la hepatocarcinogénesis.

## REFERENCIAS

1. ELIAS H, BENGELSDORF H. The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat (Basel)* [Internet]. 1952;14(4):297–337. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14943381>
2. Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2010 Aug;90(4):643–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610910000526>
3. Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World J Surg* [Internet]. 1982 Jan;6(1):3–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01656368>
4. Eipel C, Abshagen K, Vollmar B. Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010 Dec 28;16(48):6046–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182219>
5. Krishna M. Microscopic anatomy of the liver. *Clin liver Dis* [Internet]. 2013 Mar;2(Suppl 1):S4–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30992875>
6. Zhou Z, Xu M-J, Gao B. Hepatocytes: a key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2016;13(3):301–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26685902>
7. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* [Internet]. 2001;161:III–XIII, 1–151. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729749>
8. Kietzmann T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol* [Internet]. 2017 Apr;11:622–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231716304499>
9. Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver

- parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* [Internet]. 1977 Feb;72(2):441–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/833203>
10. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*. 2001;33(3):738–50.
  11. Fu G-B, Huang W-J, Zeng M, Zhou X, Wu H-P, Liu C-C, et al. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res* [Internet]. 2019 Jan 25;29(1):8–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41422-018-0103-x>
  12. Tietz PS, Larusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2006 May;22(3):279–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550043>
  13. Han Y, Glaser S, Meng F, Francis H, Marzioni M, McDaniel K, et al. Recent advances in the morphological and functional heterogeneity of the biliary epithelium. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2013 May;238(5):549–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856906>
  14. Banales J-M, Prieto J, Medina J-F. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Jun 14;12(22):3496–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773707>
  15. Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019;16(5):269–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30850822>
  16. Shibuya M, Kondo F, Sano K, Takada T, Asano T. Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* [Internet]. 2011 Jul;18(4):537–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s00534-010-0365-2>

17. Tabibian JH, Trussoni CE, O'Hara SP, Splinter PL, Heimbach JK, LaRusso NF. Characterization of cultured cholangiocytes isolated from livers of patients with primary sclerosing cholangitis. *Lab Invest* [Internet]. 2014 Oct;94(10):1126–33. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25046437>
18. Cogger VC, Le Couteur DG. Fenestrations in the Liver Sinusoidal Endothelial Cell. In: *The Liver* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; p. 389–406. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470747919.ch27>
19. Fraser R, Cogger VC, Dobbs B, Jamieson H, Warren A, Hilmer SN, et al. The liver sieve and atherosclerosis. *Pathology* [Internet]. 2012 Apr;44(3):181–6. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516325466>
20. Wisse E. An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* [Internet]. 1972 Mar;38(5–6):528–62. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022532072900895>
21. Saeed A, Dullaart RPF, Schreuder TCMA, Blokzijl H, Faber KN. Disturbed Vitamin A Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* [Internet]. 2017 Dec 29;10(1). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29286303>
22. Hou W, Syn W-K. Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 Nov 12;6. Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2018.00150/full>
23. Lo RC-L, Ng IO-L. Hepatic progenitor cells: their role and functional significance in the new classification of primary liver cancers. *Liver cancer* [Internet]. 2013 Apr;2(2):84–92. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24159600>
24. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, et al.

- The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* [Internet]. 1999 Dec;30(6):1425–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573521>
25. Shupe TD, Piscaglia AC, Oh S-H, Gasbarrini A, Petersen BE. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or “oval cells,” from rat livers. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2009;482:387–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089369>
  26. Boulter L, Lu W-Y, Forbes SJ. Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 May 1;123(5):1867–73. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/66026>
  27. Ye F, Jing Y-Y, Guo S-W, Yu G-F, Fan Q-M, Qu F-F, et al. Proliferative ductular reactions correlate with hepatic progenitor cell and predict recurrence in HCC patients after curative resection. *Cell Biosci* [Internet]. 2014;4(1):50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197550>
  28. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker thy-1 in the rat. *Hepatology* [Internet]. 1998 Feb;27(2):433–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.510270218>
  29. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* [Internet]. 2009 Jun;136(11):1951–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429791>
  30. Michalopoulos GK, Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2021 Jan 6;18(1):40–55. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-0342-4>
  31. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* [Internet]. 2000 Jan;32:19–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827800804122>

32. Miyaoka Y, Miyajima A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div* [Internet]. 2013;8(1):8. Available from: <http://celldiv.biomedcentral.com/articles/10.1186/1747-1028-8-8>
33. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* [Internet]. 1995 Nov 1;96(5):2461–8. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/118304>
34. Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology* [Internet]. 2019;69(1):420–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30070383>
35. Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Hepatic regeneration. The role of regeneration in pathogenesis of chronic liver diseases. *Clin Lab Med* [Internet]. 1996 Jun;16(2):325–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8792075>
36. Gilbert ES. Ionising radiation and cancer risks: What have we learned from epidemiology? *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2009 Jan 8;85(6):467–82. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09553000902883836>
37. Huncharek M. Asbestos and Cancer: Epidemiological and Public Health Controversies. *Cancer Invest* [Internet]. 1994 Jan 11;12(2):214–22. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07357909409024876>
38. Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2010 Jun;118(6):818–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20172840>
39. Botelho MC, Machado JC, Correia da Costa JM. *Schistosoma haematobium* and bladder cancer: What lies beneath? *Virulence* [Internet]. 2010 Mar 27;1(2):84–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.1.2.10487>

40. Brianti P, De Flammineis E, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol* [Internet]. 2017 Apr;40(2):80–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368072>
41. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2010 Oct;23(4):713–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20930071>
42. Idikio HA. Human cancer classification: a systems biology- based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics. *J Cancer* [Internet]. 2011 Feb 22;2:107–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479129>
43. Wu S, Powers S, Zhu W, Hannun YA. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* [Internet]. 2016 Jan 7;529(7584):43–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature16166>
44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
45. Jia D, Jolly MK, Kulkarni P, Levine H. Phenotypic Plasticity and Cell Fate Decisions in Cancer: Insights from Dynamical Systems Theory. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2017 Jun 22;9(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640191>
46. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May;71(3):209–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338>
47. Preston SH. Demographic Change in the United States, 1970 – 2050. In: *Forecasting the Health of Elderly Populations* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 1993. p. 51–77. Available from:

[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-9332-0\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-9332-0_3)

48. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2021;7(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33479224>
49. Tischoff I, Tannapfel A. [Hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma--different prognosis, pathogenesis and therapy]. *Zentralbl Chir* [Internet]. 2007 Aug;132(4):300–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724632>
50. Ko S, Russell JO, Molina LM, Monga SP. Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2020;15:23–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31399003>
51. Bayoumi A, Shatat M, Eslam M. Metabolic associated fatty liver disease and cancer risk: causal role or epiphenomenon? *Hepatobiliary Surg Nutr* [Internet]. 2020 Dec;9(6):774–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33299832>
52. Novo E, Bocca C, Foglia B, Protopapa F, Maggiora M, Parola M, et al. Liver fibrogenesis: un update on established and emerging basic concepts. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2020;689:108445. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32524998>
53. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):674–87.
54. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(April).
55. Hanna RF, Aguirre DA, Kased N, Emery SC, Peterson MR, Sirlin CB. Cirrhosis-associated hepatocellular nodules: correlation of histopathologic and MR imaging features. *Radiographics* [Internet]. 28(3):747–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480482>
56. Losic B, Craig AJ, Villacorta-Martin C, Martins-Filho SN, Akers N, Chen X, et

- al. Intratumoral heterogeneity and clonal evolution in liver cancer. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–15.
57. Gerdner L a. *World Journal of Psychiatry.* *World J Psychiatry.* 2012;2(2):26–32.
58. Mazzanti R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? *World J Exp Med.* 2016;6(1):21.
59. Marrero JA, Welling T. Modern Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Clin Liver Dis [Internet].* 2009 May;13(2):233–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089326109000099>
60. Forner A, Gilabert M, Bruix J, Raoul J-L. Treatment of intermediate-stage hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol [Internet].* 2014 Sep 5;11(9):525–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2014.122>
61. Sakamoto M. Early HCC: diagnosis and molecular markers. *J Gastroenterol [Internet].* 2009;44 Suppl 1:108–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148803>
62. Zhang Q, Lou Y, Bai X-L, Liang T-B. Intratumoral heterogeneity of hepatocellular carcinoma: From single-cell to population-based studies. *World J Gastroenterol [Internet].* 2020 Jul 14;26(26):3720–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32774053>
63. Seino S, Tsuchiya A, Watanabe Y, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, Yanai H, Nakamura K, Kumaki D, Hirano M, Funakoshi K, Aono T, Sakai T, Sakata J, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Wakai T TS. Clinical outcome of hepatocellular carcinoma can be predicted by the expression of hepatic progenitor cell markers and serum tumour markers. *Oncotarget.* 2018;9(31):21844–60.
64. HANIGAN M. Altered expression of gamma-glutamyl transpeptidase in human tumors\*1. *Hum Pathol [Internet].* 1999 Mar;30(3):300–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817799900096>

65. Torres Mena JE, Sánchez Rodríguez R, Quintanar Jurado V, Mojica Espinosa R, Del Pozo Yauner L, Meléndez Zajgla J, et al. Laser capture microdissection after  $\gamma$ -glutamyl transferase histochemistry: An optimization for gene expression analysis. *Anal Biochem* [Internet]. 2014;447(1):126–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.015>
66. Lee J-S, Heo J, Libbrecht L, Chu I-S, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, et al. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med* [Internet]. 2006 Apr;12(4):410–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16532004>
67. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, De Luca F, et al. Keratin 19: A key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut*. 2014;63(4):674–85.
68. Kowalik MA, Perra A, Ledda-Columbano GM, Ippolito G, Piacentini M, Columbano A, et al. Induction of autophagy promotes the growth of early preneoplastic rat liver nodules. *Oncotarget*. 2016;7(5):5788–99.
69. Cameron R, Kellen J, Kolin A, Malkin A, Farber E.  $\gamma$ -Glutamyltransferase in Putative Premalignant Liver Cell Populations During Hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 1978;38(3):823–9.
70. Hendrich S, Pitot HC. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1987;6(2):155–78.
71. Hanigan MH, Pitot HC. Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 1985 Feb;6(2):165–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857599>
72. Hanigan MH, Frierson HF. Immunohistochemical detection of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(10):1101–8.
73. Paolicchi A, Emdin M, Ghiozeni E, Ciancia E, Passino C, Popoff G, et al. Human Atherosclerotic Plaques Contain Gamma-Glutamyl Transpeptidase

- Enzyme Activity. *Circulation* [Internet]. 2004 Mar 23;109(11):1440–1440. Available from:  
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.0000120558.41356.E6>
74. Franzini M, Corti A, Martinelli B, Del Corso A, Emdin M, Parenti GF, et al.  $\gamma$ -Glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques—Biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* [Internet]. 2009 Jan;202(1):119–27. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915008002359>
75. Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res* [Internet]. 2014;122:103–41. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24974180>
76. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 Jul 17;174(2):169–74. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16831889>
77. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, et al. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*. 2006;49(2):138–51.
78. Nakata B, Takashima T, Ogawa Y, Ishikawa T, Hirakawa K. Serum CYFRA 21-1 (cytokeratin-19 fragments) is a useful tumour marker for detecting disease relapse and assessing treatment efficacy in breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2004 Aug 31;91(5):873–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280913>
79. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2006 Dec;13(4):1033–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158753>
80. Bae JS, Choi HN, Noh SJ, Park BH, Jang KY, Park CK MW. Expression of K19 and K7 in dysplastic nodules and hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2012;4(2):213–20. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22844356/>

81. Zhuo J-Y, Lu D, Tan W-Y, Zheng S-S, Shen Y-Q, Xu X. CK19-positive Hepatocellular Carcinoma is a Characteristic Subtype. *J Cancer* [Internet]. 2020;11(17):5069–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32742454>
82. Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Furuyama T, Watanabe S, Ogura T, et al. Comprehensive molecular and immunological characterization of hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine* [Internet]. 2019 Feb;40:457–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30598371>
83. Bidkhorji G, Benfeitas R, Klevstig M, Zhang C, Nielsen J, Uhlen M, et al. Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(50):E11874–83.
84. Hoshida Y, Nijman SMB, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009;69(18):7385–92.
85. Day NE, Brown CC. Multistage models and primary prevention of cancer. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1980 Apr;64(4):977–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6929006>
86. Szpirer C. Cancer Research in Rat Models. In 2010. p. 445–58. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-389-3\\_30](http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-389-3_30)
87. Farber E, Rubin H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1991 Jun 1;51(11):2751–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032214>
88. Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois-Mouthon C, Rey C, et al. Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(2):307–14.
89. Dusabineza A-C, Van Hul NK, Abarca-Quinones J, Starkel P, Najimi M, Leclercq IA. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of

- evidence in the AAF/PH rat model. *Lab Invest* [Internet]. 2012 Jan;92(1):72–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912377>
90. WG F. A polychrome stain for differentiating precollagen from collagen. *Stain Technol* [Internet]. 1963;38:206–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13959845/>
  91. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Jul;9(7):671–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>
  92. Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Muñoz-Galindo L, Lizarraga-Sanchez F, Favela-Orozco A, Chavez-Gutierrez E, et al. miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2017;1864(10):1642–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.023>
  93. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
  94. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec;25(4):402–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629>
  95. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* [Internet]. 2013 Apr 2;6(269):pl1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23550210>
  96. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2008 Feb;13(2):153–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242515>
  97. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis

- retinoic acid. *Genes Dev* [Internet]. 1992 Mar;6(3):329–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1312497>
98. Gao Q, Zhang G, Zheng Y, Yang Y, Chen C, Xia J, et al. SLC27A5 deficiency activates NRF2/TXNRD1 pathway by increased lipid peroxidation in HCC. *Cell Death Differ* [Internet]. 2020;27(3):1086–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-019-0399-1>
  99. Sánchez-Rodríguez R, Torres-Mena JE, Quintanar-Jurado V, Chagoya-Hazas V, Rojas del Castillo E, del Pozo Yauner L, et al. Ptgr1 expression is regulated by NRF2 in rat hepatocarcinogenesis and promotes cell proliferation and resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017;102:87–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.027>
  100. Adachi T, Nakagawa H, Chung I, Hagiya Y, Hoshijima K, Noguchi N, Kuo MT IT. Nrf2-dependent and independent transcriptional up-regulation of ABCC1, ABCC2, ABCC3, and ABCG2 genes in HepG2 cells. *J Exp Ther Oncol*. 2007;6(4):335–48.
  101. Bartolini D GF. The functional interactome of GSTP: A regulatory biomolecular network at the interface with the Nrf2 adaption response to oxidative stress. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2016;15(1019):29–44.
  102. Shukla U, Tumma N, Gratsch T, Dombkowski A, Novak RF. Insights into insulin-mediated regulation of CYP2E1: miR-132/-212 targeting of CYP2E1 and role of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt (protein kinase B), mammalian target of rapamycin signaling in regulating miR-132/-212 and miR-122/-181a expression in pri. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2013 Oct;41(10):1769–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920219>
  103. Yan G, Li B, Xin X, Xu M, Ji G, Yu H. MicroRNA-34a Promotes Hepatic Stellate Cell Activation via Targeting ACSL1. *Med Sci Monit* [Internet]. 2015 Oct 6;21:3008–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437572>

104. Tombolan L, Zampini M, Casara S, Boldrin E, Zin A, Bisogno G, et al. MicroRNA-27a Contributes to Rhabdomyosarcoma Cell Proliferation by Suppressing RARA and RXRA. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(4):e0125171. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915942>
105. Adlakha YK, Khanna S, Singh R, Singh VP, Agrawal A, Saini N. Pro-apoptotic miRNA-128-2 modulates ABCA1, ABCG1 and RXR $\alpha$  expression and cholesterol homeostasis. *Cell Death Dis* [Internet]. 2013 Aug 29;4:e780. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990020>
106. Birk DE, Mayne R. Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 1997 Apr;72(4):352–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9127735>
107. Voleti PB, Buckley MR, Soslowsky LJ. Tendon healing: repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2012;14:47–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809137>
108. Hirose K, Kondo S, Choi H-R, Mishima S, Iwata H, Ishiguro N. Spontaneous healing process of a supraspinatus tendon tear in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2004 Jul;124(6):374–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15156330>
109. Suda S, Williams H, Medbury HJ, Holland AJA. A Review of Monocytes and Monocyte-Derived Cells in Hypertrophic Scarring Post Burn. *J Burn Care Res*. 2016;37(5):265–72.
110. Karsdal MA, Daniels SJ, Holm Nielsen S, Bager C, Rasmussen DGK, Loomba R, et al. Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int*. 2020;40(4):736–50.
111. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(5):1852–6.
112. Rojkind M, Giambrone M A BL. Collagen types in normal and cirrhotic liver.

- Gastroenterology. 1979;76(4):710–9.
113. Gonçalves-Neto J, Witzel SS, Teodoro WR, Carvalho-Júnior AE, Fernandes TD, Yoshinari HH. Changes in collagen matrix composition in human posterior tibial tendon dysfunction. *Jt bone spine* [Internet]. 2002 Mar;69(2):189–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12027311>
  114. Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1994 Jun;53(6):359–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8037494>
  115. Armstrong T, Packham G, Murphy LB, Bateman AC, Conti JA, Fine DR, Johnson CD, Benyon RC IJ. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(21):7427–37.
  116. Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38(1):95–104.
  117. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med*. 2008;6:1–15.
  118. Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H, et al. Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. *J Proteomics* [Internet]. 2013;94:473–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.10.020>
  119. Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 2011;53(4):1192–205.

120. Seok JY, Na DC, Woo HG, Roncalli M, Kwon SM, Yoo JE, et al. A fibrous stromal component in hepatocellular carcinoma reveals a cholangiocarcinoma-like gene expression trait and epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology*. 2012;55(6):1776–86.
121. Mazzocca A, Dituri F, Lupo L, Quaranta M, Antonaci S, Giannelli G. Tumor-secreted lysophosphatidic acid accelerates hepatocellular carcinoma progression by promoting differentiation of peritumoral fibroblasts in myofibroblasts. *Hepatology*. 2011;54(3):920–30.
122. Friedman SL. Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008;88(1):125–72.
123. Novo E, Valfrè di Bonzo L, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(11):2089–93.
124. Rhee H, Kim H-Y, Choi J-H, Woo HG, Yoo JE, Nahm JH, et al. Keratin 19 Expression in Hepatocellular Carcinoma Is Regulated by Fibroblast-Derived HGF via a MET-ERK1/2-AP1 and SP1 Axis. *Cancer Res* [Internet]. 2018;78(7):1619–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363547>
125. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2011 Apr;25(2):195–206. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152169181100031X>
126. Freund C, Gotthardt DN. Vitamin A deficiency in chronic cholestatic liver disease: Is vitamin A therapy beneficial? *Liver Int* [Internet]. 2017 Dec;37(12):1752–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13433>
127. Ghyselinck NB, Duester G. Retinoic acid signaling pathways. *Development* [Internet]. 2019;146(13). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31273085>
128. Bobowski-Gerard M, Zummo FP, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J. Retinoids Issued from Hepatic Stellate Cell Lipid Droplet Loss as Potential

- Signaling Molecules Orchestrating a Multicellular Liver Injury Response. *Cells* [Internet]. 2018 Sep 13;7(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217095>
129. Wan Y-JY, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, et al. Hepatocyte-Specific Mutation Establishes Retinoid X Receptor  $\alpha$  as a Heterodimeric Integrator of Multiple Physiological Processes in the Liver. *Mol Cell Biol*. 2000;20(12):4436–44.
  130. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell* [Internet]. 2014;157(1):255–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
  131. Berretta M, Cavaliere C, Alessandrini L, Stanzione B, Facchini G, Balestreri L, et al. Serum and tissue markers in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: Clinical and prognostic implications. *Oncotarget*. 2017;8(8):14192–220.
  132. Köhler BC, Waldburger N, Schlamp K, Jäger D, Weiss KH, Schulze-Bergkamen H, et al. Liver cancers with stem/progenitor-cell features - a rare chemotherapy-sensitive malignancy. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 29;8(35):59991–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28938700>
  133. Sukowati CHC, Anfuso B, Torre G, Francalanci P, Crocè LS, Tiribelli C. The Expression of CD90/Thy-1 in Hepatocellular Carcinoma: An In Vivo and In Vitro Study. Beltrami AP, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 8;8(10):e76830. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076830>
  134. Guo Z. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(8):2098. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i8/2098.htm>
  135. Weiss TS, Dayoub R. Thy-1 (CD90)-Positive Hepatic Progenitor Cells, Hepatocytes, and Non-parenchymal Liver Cells Isolated from Human Livers.

- Methods Mol Biol [Internet]. 2017;1506:75–89. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830546>
136. Zhang K, Che S, Su Z, Zheng S, Zhang H, Yang S, et al. CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med* [Internet]. 2018 Feb;41(2):946–54. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251325>
  137. Ho DWY, Yang ZF, Yi K, Lam CT, Ng MNP, Yu WC, et al. Gene expression profiling of liver cancer stem cells by RNA-sequencing. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(5):e37159. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22606345>
  138. Andersen JB, Loi R, Perra A, Factor VM, Ledda-Columbano GM, Columbano A, et al. Progenitor-derived hepatocellular carcinoma model in the rat. *Hepatology*. 2010;51(4):1401–9.
  139. Do HQ, Luong AB, Bonazza D, Bottin C, Doan TP, Tran LD, et al. Differential capacity of CD90+ cells in autophagy activation following chemotherapy in hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* [Internet]. 2020 Nov;19(6):645–52. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665268120300806>
  140. Goossens N, Sun X, Hoshida Y. Molecular classification of hepatocellular carcinoma: potential therapeutic implications. *Hepatic Oncol*. 2015;2(4):371–9.
  141. Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*. 1994;79(3):427–36.
  142. Chen WC, Wang CY, Hung YH, Weng TY, Yen MC, Lai MD. Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes for long-chain acyl-coenzyme A synthetase family in cancer. *PLoS One*. 2016;11(5):1–23.
  143. Yan S, Yang XF, Liu HL, Fu N, Ouyang Y, Qing K. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: An update. *World J Gastroenterol*. 2015;21(12):3492–8.

144. Vedell PT, Lu Y, Grubbs CJ, Yin Y, Jiang H, Bland KI, et al. Effects on gene expression in rat liver after administration of RXR Agonists: UAB30, 4-Methyl-UAB30, and Targretin (Bexarotene)s. *Mol Pharmacol*. 2013;83(3):698–708.
145. Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G PE. Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12).
146. Zavattari P, Perra A, Menegon S, Kowalik MA, Petrelli A, Angioni MM, et al. Nrf2, but not  $\beta$ -catenin, mutation represents an early event in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2015;62(3):851–62.
147. Orrù C, Perra A, Kowalik MA, Rizzolio S, Puliga E, Cabras L, et al. Distinct mechanisms are responsible for nrf2-keap1 pathway activation at different stages of rat hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):1–16.
148. Haque E, Karim MR, Salam Teeli A, Śmiech M, Leszczynski P, Winiarczyk D, et al. Molecular Mechanisms Underlying Hepatocellular Carcinoma Induction by Aberrant NRF2 Activation-Mediated Transcription Networks: Interaction of NRF2-KEAP1 Controls the Fate of Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2020 Jul 29;21(15). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32751080>
149. Henderson CJ, McLaren AW, Wolf CR. In vivo regulation of human glutathione transferase GSTP by chemopreventive agents. *Cancer Res [Internet]*. 2014 Aug 15;74(16):4378–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934809>
150. Penning TM. Aldo-Keto Reductase Regulation by the Nrf2 System: Implications for Stress Response, Chemotherapy Drug Resistance, and Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol [Internet]*. 2017;30(1):162–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27806574>
151. Nishinaka T, Miura T, Okumura M, Nakao F, Nakamura H, Terada T. Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2. *Chem Biol Interact [Internet]*. 2011 May

30;191(1–3):185–91. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277289>

152. Orrù C, Perra A, Kowalik MA, Rizzolio S, Puliga E, Cabras L, Giordano S CA. Distinct Mechanisms Are Responsible for Nrf2-Keap1 Pathway Activation at Different Stages of Rat Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8).
153. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res [Internet]*. 2018;134:92–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29913224>
154. Namani A, Li Y, Wang XJ, Tang X. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *Biochim Biophys Acta [Internet]*. 2014 Sep;1843(9):1875–85. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24851839>
155. Wang H, Liu K, Geng M, Gao P, Wu X, Hai Y, et al. RXR $\alpha$  inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2. *Cancer Res*. 2013;73(10):3097–108.
156. Li M-M, Tang Y-Q, Gong Y-F, Cheng W, Li H-L, Kong F-E, et al. Development of an oncogenic dedifferentiation SOX signature with prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer [Internet]*. 2019 Aug 28;19(1):851. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31462277>
157. Kowalik MA, Sulas P, Ledda-Columbano GM, Giordano S, Columbano A, Perra A. Cytokeratin-19 positivity is acquired along cancer progression and does not predict cell origin in rat hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 2015;6(36):38749–63.
158. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology [Internet]*. 2006 Apr;130(4):1245–58. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618416>

159. Li LO, Ellis JM, Paich HA, Wang S, Gong N, Altshuller G, et al. Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Oct 9;284(41):27816–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648649>
160. Li W-Q, Chen C, Xu M-D, Guo J, Li Y-M, Xia Q-M, et al. The rno-miR-34 family is upregulated and targets ACSL1 in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *FEBS J* [Internet]. 2011 May;278(9):1522–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21366874>